



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

**Análisis de la inducción de amplificación
genética después de un reto inmune en el
mosquito *Anopheles albimanus***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUIMICAS

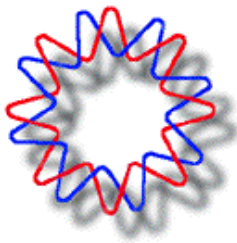
P R E S E N T A:

DIDIER BARRADAS BAUTISTA

DIRECTOR DE TESIS:

DR. SALVADOR HERNANDEZ MARTINEZ

2011





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.

Agradecimientos.....	i
Dedicatoria	ii
INTRODUCCIÓN	1
Ciclo de vida del parásito de la malaria.....	2
Ciclo de vida de los mosquitos.....	5
Sistema inmune de los insectos.....	6
ANTECEDENTES	9
Endoreplicación.....	11
Microsintenia en insectos.....	15
HIPOTESIS	17
OBJETIVO GENERAL	17
OBJETIVOS PARTICULARES.....	17
JUSTIFICACIÓN	18
MATERIAL Y METODOS.....	20
1. Material biológico	20
2. Incorporación de BrdU en el DNA de mosquitos inoculados con microorganismos.....	21
3. Inmunodetección de BrdU incorporado en los tejidos.....	24
4. Determinación de BrdU incorporado en el DNA por ELISA.	25
5. Cultivo de Oocinetos de <i>P. berghei</i> que expresan constitutivamente GFP.....	27
6. Infección de mosquitos con oocinetos de <i>P. berghei</i> -GFP e incorporación de BrdU.....	28
7. Construcción de membranas de macroarreglo e identificación de las características de las muestras consideradas positivas.....	29
8. Amplificación de fragmentos de DNA genómico de <i>An. albimanus</i> por medio de la reacción en cadena de la polimerasa para ser usadas como material de elaboración del macroarreglo.....	31
9. Amplificación de fragmentos de DNA del transcriptoma de <i>An. albimanus</i> por medio de la reacción en cadena de la polimerasa para ser usadas como material de elaboración del macroarreglo.	31

10. Dot blot en membranas de nitrocelulosa para la elaboración del macroarreglo	32
11. Fijado de secuencias de DNA de <i>An. albimanus</i> en la membrana de nitrocelulosa con el uso de un replicador.	34
12. Sonda de DNA marcada con BrdU	35
13. Hibridación de sondas marcadas con BrdU	35
14. Detección de DNA marcado con BrdU en membranas de nitrocelulosa .	36
15. Búsqueda bioinformática de genes vecinos para enriquecer el macroarreglo.	38
RESULTADOS	40
Demostración de incorporación de BrdU en tejidos de <i>An. albimanus</i> in vivo, después de un reto inmune, mediante ensayos de inmunofluorescencia	40
Demostración de incorporación de BrdU en tejidos de <i>An. albimanus</i> in vitro, después de un reto inmune, mediante ensayos de inmunofluorescencia.	47
Inmunohistoquímica de la incorporación de BrdU in vivo durante la infección con <i>P. berghei</i>	49
Cuantificación relativa de la incorporación de BrdU in vitro e in vivo en mosquitos tratados con distintos estímulos.	57
Análisis de secuencias expresadas en <i>An. albimanus</i> relacionados al sistema inmune del mosquito en un “macroarreglo”	62
Diseño de cebadores para PCR.	66
Enriquecimiento del macroarreglo mediante la amplificación y clonación de fragmentos nuevos.	68
DISCUSION	70
Inmunodetección de BrdU en los tejidos de <i>An. albimanus</i>	70
Incorporación de BrdU en mosquitos <i>An. albimanus</i> alimentados con sangre infectada con parásitos GFP	77
Genes amplificados durante la síntesis de DNA en <i>An. albimanus</i>	81
Clonación de secuencias de <i>An. albimanus</i> encontradas por medio de “estimaciones razonadas”	85
CONCLUSIONES	88

PERSPECTIVAS.....	90
APÉNDICES.....	98
1. Preparación de stock de Levaduras (SIGMA), Micrococcus (SIGMA) y Serratia	98
2. Preparación de medio de cultivo para los ensayos in vitro de incorporación de BrdU.....	98
3. PBS 10X.....	99
4. Mezcla de inhibidores de proteasas.....	99
5. Solución bloqueadora 5%: leche descremada	99
6. Solución bloqueadora 1% leche descremada PBS 1X, Tween 20	100
7. TBS 1X.....	100
8. Solución de magnesio.....	100
9. Solución de prehibridación/hibridación (SPH)	100
10. SSC 20X	101
11. Listado de secuencias consideradas positivas en el macroarreglo.....	101
12. Lista enriquecida con nuevas secuencias y sus descripciones.....	103
13. Amortiguador de carbonatos 0.1 M	109
14. Preparación de Orto Fenil Diamina (OPD) para el ensayo de ELISA. ..	110
15. ELISA Wash 20X	110
16. Amortiguador de lisis de células eucariotas	110
17. Grafica de análisis estadístico de incorporación relativa de BrdU.....	111
18. Representación esquemática de la ubicación del cuerpo graso y el corazón dentro del mosquito.....	112

Agradecimientos

El autor de este trabajo L.C. Didier Barradas Bautista con Numero de registro **267839** agradece la beca de maestría otorgada por el CONACyT. Este trabajo fue realizado gracias al apoyo otorgado por los proyectos con número **62389** y **83207** otorgados por el CONACyT al grupo de trabajo del que formo parte.

Agradezco al gobierno del estado de Veracruz por el reconocimiento de los estudiantes veracruzanos de alto rendimiento que estudian fuera del estado con el incentivo económico otorgado

A todos los del laboratorio 1 planta baja: Alex, Chio, Juan, Dr. Chucho, Rosy, Chino, Marbe y la Dra. Maricarmen; a los del laboratorio 3 planta alta : Mike , Toñis , Renaud ; el Carnal Javo , Lupita , Martuchis y el Dr. Lanz; y a mis compañeros del laboratorio 4 planta alta : Mine, Isa, Marisol, y Memo, a las “Lauras” , a Rome , a los “Bernardos” y a los que me faltan que ya no están en el grupo en este momento, a todos muchas gracias todo este tiempo me la pase a todo dar, entre trabajo y bromas fue todo muy ameno.

Un agradecimiento especial al Dr. Salvador Hernández Martínez, mi mentor, excelente jefe y magnifico amigo, por no mencionar gran investigador, que me dio la oportunidad de aprender, dentro de un equipo multidisciplinario disciplinario, varias técnicas y trucos que me serán de gran utilidad en mi desarrollo profesional. Al “jefe” ¡**muchas gracias por la oportunidad!**

A todos los que directamente participaron en mi proyecto, y a los que consciente pero sobre todo a los que inconscientemente “aportaron” algo para este proyecto

Dedicatoria

A mi mis hermanos, siempre han sido mi fuerza

A mis padres, por que se que me aguantan el carácter y aun así me quieren

A mis tíos, Celia y Miguel, que no dejaron de apoyarme con todo

A mis amigos de la licenciatura, Carlos, Beto, Caro, Amed, Lucero, Ivan, Gino, Okocha, siempre les pediré perdón por cualquier daño que les haya causado y siempre estaré agradecido de su tiempo conmigo

A Gretel por que fue una parte muy importante de mi vida y sin querer le hice daño, ojala que siempre estés rodeada de amor

A mis recuerditos, porque tengo que seguir adelante pero sin olvidar lo que aprendí

A mis abuelos, aunque la mayoría ya partió aun disfruto de las historias que me contaron, y de las vivencias que con ustedes pase y a la que me queda por que todavía la disfruto como un chamaco de 5 años

Para Mariana por su fe en mí, por creer que soy una persona diferente y por su amor incondicional este trabajo te lo dedica un mono que te dice: te amo pocha.

"I am the feeder, the morsel that revives the starving." —Seal of strength inscription's

"I am the romancer, the passion that consumes the flesh." - Seal of fire inscription's

INTRODUCCIÓN

Los insectos son el grupo con mayor diversidad de especies dentro del reino animal. Los insectos, han sido capaces de colonizar prácticamente todos los nichos ecológicos exceptuando las profundidades marinas, posiblemente en parte gracias a la eficiencia de su sistema inmunológico que les ha permitido combatir una gran variedad de patógenos.

Asimismo, muchas especies de insectos afectan de una manera muy importante a los humanos, tanto en la agricultura como en la salud.

En cuestiones de la salud transmiten enfermedades tan importantes como la malaria y la filariasis (transmitidas por mosquitos), la enfermedad de Chagas (transmitida por chinches) y la enfermedad del sueño (transmitida por moscas). En conjunto se les denomina Enfermedades Transmitidas por Vector (ETVs), las cuales se encuentran catalogadas dentro de los problemas de salud pública más importantes a nivel mundial.

La malaria, es causada por un parásito protozoario del género *Plasmodium*, y es transmitida por un mosquito del género *Anopheles*, siendo considerada la enfermedad parasitaria más importante en el mundo. Según las estimaciones en 2008 se registraron, unos 247 millones de casos de malaria, produciendo como resultado casi un millón de muertes, principalmente de menores de cinco años. (WHO, 2010). En México en 2009 se reportaron 1 774 casos y hasta agosto de 2010 se tenían reportados 794 casos de malaria, un total de 2568 casos en un periodo de casi 2 años. (Boletín Epidemiología, 2010)

Ciclo de vida del parásito de la malaria

El ciclo de vida del parásito de la malaria sigue un programa de desarrollo complejo que alterna fases o estadios de replicación intracelular y fases o estadios móviles de invasión extracelular; ambos eventos se deben dar para permitir la transmisión entre el hospedero invertebrado (mosquito *Anopheles*) y el vertebrado (Matuschewski; 2006).

Para describir el ciclo de vida de *Plasmodium*, se tiene que hacer hincapié en que existen diferentes estadios, de los cuales tres invaden tejidos específicos (en el vertebrado, las células de hígado y los eritrocitos; en el mosquito, las células de intestino y las de la glándula salival). Los gametocitos se forman en los eritrocitos del humano infectado, sin embargo, es en el estómago del mosquito donde maduran a gametos y se unen para formar un cigoto (Alberts *et al.*, 2002).

Brevemente, el ciclo del parásito en el huésped vertebrado comienza con la picadura de un mosquito hembra infectado con *Plasmodium*. Durante la picadura, el mosquito inyecta en las venas del huésped una fase móvil del parásito conocida como esporozoíto; y a los pocos minutos de su ingreso en la sangre del vertebrado, el esporozoíto invade las células del hígado transformándose en un trofozoíto hepático (Frevert, 2004). Los trofozoítos se multiplican rápidamente dentro de las células hepáticas convirtiéndose en esquizontes hepáticos. Los esquizontes al madurar, son liberados al torrente sanguíneo tras la ruptura de las células hepáticas. A ésta nueva forma del parásito, con capacidad invasiva, se le denomina merozoíto. El merozoíto en circulación invade las células sanguíneas transformándose en un trofozoíto eritrocítico. Después de un tiempo de

incubación, el trofozoíto se multiplica y producen nuevos merozoítos, los cuales lisan a los eritrocitos y son liberados a torrente sanguíneo para invadir nuevos eritrocitos (ciclo eritrocítico). Después de varios de estos ciclos, una porción de merozoítos se diferencia a gametocitos en el interior de los eritrocitos, dentro de los cuales permanecen para ser ingeridos por un mosquito. Debido a esta constante ruptura de eritrocitos en la sangre, el hospedero presenta en general anemia, fiebres severas y periódicas, dolor de cabeza y espalda. (Baldacci y Ménard, 2004).

La progresión del parásito dentro del mosquito requiere de varias y distintas adaptaciones. En el mosquito es donde ocurre la fase sexual del parásito. Esta fase comienza con la ingestión de sangre infectada, la cual contiene eritrocitos con gametocitos en su interior. Los gametocitos son liberados en el lumen del intestino del mosquito, sitio en el cual se diferencian a gametos femeninos y masculinos (macro y microgametos respectivamente). En el lumen del intestino, el microgameto fecunda al macrogameto formando un cigoto (fase sexual) que dará origen a una forma diploide, móvil y alargada llamada oocineto. Aproximadamente 24 h después de la fecundación, el oocineto ha madurado y comienza la migración a través de la matriz peritrófica del mosquito (que es sintetizada tras la alimentación con sangre). Posteriormente, el oocineto alcanza el epitelio intestinal del estómago, el cual invade para alojarse entre éste y su lámina basal (Levashina, 2004; Matuschewski, 2006). El oocineto, ya instalado en el espacio entre el epitelio intestinal y la lámina basal, inicia una nueva fase de amplificación del número de parásitos para dar origen a un ooquiste. Lo anterior ocurre después

de múltiples mitosis que realiza el parásito para producir miles de esporozoítos (Christophides *et al*, 2004).

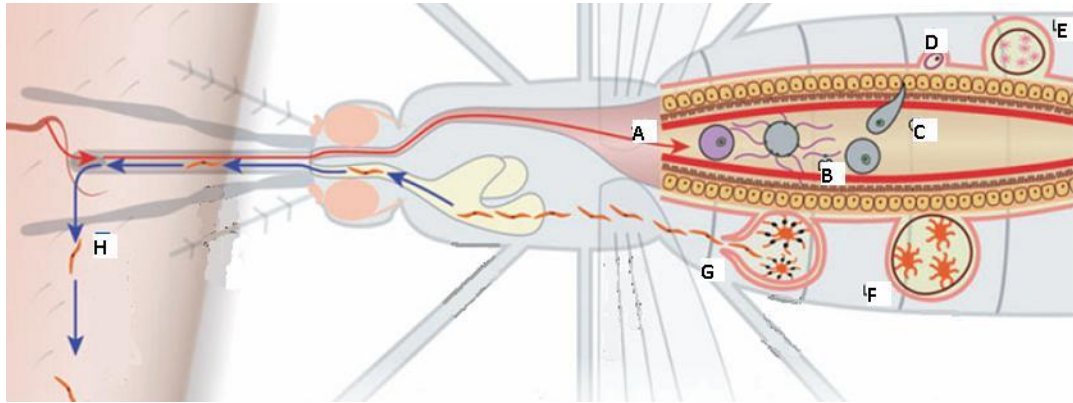


Figura 1. Ciclo esporogónico (sexual) del parásito de la malaria en el mosquito. A) El ciclo comienza cuando el mosquito hembra se alimenta de un hospedero vertebrado infectado. Los gametocitos se diferencian a micro y macrogametos. B) La unión de los gametos haploides resulta en un cigoto diploide. C) El cigoto da origen a la primera fase móvil del parásito conocida como oocineto. El oocineto tiene la capacidad de invadir el epitelio intestinal. D) El oocineto se aloja entre la membrana de la célula epitelial y su lámina basal dando origen a un ooquiste. E, F) El ooquiste madura, y los parásitos se multiplican por medio de una meiosis y múltiples mitosis dando origen a miles de esporozoítos. G) Los esporozoítos son liberados a la hemolinfa del mosquito y migran hacia las glándulas salivales. H) Cuando el mosquito se vuelve a alimentar en su huésped vertebrado, junto con la saliva inyecta a los esporozoítos al torrente sanguíneo del nuevo hospedero. Imagen tomada de Matuschewski (2006).

Los esporozoítos recién formados maduran dentro del quiste, y después de la ruptura de éste, son liberados a la hemolinfa (la sangre de los insectos) para viajar hasta alcanzar las glándulas salivales. Los esporozoítos invaden las

glándulas salivales del mosquito, y es ahí donde permanecen hasta ser depositados en la dermis del hospedero vertebrado en la próxima alimentación sanguínea.

Ciclo de vida de los mosquitos

En el mundo existen 3300 especies de mosquitos, todos pertenecientes a la familia Culicidae, la cual se divide en tres sub-familias Toxorhynchitinae, Anophelinae y Culicinae.

En el ciclo de vida el mosquito pasa por cuatro estadios larvales y una fase de pupa, antes de llevar a cabo la metamorfosis para poder llegar a adulto. Ya como adulto el mosquito macho sólo se alimenta del néctar de las plantas; sin embargo la hembra adicionalmente se tiene que alimentar con sangre, proceso llamado hematofagia, para poder desarrollar adecuadamente los huevecillos. Este proceso ha sido explotado por virus y parásitos que usan a los mosquitos como vehículo para su transmisión a los vertebrados.

Después de alimentarse y digerir la sangre, la hembra busca un hábitat adecuado para depositar los huevecillos, lo cual realiza sobre la superficie de cuerpos de agua. Al proceso completo de alimentarse, madurar los huevecillos y oviponer se le llama ciclo gonotrófico ya que se repite varias veces durante la vida de la hembra fértil. En la figura 2 se muestra de manera esquemática el ciclo de vida descrito anteriormente

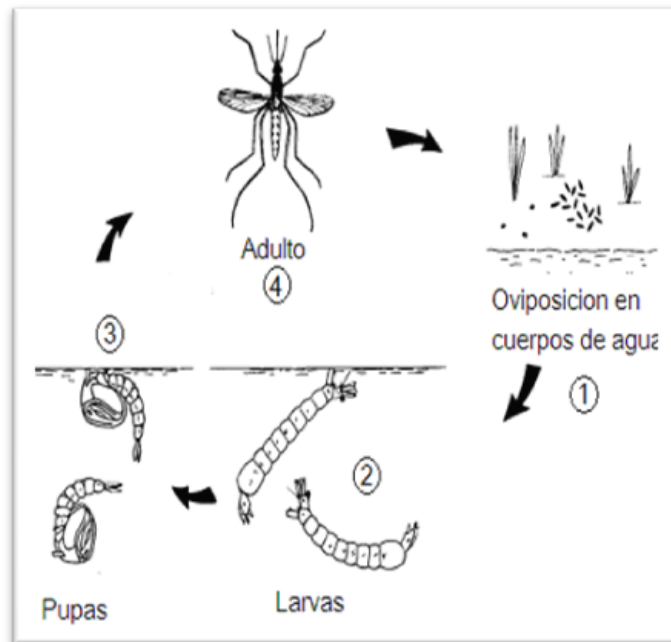


Figura 2. Ciclo de vida de los mosquitos. 1) Los mosquitos depositan sus huevecillos en cuerpos de agua o sitios con humedad elevada. 2) Después de cierto tiempo de incubación, de los huevecillos maduros eclosionan larvas, las cuales presentan cuatro estadios de maduración. El mosquito pasa cerca de un tercio de su vida en el agua de esta forma. 3) La fase de pupa no se alimenta y pasa la mayor parte del tiempo preparándose para la metamorfosis a adulto. 4) De la pupa emergen los adultos; las hembras alcanzan la madurez al poco tiempo siendo necesaria su alimentación con sangre para poder desarrollar adecuadamente los ovarios y los huevecillos.

Sistema inmune de los insectos

Los insectos carecen de una respuesta inmune adaptativa basada en la generación somática y expansión clonal de células inmunes específicas, de tal forma que también se encuentran ausentes la generación de un repertorio grande

de reconocimiento de antígenos y la memoria inmunológica de larga duración (Du Pasquier y Flajnik, 1999). En su lugar, presentan mecanismos característicos de la respuesta inmune innata, donde componentes celulares y humorales contribuyen de manera muy importante en la resistencia a infecciones microbianas (Hoffman *et al.*, 1999).

En este sistema participan una gran variedad de familias de genes que incluye respuestas humorales y celulares, las cuales se presentan en primer término en las barreras epiteliales (la epidermis, los intestinos y la red traqueal). A partir de estos órganos, la respuesta puede extenderse sistémicamente por medio del hemocele, un sistema circulatorio abierto, que se encuentra lleno de hemolinfa el equivalente de los insectos de la sangre

En la respuesta inmune sistémica participan principalmente el cuerpo graso (el principal productor de proteínas de la hemolinfa) y los hemocitos, los cuales participan en procesos de fagocitosis, formación de nódulos, encapsulación y producción y liberación de profenoloxidasa (enzima que después de ser activada es responsable de la producción de melanina, proceso en el cual se genera gran cantidad de especies reactivas de oxígeno) (Hernández-Martínez *et al.*, 2002)

Estos componentes celulares y humorales presentes en la hemolinfa permiten a los mosquitos realizar una respuesta inmune rápida y eficiente al momento de una infección.

En este sistema circulatorio abierto, los patógenos se encuentran con factores humorales presentes en la hemolinfa, tales como el sistema de la profenoloxidasa, opsoninas, factores de coagulación, etc., los cuales requieren de cortes proteolíticos para su activación. La unión de estas moléculas a los

patógenos provoca una rápida respuesta celular, representada principalmente por procesos de fagocitosis, melanización y encapsulación celular. Asimismo son activadas cascadas de señalización, que en cuestión de horas inducen la producción de grandes cantidades de moléculas de defensa relacionadas al sistema inmune del mosquito, que llegan a elevarse de concentraciones picomolares hasta micromolares en la hemolinfa (Levashina, 2004; Lowenberger, 2001).

El arsenal de moléculas de reconocimiento, vías de señalización y moléculas efectoras (Christophides *et al.*, 2004) indica que los insectos presentan respuestas diferentes ante el reto con diferentes agentes. Se han identificado varias moléculas inductoras de las respuestas de defensa en insectos contra microorganismos, sin embargo aún se desconocen los mecanismos por medio de los cuales se monta la respuesta con la magnitud requerida para el control y la eliminación de patógenos.

ANTECEDENTES

Como hemos mencionado, los insectos responden a una variedad muy amplia de microorganismos y antígenos mediante procesos celulares y humorales, pero se desconocen los mecanismos moleculares involucrados en la síntesis de cantidades enormes de productos de defensa involucrados en estas respuestas, y a la fecha, en insectos no se cuenta con evidencias que apoyen la existencia de procesos de proliferación celular durante una respuesta inmune.

La participación de varios tejidos en la respuesta inmune de los insectos aún no ha sido establecida, pero existen evidencias de que tejidos como la cutícula, el cuerpo graso, y el intestino medio, juegan un papel determinante en la defensa contra infecciones. La presencia de bacterias en heridas superficiales producidas en la cutícula de larvas de *B. mori*, *H. cecropia* y *D. melanogaster*, induce la expresión de RNA mensajeros de cecropinas en la epidermis (Brey *et al.*, 1993; Tzou *et al.*, 2002), lo que sugiere que los epitelios de la epidermis pueden estar participando de manera determinante en la respuesta inmune.

Hernández-Martínez *et al* (2006); desarrollaron una metodología de cultivo primario de órganos y tejidos del mosquito *An. albimanus*, uno de los principales vectores de *Plasmodium vivax* (*P. vivax*) en México, lo que permitió iniciar el estudio de la participación de los tejidos en la respuesta a estímulos antigénicos. En estos estudios no se logró evidenciar la presencia de fenómenos de proliferación celular; sin embargo el cuerpo graso, epitelio de las membranas pleurales, tejido nervioso y vaso dorsal respondieron a la inoculación de levaduras *S. cerevisiae* mediante una intensa síntesis de DNA nuclear.

En el trabajo anterior evidenciaron y evaluaron la capacidad de síntesis de DNA en diferentes tejidos de mosquitos retados con levaduras, mediante la incorporación *in vitro* de un análogo de la timidina: la 5-bromo-2-deoxiuridina (BrdU, compuesto que se incorpora al DNA durante su síntesis) y el uso de anticuerpos anti-BrdU. La incorporación de BrdU en el DNA ha sido muy útil para determinar la cantidad y localización de células que se encuentran en la fase S del ciclo celular en diferentes sistemas biológicos (Lenronne *et al.*, 2001), sin embargo como se mencionó anteriormente, durante la síntesis de DNA inducida por un reto inmune en *An. albimanus* no se lograron evidenciar procesos de proliferación celular (Hernández-Martínez *et al.*, 2006).

Los hallazgos de este trabajo, sugieren que la intensa síntesis de DNA observada pueda ser parte de un mecanismo que aumente el número de copias de genes para la producción masiva de moléculas de defensa (como péptidos antibacterianos) ante un reto inmune. Se ha evidenciado que células foliculares (somáticas) de los ovarios de *D. melanogaster* presentan un proceso de síntesis de DNA relacionado con la amplificación de grupos de genes específicos que codifican para proteínas del corion del cascarón del huevo, lo cual será referido en el presente trabajo como formación de amplicones (Claycomb *et al.*, 2004).

La amplificación génica ha sido estudiada en varias especies de insectos, en base a procesos asociados a etapas específicas del desarrollo de tales insectos (Claycomb y Orr-Weaver, 2005).

En el caso de *Drosophila*, los amplicones son una estrategia empleada para alcanzar altos niveles de expresión de genes que codifican para proteínas del corión del huevo. Durante esta amplificación de genes, las células somáticas de

los ovarios de *Drosophila* utilizan la maquinaria de replicación de la célula, armando primero los componentes del complejo de reconocimiento del origen (ORC; por sus siglas en inglés), lo cual es esencial para la amplificación génica y proliferación celular en este tejido, pero la endoreplicación parece no necesitar del ensamblaje del complejo de reconocimiento del origen, un fenómeno observado en las glándulas salivales de larvas mutantes de *Drosophila* que carecían de este complejo (Park y Asano, 2008).

La síntesis de DNA combinada con la formación de cromosomas politénicos en tejidos abdominales en el cultivo de *An. albimanus*, sugieren un proceso donde las células están metabólicamente muy comprometidas, posiblemente debido a la alta producción de moléculas inmunes para responder ante un patógeno, sin la necesidad de que ocurra división celular (Hernández-Martínez *et al.*, 2006; Edgar y Orr-Weaver, 2001). Así, las evidencias muestran que los insectos presentan procesos que permiten que sus células respondan eficientemente ante diferentes demandas metabólicas, sin la necesidad de multiplicarse; uno de estos procesos es conocido como endoreplicación.

Endoreplicación

El DNA puede presentar diferentes mecanismos de replicación. Cada uno de estos mecanismos cubre requerimientos específicos en diferentes etapas del desarrollo celular. La replicación mitótica se lleva a cabo en células que proliferan para incrementar su número, otro mecanismo es la amplificación génica localizada

que se especializa en incrementar productos génicos particulares (Claycomb y Orr-Weaver, 2005).

En la poliploidía, el número normal de cromosomas aumenta, los poliploides se crean de forma natural como mutaciones cromosómicas, por lo que se cree que muchas especies han aparecido empleando la poliploidía como estrategia evolutiva debido a la velocidad con la que hibridación, entrecruzamiento, o autofertilización puede generar una nueva especie (Griffiths *et al.*, 1999).

La politenía se ha observado especialmente en la metafase celular de ciertos órganos de Dípteros, tales como los túbulos de Malpigio, el intestino posterior, el intestino medio, y las glándulas salivales (Campos *et al.*, 2003; Nishiura *et al.*, 2003; Mavragani-Tsipidou *et al.*, 1990; Zambetaki *et al.*, 1995). En estos órganos, los cromosomas replican su DNA muchas veces sin separar las cromátidas hermanas, y mientras más incrementa el cromosoma el número de replications más se incrementa su tamaño, dando lugar a la formación de cromosomas politénicos gigantes.

La distinción entre la poliploidía y la politenía no es absoluta debido a la existencia de varios grados intermedios de asociación entre las cromátidas duplicadas. Es por esto que de manera genérica se ha empleado el término endoreplicación para células que entren en un evento de amplificación génica. Una de las características más observadas es la relajación de los centros de replicación de DNA que permiten la amplificación de regiones genómicas específicas (Edgar y Orr-Weaver, 2001).

La endoreplicación del DNA se lleva a cabo en células diferenciadas que han perdido su habilidad para proliferar, y el fenómeno se encuentra ampliamente

distribuido en vertebrados y artrópodos (Edgar y Orr-Weaver, 2001; Park y Asano, 2008). Este es un mecanismo empleado por células especializadas y altamente biosintéticas para expandir su contenido de DNA genómico sin presentar división celular. Este mecanismo es común en diferentes tejidos de insectos durante la embriogénesis, estadios larvales y tejidos diferenciados del adulto durante la oogénesis (Smith y Orr-Weaver, 1991). Adicionalmente, las células del cuerpo graso de insectos hembra adultos responden con síntesis de DNA ante una demanda elevada para producir vitelogenina, la cual es necesaria para el desarrollo de los huevos (Dittmann *et al.*, 1989).

En el trabajo de Claycomb y cols, (2004), se demostró que la endoreplicación no sólo es utilizada para incrementar los niveles de las proteínas estructurales que constituyen el cascarón del huevo de *Drosophila*, sino que también se pueden amplificar genes cuyos productos; son enzimas solubles que participan en la unión de la vitelina ubicada entre la membrana plasmática y el cascaron externo del oocito en desarrollo (Botchan y Levine, 2004).

El ciclo celular de mitosis y la endoreplicación comparten las mismas bases moleculares. Ambas estrategias son controladas por cinasas y fosfatasas altamente conservadas. El papel principal de regulación lo tienen las cinasas, las cuales necesitan unirse a ciclinas para activarse (CDK, por sus siglas en inglés). Las diferentes combinaciones de CDK y ciclinas controlan la transición entre una fase del ciclo celular a otra (Traas *et al.*, 1998).

El ciclo celular junta una serie de eventos macromoleculares que llevan a la división celular y la producción de dos células hijas cada una conteniendo

cromosomas idénticos a los de la célula progenitora. La duplicación de los cromosomas ocurre durante la fase S del ciclo (Lodish *et al.*, 2004).

Sin embargo, como ya se ha mencionado, la endoreplicación ocurre en células que no presentan división celular. Su ciclo celular se ve modificado convirtiéndose en endociclos. Los endociclos consisten en distintas combinaciones entre las fases S y G del ciclo mitótico. Los endociclos son regulados principalmente por oscilaciones en la actividad de Ciclina E y CDK2 (Edgar y Orr-Weaver; 2001). Durante los endociclos la mayoría del genoma es replicado en cada fase S, mientras que en la amplificación de genes ciertas regiones específicas del genoma son sobre replicadas resultando generalmente, en un aumento del número de copias de los genes o regiones intergénicas de DNA (Hemingway *et al.*, 1998).

El origen de la replicación en los eucariontes se ha estudiado extensivamente usando como modelo a la levadura *S. cerevisiae*. En el caso de los insectos no se conocen bien las secuencias que permiten el inicio de esta estrategia de replicación llamada endoreplicación. El elemento de control de amplificación para el clúster coriónico del tercer cromosoma (ACE3, por sus siglas en inglés) y el origen Ori β de células foliculares del ovario de *Drosophila*, han sido mapeados como posibles sitios del inicio de la replicación (Claycomb y Orr-Weaver, 2005).

Microsintenia en insectos

La disminución de los costos de secuenciación de las nuevas metodologías, ha permitido completar varios proyectos de secuenciación de genomas. Hoy en día contamos con varias bases de datos las cuales contienen información conjunta de los genomas, la información de ESTs (Expressed Sequence Tags) y de los proteomas de varios insectos.

Utilizando diferentes estrategias de comparación con ayuda de herramientas bioinformáticas, ahora podemos observar y cuantificar la divergencia entre diferentes genomas de insectos (Zdobnov y Bork, 2007). Estos estudios revelan una conservación de “microsintenia”, la cual puede ser entendida como la preservación del orden y la vecindad entre genes a través de la evolución de los organismos. La presencia de “bloques sinténicos”, es entendida como regiones cromosomales que han sido mantenidas en la evolución, así como la presencia de elementos no codificantes altamente conservados (HCNE, por sus siglas en inglés) que se encuentran asociadas como firmas indirectas de la conservación de la microsintenia (Engström *et al.*, 2007).

La microsintenia en insectos se encuentra conservada entre especies no tan distantes hasta en un 99% en la estructura del orden de los genes vecinos, y comparando organismos que evolutivamente se encuentran muy distantes esto puede caer hasta por debajo de un 10%. Además el promedio de identidad de las comparaciones de las proteínas de los genes ortólogos de una sola copia, van desde el 53% al 95% (Zdobnov y Bork, 2007).

Las primeras comparaciones genómicas funcionales de insectos relevantes para el sector salud, fueron realizadas contra el genoma de *Drosophila*. Estas comparaciones mostraron una gran divergencia entre proteínas de mosquitos y *Drosophila*, sobre todo en las relacionadas con inmunidad. Sin embargo, también fue mostrada una importante conservación en elementos de diferentes vías de señalización (Zdobnov *et al.*, 2002).

Actualmente se cuenta con el genoma de *An. gambiae* (Holt *et al.*, 2002), el principal vector de *P. falciparum*, y el de *Ae. aegypti* (Nene *et al.*, 2007), el principal vector de virus Dengue. La distancia evolutiva entre ambos organismos se estima entre 145 y 200 millones de años; y cerca de 250 millones de años de distancia con *Drosophila*. Las comparaciones entre los dos genomas de mosquitos mostró que existen 1345 bloques de microsintenia, los cuales contienen 5265 genes ortólogos de una sola copia (Nene *et al.*, 2007).

La conservación de la microsintenia, se caracteriza por la presencia HCNE, los cuales están posicionados en bloques sinténicos grandes organizados de manera similar, expandiendo múltiples genes en loci ortólogos entre especies distantes como *Drosophila* y *Anopheles* (Engström *et al.*, 2007).

HIPOTESIS

La síntesis de DNA inducida después de un reto microbiano en *Anopheles albimanus*, está relacionada con genes que codifican para moléculas de defensa.

OBJETIVO GENERAL

Identificar genes que codifican para moléculas de defensa que son amplificadas en el mosquito *Anopheles albimanus* después de un reto microbiano.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Analizar y comparar la síntesis de DNA en *An. albimanus* inducida después de un reto con distintos microorganismos, incluidos parásitos de *P. berghei*.

- Diseñar un sistema de “macroarreglos” para la identificación de los genes amplificadas durante la inducción de síntesis de DNA en *An. albimanus*.

JUSTIFICACIÓN

La respuesta inmune en mosquitos es fundamental para la eliminación de patógenos. Sin embargo, son muchos los aspectos moleculares de esta respuesta que aún desconocemos, tanto en su parte efectora como en la reguladora.

En la actualidad se cuenta con técnicas que permiten introducir genes en insectos, y con las secuencias de los genomas completos de mosquitos vectores de enfermedades infecciosas (*An. gambiae*, *Ae. aegypti*, *Culex quinquefasciatus*) (Lawson *et al.*, 2009), lo cual ha abierto posibilidades sin precedentes de modificar la respuesta inmune de los insectos vectores de parásitos en no-vectores. No obstante, esta posibilidad no será factible si carecemos de un conocimiento sólido del sistema inmune de los insectos.

Con las herramientas en bioinformática con que contamos actualmente y la información de los genomas, es posible la búsqueda de nuevas estrategias basadas en la modificación del sistema inmune de insectos para el control de la transmisión de enfermedades.

Actualmente, en nuestro grupo contamos con evidencia de la capacidad de síntesis de DNA después de un reto inmune y con una base de datos del transcriptoma de *An. albimanus*. Lo anterior nos capacita para analizar en detalle los procesos que regulan este fenómeno, lo que podría en un futuro permitirnos elegir las estrategias más adecuadas para la manipulación genética de mosquitos vectores de enfermedades infecciosas. Dichas estrategias se vuelven más atractivas debido a la aparición de resistencia, tanto a los insecticidas en los insectos como a las drogas empleadas para el control de los parásitos

En el presente trabajo la elección del mosquito *An. albimanus* se debió a que es uno de los principales vectores de malaria causada por *P. vivax* en México.

MATERIAL Y METODOS

1. Material biológico

Mosquitos. En el presente estudio se utilizaron mosquitos hembra de la especie *An. albimanus* cepa tapachula, los cuales fueron obtenidos del insectario del Instituto Nacional de Salud Pública (INSP). Posteriormente para ensayos de infección se utilizaron mosquitos *An. albimanus* de cepas susceptibles y resistentes a la infección de *Plasmodium berghei*, las cuales fueron obtenidas en el transcurso de este trabajo (Hernández-Martínez *et al.* datos no publicados). Las larvas fueron criadas con una dieta a base de croquetas para ratón (Purina) pulverizadas y los mosquitos (adulto) con un algodón humedecido en una solución de azúcar al 3%. Todas las fases del mosquito fueron mantenidas en un fotoperíodo de 12/12 h de oscuridad/luz a 28 °C y los adultos en condiciones de humedad relativa de 80%. La edad de los mosquitos utilizados fue de 0-1 o de 3 días post-emergencia.

Microorganismos. Los microorganismos utilizados para estimular la respuesta inmune en el mosquito fueron levaduras *Sacharomyces cerevisiae*, bacterias Gram+ *Micrococcus luteus* (SIGMA) y Gram- *Serratia marcescens* (donadas gentilmente por la Dra. Lilia González Cerón del Centro Regional de Investigaciones en Salud Pública de Tapachula). Los stocks fueron preparados en agua desionizada a una concentración de 4×10^7 células/ml para levadura, 1 mg/ml para *Micrococcus*, y 34×10^6 células/ml para *S. marcescens*. Todos los microorganismos fueron inactivados por calor y almacenados a 4 °C (Apéndice 1).

Virus dengue. El virus Dengue (gentilmente donado por el Dr. José Ramos Castañeda del INSP) fue inactivado por medio de irradiación de luz UV durante 1 h (por seguridad durante su manipulación en el laboratorio) y almacenado a -20°C a una concentración de 1×10^8 M.O.I. (Multiplicidad de infección; por sus siglas en inglés) en medio de cultivo Schneider complementado con 10% de suero fetal bovino. El mosquito *An. albimanus* no es un vector natural de Virus Dengue.

2. Incorporación de BrdU en el DNA de mosquitos inoculados con microorganismos

Incorporación de BrdU in vitro.

La edad de los mosquitos hembra empleados en este ensayo fue 2-3 días post-emergencia. Los mosquitos fueron inoculados en el abdomen entre el segmento 5 y 6 con 0.25 μ l de medio de cultivo RPMI (Royal Park Memorial Institute) conteniendo 1000 partículas de levadura *S. cerevisiae*, 8500 partículas de *S. marcescens*, o de una suspensión a 100 μ g/ml de *M. luteus*. En los tres casos, cada microorganismo fue diluido del stock en que se preparó originalmente para tener la concentración mencionada en un volumen de 0.25 μ l de RPMI. Los controles solo fueron inoculados con RPMI.

Dos horas después de la inoculación, los mosquitos fueron inmovilizados con frío (4°C) y colocados en cajas Petri cubiertas con hielo. Posteriormente los mosquitos fueron disecados en una gota de PBS (Apéndice 3) conteniendo inhibidores de proteasas (PMSF 0.2 mM, TLCK 0.1 mM, leupeptina 20 mM, 1 mM EDTA) (Hernandez-Martinez *et al.*, 1999) (Apéndice 4), donde el tórax fue

separado del abdomen y el intestino fue removido. El abdomen fue abierto con la ayuda del bisel de una aguja para jeringa, cortando a lo largo de la membrana pleural que se localiza lateralmente. Los abdómenes abiertos se colocaron en una placa para ELISA de 96 pozos con 200 µl/pozo de medio de cultivo RPMI suplementado con suero fetal bovino, antibiótico/ antimicótico y BrdU (Apéndice 2). El cultivo de abdómenes se realizó por 5 días, con cambios diarios de medio de cultivo. El estado físico de los abdómenes y el grado de contaminación fueron monitoreados cada 24 h con un microscopio invertido de contraste de fases (Nikon modelo ELCIPSE TS100). Después de los 5 días de cultivo, las muestras fueron procesadas para la inmunodetección de BrdU.

La incorporación relativa de BrdU se observó mediante un ELISA, utilizando DNA proveniente de las muestras, el cual fue obtenido como se describe continuación.

Los abdómenes enteros se maceraron y se incubaron en amortiguador de lisis (Apéndice 16). Se incubaron a 56°C en baño maría por lo menos 2 horas o se dejaron toda la noche.

Realizada la digestión se agregó 250 µl de una solución de fenol-cloroformo-isoamílico. Se mezcló en el vortex y se centrifugó durante 10 minutos a 16500-17500 g.

Se recuperó la parte acuosa y se agregó el mismo volumen recuperado de cloroformo (250 µl), para eliminar las trazas de fenol. Se mezcló en el vortex y se centrifugó durante 10 minutos a 16500-17500 g.

Se recuperó la parte acuosa y se agregó 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío a 20°C (625 µl). Inmediatamente se agregaron, un décimo del volumen original

(25 µl) de acetato de sodio 3M, pH 5.25 estéril. Se mezcló perfectamente y se incubó por 30 minutos a -70 o -80 °C.

Una vez terminada la incubación se centrifugó 10 minutos a 4 °C a 13 000 - 14 000 rpm. Se resuspendió el precipitado en 50 µl de agua mili Q o PBS 1X, se agregó Rnasa A (0.2 mg/ml) y se incubó durante dos horas a 37 °C para eliminar el RNA presente en la muestra. Todos los pasos fueron hechos como está descrito (Sambrook y Russell; 2001).

Incorporación de BrdU in vivo.

Mosquitos de 0-1 día de edad fueron alimentados durante tres días en un gel de agarosa al 0.5%, conteniendo 8% de sacarosa y 100 µg/ml de BrdU. El gel con azúcar y BrdU se preparó en una tapa de tubo Falcón. Después de los tres días de alimentación con el gel, los mosquitos fueron anestesiados con frío (a 4°C) en cajas de Petri cubiertas con hielo para ser inoculados utilizando un microaguja elaborada manualmente a partir de capilares de vidrio. Con la ayuda de un microscopio estereoscópico y una aguja de disección, los mosquitos fueron inoculados en la membrana pleural localizada entre el 5° y 6° segmento abdominal. El inóculo consistió en 0.25 µl de medio de cultivo RPMI como control, o con levaduras, bacterias Gram + o Gram – como se describió anteriormente (Apéndice 1). Paralelamente, otro grupo de mosquitos alimentados con BrdU fue inoculado con medio Schneider suplementado con 10% de suero fetal bovino (control), y otro con virus dengue a una concentración de 1×10^8 M.O.I. diluido en medio Schneider suplementado con 10% de suero fetal bovino. Todos los

mosquitos inoculados fueron regresados a su contenedor y se les dejó reposar durante 24 h.

Después de este tiempo, los mosquitos fueron disecados como se describió anteriormente en una gota de PBS (Apéndice 3) conteniendo inhibidores de proteasas para evitar el deterioro del tejido por acción de cascadas proteolíticas, y de inmediato procesados para la inmunodetección de BrdU. DNA proveniente de las muestras fue obtenido como se describió anteriormente y fue utilizado en la determinación de incorporación relativa de BrdU por ensayos de ELISA y para ensayos de digestión enzimática.

3. Inmunodetección de BrdU incorporado en los tejidos.

Después de haber sido sometidos a la incorporación *in vitro* o *in vivo*, los abdómenes con los diferentes tratamientos fueron fijados en 200 µl de formaldehído al 4% en PBS durante 1 h a temperatura ambiente (T/A), o toda la noche a 4°C. Posteriormente, se retiró el exceso de fijador y los tejidos se lavaron con PBS tres veces por 10 min cada cambio. Los tejidos fueron permeabilizados con metanol frío (-20°C) durante 10 min. Al finalizar la permeabilización, las muestras fueron lavadas con Tritón X-100 al 1% en PBS durante 10 min a T/A. Los tejidos fueron hidrolizados con HCl 2M (en agua) durante 10 min a T/A, lo anterior para hacer que el DNA de los tejidos se vuelva de cadena sencilla (requisito indispensable para que el anticuerpo pueda detectar al BrdU). La reacción se neutralizó con 2-4 cambios de solución de Hank's (hasta que no cambie de color)

por 10 minutos cada uno. Posteriormente, las muestras fueron lavadas con Tween-20 al 0.1% en PBS, tres veces 10 minutos cada cambio.

El bloqueo de sitios inespecíficos se realizó con albúmina sérica bovina al 2% en PBS (PBS-A) durante 1h a T/A. El exceso de solución bloqueadora fue removido y se agregó anticuerpo anti-BrdU conjugado a FITC (Fluoresceína-5-isotiocianato, Roche) en solución bloqueadora a una concentración de 1:100 en PBS-A. Las muestras se incubaron 2 horas a T/A, o toda la noche a 4 °C (protegidos de la luz). Los tejidos fueron lavados 3 veces con Tween-20 al 1% en PBS. Finalmente los tejidos fueron incluidos en glicerol al 80% en PBS para ser observados en un microscopio de epifluorescencia.

4. Determinación de BrdU incorporado en el DNA por ELISA.

Los pozos de una Placa de ELISA de 96 se cubrieron con 50 µl/pozo de una solución de poli- L- lisina a una concentración 10 µg/ml en amortiguador de carbonatos (Apéndice 13). La placa se cubrió con papel parafilm y se dejó incubar un mínimo de 2 horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4 °C; se aseguró que el fondo quedara bien cubierto por la solución de poli- L- lisina. Para usarse se lavó la placa al menos tres veces con agua destilada o con 0.5%de Tween-20 en agua destilada.

El DNA se diluyo en PBS 1X y se ajusto su concentración a 10 µg/ml. El DNA fue desnaturalizado en baño maría de agua en ebullición por 3 minutos, pasado este tiempo, las muestras se colocaron rápidamente en hielo. Se colocó en la placa un volumen de 50 µl de la solución de DNA desnaturalizado, y se

incubo durante 1 hora. Pasado el tiempo de incubación se retiró el exceso de la solución de DNA y se lavó la placa 3 veces con ELISA Wash 1X (Apéndice 15) para remover el DNA que no se había unido.

El bloqueo de sitios inespecíficos se realizó agregando 100 µl por pozo de PBS-A por 1 h a 37°C. La detección de BrdU incorporado en el DNA se realizó con un anticuerpo monoclonal anti-BrdU conjugado a peroxidasa (Roche). A cada pozo se agregaron 50 µl del anticuerpo en dilución 1:100 en PBS-A. La placa fue sellada con papel parafilm y se incubó a 37°C por 1 hora. Los pozos de la placa fueron lavados con ELISA Wash 3 veces y agregó 100 µl/pozo de un sustrato para la peroxidasa (OPD, Apéndice 14). La placa fue incubada por 30 minutos a T/A protegida de la luz. La reacción fue detenida agregando 50 µl/pozo de ácido sulfúrico 2.5 N y la absorbancia medida a 450 nm en un lector de placas de ELISA.

Los datos obtenidos fueron analizados utilizando un análisis de varianza de rangos para la comparación intragrupos, siendo la variable independiente los tratamientos, los cuales fueron los grupos de mosquitos inoculados con microorganismos y sus respectivos controles. Un análisis de varianza de 2 factores fue utilizado para la comparación intergrupos. Se tomó como 2 grupos de datos a los ensayos "*in vivo*" e "*in vitro*", cada grupo se conformó de los tratamientos con microorganismos y sus respectivos controles. En este caso se usó un análisis *post-hoc* de Tukey para determinar si las diferencias observadas de los resultados eran significativas.

5. Cultivo de Oocinetos de *P. berghei* que expresan constitutivamente GFP.

Ratones Balb/c fueron inoculados con fenilhidracina (0.25 ml a una concentración de 6 mg/ml). Al tercer día, los ratones fueron inoculados con 0.25 µl de sangre de ratón infectada con una cepa de *P. berghei* que tiene integrado a su genoma el plásmido PbGFP_{CON} el cual permite la expresión de la proteína verde fluorescente GFP (GFP por sus siglas en inglés) por lo que estos parásitos son denominados “parásitos PbGFP_{CON}” (Franke-Fayard *et al.*, 2004). La proteína verde fluorescente se encuentra integrada en el genoma en la unidad génica del RNA ribosomal c (c-rRNA) el cual no es esencial para el desarrollo del parásito. Esta cepa de *Plasmodium* expresa constitutivamente la proteína verde fluorescente y se encuentra bajo el control de un promotor fuerte proveniente del factor de elongación 1a (Franke-Fayard *et al.*, 2004). A tres días post-infección, la sangre de los ratones que presentaban síntomas de parasitemia (baja actividad, pelaje erizado, ojos cerrados, tendencia a agruparse) se obtuvo por punción cardíaca y se filtró en columnas de celulosa CFII, adicionando 6.5 ml de medio de cultivo RPMI suplementado con 15% de suero fetal bovino.

El medio de cultivo se mantuvo a una temperatura de 19-21°C por 24 h, con la finalidad de que se lleve a cabo la fecundación *in vitro* entre las fases sexuales del parásito. El cultivo recuperado fue lavado con PBS, y centrifugado a 2500 rpm una vez por 10 min a 19°C. El precipitado fue resuspendido en el volumen de sangre adecuado para obtener una concentración de 5×10^4 oocinetos/ml

(suplementada con 10% suero fetal bovino). (Rodríguez *et al.*, 2002)(Carter *et al.*, 2003)

6. Infección de mosquitos con oocinetos de *P. berghei*-GFP e incorporación de BrdU.

Para estos ensayos, los mosquitos fueron alimentados *ad libitum* en un algodón humedecido con una solución al 3% de azúcar conteniendo 100 µg/ml de BrdU desde el nacimiento, incluso después de la alimentación con sangre infectada con *P. berghei*-GFP. El algodón fue cambiado cada 24 h. Los mosquitos adultos fueron mantenidos en un fotoperíodo de 12/12 h de oscuridad/luz a 28 °C y en condiciones de humedad relativa de 80%.

El grupo control fue alimentado con sangre de ratón sano obtenida por punción cardíaca, mientras que el grupo experimental se alimentó con el cultivo de oocinetos de *P. berghei*-GFP en sangre de ratón a una concentración de 5×10^4 oocinetos/ml. La alimentación fue realizada a través de una membrana elaborada con parafilm y utilizando un alimentador artificial el cual mantuvo la sangre a 37°C utilizando un sistema circulatorio de agua.

Los mosquitos del grupo experimental fueron disecados en grupos de 40 diariamente durante 15 días. Los abdómenes y los intestinos fueron separados como descrito en la metodología 2, y se conservaron en cámaras húmedas. Los intestinos fueron revisados en microscopio de fluorescencia, en busca de oocinetos en las primeras 48 h u ooquistes en los días subsecuentes, a través de la detección de la GFP (proteína verde fluorescente). Estos mosquitos fueron divididos en dos grupos a partir del día 2 post-alimentación, el grupo de

resistentes, que no presentó ningún ooquiste; y el grupo de susceptibles, que presentaron al menos un ooquiste. Posteriormente se seleccionaron 3 abdómenes y 3 intestinos de cada grupo los cuales fueron preparados para ser procesados como se describió en la metodología 3 para la detección de incorporación de BrdU por medio de inmunofluorescencia. El resto de abdómenes e intestinos de cada grupo fueron utilizados para obtener su DNA por medio de extracción fenólica

7. Construcción de membranas de macroarreglo e identificación de las características de las muestras consideradas positivas

De una librería construida a partir del transcriptoma del mosquito *An. albimanus* se seleccionaron diferentes EST (Expressed Sequence Tag, por sus siglas en ingles). Un EST es una pequeña parte de un gen activo, hecho de cDNA. Cada EST tiene una descripción de acuerdo con el posible producto de la transcripción del cual deriva. Las descripciones fueron obtenidas de la base de datos InterPro, la cual es una base de datos que contiene descripciones de varias familias de proteínas, dominios y sitios funcionales, que pueden ser identificados en proteínas de función desconocida.

La selección de los EST de interés para el experimento se basó en que el posible producto tuviera un papel en la respuesta inmune del mosquito. Otro criterio usado para la selección de EST fueron los parámetros bioinformáticos. 1) La probabilidad de encontrar al azar la secuencia en la base de datos (valor e) con un valor mínimo de $e^{-5}=10^{-5}$ y 2) un valor mínimo (Score) de 40 dado el alineamiento de la secuencia de EST con las secuencias blanco en la base de datos. De un número aproximado de 651 EST se seleccionaron 174, más 9

secuencias obtenidas a partir de DNA genómico de mosquito, cuyas descripciones de sus transcritos se relacionaban con en la respuesta inmune. Después los EST y las secuencias seleccionadas se sometieron a amplificación por PCR (sección 9, Material y Métodos) y se fijaron con un orden establecido en una membrana de nitrocelulosa (sección 10 y sección 11, Material y Métodos). Las membranas con el DNA fijado fueron sometidas a hibridación (sección 13, Material y Métodos)

Después de la hibridación con la sonda marcada con BrdU, la cual fue obtenida como se describe en la sección 12 de Material y Métodos a partir de la digestión enzimática de DNA obtenido de mosquitos alimentados con BrdU e inoculados con levaduras de los ensayos *in vivo*, la membrana fue revelada como se describió en la estrategia 2 de la sección 14. Una vez obtenida la placa de radiografía, se creó una lista la cual fue ordenada en base a la intensidad arbitraria de la señal en la placa.

Para identificar y corroborar la identidad de las EST de los cuales se obtuvo una señal por la hibridación con la sonda, se realizó una búsqueda en la base de datos GDAV.

GDAV (Genome De-linked Anotation Viewer, por sus siglas en ingles) es una base de datos que sirve como una herramienta nueva para consultar anotaciones de secuencias descritas en especies de las cuales se tienen datos pero no se ha secuenciado el genoma. GDAV tiene anotadas cerca 5000 secuencias de EST de *An. albimanus* que se encuentran almacenadas en un servidor del Instituto de Salud Pública de México.

GDAV proporcionó la secuencia, descripción y alineamientos de EST con organismos cuyos genomas ya han sido secuenciados como *An. gambiae*, *Ae.*

aegypti y *D. melanogaster* además de proporcionar una clave y descripciones de la base de datos de InterPro.

8. Amplificación de fragmentos de DNA genómico de *An. albimanus* por medio de la reacción en cadena de la polimerasa para ser usadas como material de elaboración del macroarreglo.

La reacción en cadena de polimerasa se realizó en un volumen final de 25 μ l, el cual consistió de lo siguiente: 1 μ l de DNA genómico de *An. albimanus* a una concentración de 1.38 ng/ μ l, 1.2 μ l de una solución 50 mM de MgCl₂, 2.5 μ l de solución amortiguadora de reacción (500 mM KCl 100 mM Tris-Cl, pH 8.3) 10X, 1 μ l de una mezcla de deoxinucleótidos 2.5 mM (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0.5 μ l de cada uno de los oligonucleótidos diseñados (Tabla 5, sección Resultados) a una concentración 10 pM, 0.125 μ l de DNA Taq polimerasa 5U/ μ l (Invitrogen) y 18.175 μ l de agua miliQ estéril.

Ocho secuencias fueron amplificadas y 1 muestra adicional correspondiente al gen wingless (*wnt*) que fue donada gentilmente por el Dr. Javier Izquierdo. Las secuencias fueron utilizadas únicamente para el ensayo de macroarreglo donde se usó la técnica de fijado de DNA descrita en la sección 11 de Material y Métodos

9. Amplificación de fragmentos de DNA del transcriptoma de *An. albimanus* por medio de la reacción en cadena de la polimerasa para ser usadas como material de elaboración del macroarreglo.

La reacción en cadena de polimerasa se realizó en un volumen final de 20 μ l, el cual consistió de lo siguiente: una colonia de bacteria *E. coli* cepa DH5a

aislada se pica con un palillo estéril y fue disuelta en la mezcla de reacción, 1.2 µl de una solución 25 mM de MgCl₂, 2 µl de solución amortiguadora de reacción (500 mM KCl 100 mM Tris-Cl, pH 8.3) 10X, 0.2 µl de una mezcla de deoxinucleótidos 10 mM (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0.5 µl de cada uno de los pares de oligonucleótidos universales comerciales M13F(-20)(5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'), M13R (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') (Invitrogen) y M13F(-20)(5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'), T3(5'-GCAATTAACCCTCACTAAAGG-3')(Invitrogen) a una concentración 10pM, los pares corresponden para el plásmido PDNR_lib y el plásmido pBk-CMV, dependiendo del vector en el que se encontrara contenida la secuencia de interés, 0.125 µl de DNA Taq polimerasa 5U/µl (Invitrogen) y 15.98 µl de agua miliQ estéril.

Se amplificaron 174 secuencias las cuales fueron productos únicos. Las secuencias fueron visualizadas en geles de agarosa 1.5 %. Las secuencias obtenidas fueron utilizadas para ensayos de macroarreglo donde se usaron las técnicas de fijado de DNA descritas en las secciones 10 y 11 de Material y Métodos.

10. Dot blot en membranas de nitrocelulosa para la elaboración del macroarreglo

El método empleado para estos ensayos fue realizado de acuerdo a Ausube y cols. (1995). De las muestras de los mosquitos se tomó una cantidad de 1 µg o 500 ng del DNA en 200 µl de SSC 6X y fue fijado en una membrana de

nitrocelulosa. El tamaño de la membrana dependió del experimento realizado, y siempre fue cortada dejando 0.5 cm de borde para facilitar la manipulación.

La membrana de nitrocelulosa se sumergió en un recipiente limpio con SSC 20X (Apéndice 10) por lo menos 10 minutos. La membrana de nitrocelulosa se sumergió en SSC 6X (Apéndice 10) por lo menos 10 minutos. El DNA se desnaturalizó poniéndolo en un baño María de agua hirviendo o en un horno a 100 °C durante 10 minutos, inmediatamente después las muestras se enfriaron en hielo. La membrana de nitrocelulosa requería añadir un volumen igual de 20X SSC a cada muestra inmediatamente después de colocar las muestras en hielo.

Después de cargar las muestras en el molde y hacerlas pasar por la membrana, usando vacío, se colocó en una solución 1.5 M de NaCl / 0.5M NaOH durante 10 min, posteriormente fue trasferida a una solución 1M NaCl / 0.5 Tris-Cl, pH 7, durante 5 min a T/A. La membrana fue horneada a 80°C 1 hr y colocada entre 2 hojas de papel filtro (esto en caso de ser almacenarla). La membrana con el DNA fijado se utilizó para la hibridación que se describe en la sección 13 de Material y Métodos.

El molde usado en dot blot permitió fijar hasta 96 muestras en membranas de 8 X 12 cm. Los 93 EST seleccionados fueron colocados en la placa y las 3 muestras restantes fueron utilizadas para controles. El orden en el que fueron colocados cada uno de los EST en las membranas fue idéntico al orden en una placa de ELISA; 8 filas designadas con una letra de la "A" a la "H" y 12 columnas designadas con números del 1 al 12. El control positivo de hibridación fue DNA de mosquito sin tratamiento (posición H12). El control positivo de detección (posición G12) fue DNA con BrdU incorporado. El control negativo (posición C10) fue una

mezcla de los oligonucleótidos M13F (-20) y T3. Este control negativo fue colocado debido a que las secuencias usadas fueron productos de la reacción en cadena de polimerasa obtenidos en la sección 9.

11. Fijado de secuencias de DNA de *An. albimanus* en la membrana de nitrocelulosa con el uso de un replicador.

La siguiente técnica es una adaptación del protocolo de Dot Blot para DNA como estrategia alternativa de fijado de DNA en membranas de nitrocelulosa y fue utilizada para la colocación de muestras de los productos de PCR del transcriptoma de *An. albimanus* (sección 7 de Material y Métodos). Una membrana de nitrocelulosa de 8 X 12 cm fue humedecida en solución amortiguadora de citratos SSC 20X, por 10 min. Un total de 186 muestras obtenidas en la sección 8 y la sección 9 de Material y Métodos, fueron diluidas en solución amortiguadora de citratos SSC 3X a una concentración de 100 ng/μl y colocadas en placas de 96 pozos diseñadas para PCR. Las 186 muestras de DNA, productos de PCR, fueron desnaturalizadas usando NaOH 0.2 N a temperatura ambiente por 10 min. y puestas en hielo. El procedimiento de “sembrado” fue el siguiente: La membrana de nitrocelulosa se colocó sobre una placa de ELISA (posicionada boca abajo para servir de soporte), a la cual fue adaptada a la base copiadora OmniTray para replicadores marca NUNC. Las muestras fueron colocadas con un replicador de 96 pines marca NUNC. Las coordenadas a utilizar fueron seleccionadas y se presionó ligeramente el replicador contra la membrana por 30 seg. Las replicas de cada muestra fueron realizadas utilizando coordenadas diferentes. La membrana se colocó en una solución 1.5 M de NaCl / 0.5M NaOH durante 10 min,

posteriormente fue trasferida a una solución 1M NaCl / 0.5 Tris-Cl, pH 7, durante 5 min a T/A. La membrana fue horneada a 80°C 1 hr y colocada entre 2 hojas de papel filtro (esto en caso de requerir almacenarla). La membrana con el DNA fijado se utilizó para una hibridación como está descrito en la sección 13 de Material y Métodos

12. Sonda de DNA marcada con BrdU

Para la generación de sondas de DNA marcado con BrdU, se utilizó 20 µg DNA obtenido por extracción fenólica de los experimentos de incorporación de BrdU *in vivo*, de mosquitos retados con levadura o micrococos. Veinte microgramos de DNA fueron digeridos con la enzima de restricción *Rsa1*, la cual genera productos de doble cadena con extremos romos. El DNA fue incubado durante 2 horas a 37°C en la mezcla de reacción junto con la enzima de restricción. La digestión fue verificada y visualizada por medio de una electroforesis en un gel de agarosa 1% con un marcador de peso molecular de fragmentos de fago lambda digeridos con *HindIII* (Invitrogen).

13. Hibridación de sondas marcadas con BrdU

Previo a la hibridación, las membranas obtenidas de la sección 10 ó 11 de Material y Métodos fue humedecida en SSC 2X. La membrana fue colocada en un tubo de hibridación, marcando el lado en el que se fijó el DNA. Para la prehibridación, se añadieron 10 ml de solución SPH (Apéndice 9; 1 ml de solución por cada 10 cm² de la membrana) y se incubó durante 3 horas a 65°C con

rotación. Posteriormente, se desnaturalizó por calor la sonda de DNA marcada con BrdU generada por cortes enzimáticos (sección 12, Material y Métodos), en baño María de agua hirviendo durante 10 min e inmediatamente se colocaron en hielo. Con el menor espacio de tiempo posible, se añadieron 10 ml de la sonda recién preparada a una concentración de 2 µg/ml en SPH y se incubó durante toda la noche a 65°C. La membrana se lavó con 10 ml de SSC 2X a T/A (Apéndice 10); posteriormente fue lavada con un volumen igual de SDS al 0.1% en SSC2X a 65 °C, realizando 3 cambios de la solución cada 5 min (Guesdon; 1992). Terminados los lavados, la membrana se utilizó directamente para la detección inmunoenzimática del DNA hibridado, mediante anticuerpos anti-BrdU conjugados a peroxidasa. La señal fue detectada mediante la utilización de quimioluminiscencia y placas radiográficas, como se describió anteriormente.

14. Detección de DNA marcado con BrdU en membranas de nitrocelulosa

Para la detección de DNA marcado con BrdU o fragmentos de la sonda unida por hibridación al DNA fijado en membranas de nitrocelulosa como se describe en la sección 10 o sección 11 de Material y Métodos, todo el procedimiento fue realizado en agitación constante, en contenedores de plástico a temperatura ambiente, ó a 37°C. Es importante no dejar secar la membrana en ningún momento, sobre todo si se pretende volver a utilizarla para alguna re-incubación. El volumen de las soluciones de lavado y de bloqueo fue de 1ml/cm² y 0.2 ml/cm² respectivamente. Se emplearon dos estrategias:

Estrategia 1: Después de la transferencia e inmovilización del DNA a una membrana de nitrocelulosa, ésta fue lavada tres veces con Tween-20 al 0.1% en PBS, realizando cambios de la solución cada 10 minutos. Las membranas se incubaron con solución bloqueadora de leche descremada al 5% (Apéndice 5) recién preparada, por 1 h, o se dejó a 4 °C toda la noche. Posteriormente, la membrana se lavó con Tween-20 al 1% en PBS durante 10 minutos. Las membranas fueron incubadas con un anticuerpo monoclonal anti-BrdU conjugado a peroxidasa, 1/1000 o 1/2500 en solución de leche descremada al 1% (Apéndice 6). La membrana se incubó durante 2 h a T/A o se dejó durante toda la noche a 4°C.

El exceso de solución bloqueadora fue retirado y la membrana se lavó con Tween-20 al 0.1% en PBS tres veces con cambios cada 10 min. La solución de lavado fue retirada y sobre la membrana se colocó una hoja de acetato comercial para impresión laser (con el lado del DNA hacia arriba). La señal en la membrana fue revelada utilizando un kit para quimioluminiscencia (Perkin-Elmer). Después de incubar la membrana durante 1 min con el revelador, se retiró el exceso fue retirado y se colocó una hoja de acetato para dar una protección plástica a la membrana. La señal en las membranas fue detectada con el uso de placas de radiografía (Kodak tipo X-Omat y Kodak tipo Biomax film). El tiempo mínimo de exposición fue de 30 seg. Las exposiciones fueron repetidas aumentando el tiempo de forma variable hasta por 5 min para tratar de obtener una señal óptima.

Estrategia 2: Esta estrategia fue realizada de acuerdo al protocolo descrito por Guesdon (1992). Brevemente, después de la transferencia e inmovilización del DNA a una membrana de nitrocelulosa se lavó brevemente la membrana con

Tween 20 al 1% en TBS (Apéndice 7). La membrana se incubó 15 minutos con 1% BSA y 1% Tween 20 en TBS (solución bloqueadora). Posteriormente, se incubó la membrana con el anticuerpo anti-BrdU acoplado a peroxidasa en dilución 1/1000 en solución bloqueadora, a T/A o toda la noche a 4 °C. La membrana fue lavada tres veces con TBST, cambiando la solución cada 10 minutos. La membrana se incubó durante 2 min con la solución de magnesio (Apéndice 8) e inmediatamente después le fue colocada una hoja de acetato para realizar la detección por luminiscencia como se describió anteriormente.

15. Búsqueda bioinformática de genes vecinos para enriquecer el macroarreglo.

Brevemente, a partir del resultado del experimento piloto del macroarreglo, obtenido utilizando la fijación de DNA descrita en la sección 10 de Material y Métodos, fueron elegidos los 15 EST que presentaron la señal de hibridación más alta. Después de ubicar las secuencias en el genoma de *An. gambiae* usando un tBlastx, las estructuras intrón-exón fueron modeladas con Exonerate, y mediante el visor de Vectorbase se analizó la vecindad de genes que se presentaron en su genoma.

Debido a la extensión de la amplificación de genes en los casos donde se ha reportado amplificación génica (Claycomb y Orr-Weaver, 2005), nosotros establecimos un límite de búsqueda de genes vecinos de 100 Kb. Las secuencias de los genes vecinos en *An. gambiae* fueron obtenidos con la herramienta Biomart, la cual se encuentra disponible en línea (www.biomart.org). Con las

secuencias recuperadas del genoma de *An. gambiae*, se realizó una búsqueda en la base de datos del transcriptoma de *An. albimanus* utilizando tBlastx. Las secuencias obtenidas fueron analizadas con Exonerate, lo que permitió observar el modelado intrón-exón de estos genes.

RESULTADOS

A continuación se describe el análisis cualitativo de los resultados de la síntesis de DNA en tejidos de mosquitos *An. albimanus* inducida después de un reto inmune. Este análisis se realizó mediante experimentos de inmunofluorescencia, lo que permitió la identificación de los tejidos que responden al reto inmune incorporando BrdU en sus núcleos celulares.

Como se describió en Material y Métodos, el análisis fue realizado inoculando mosquitos *An. albimanus* con diferentes microorganismos, tanto en experimentos *in vitro* como *in vivo*.

Asimismo, se añaden resultados preliminares que nos alientan a implementar una estrategia bioinformática (más sencilla y específica), que nos permitirá identificar los genes que están siendo amplificados durante la síntesis de DNA inducida después de un reto inmune.

Demostración de incorporación de BrdU en tejidos de An. albimanus in vivo, después de un reto inmune, mediante ensayos de inmunofluorescencia

La identificación de los tejidos del mosquito que incorporaron BrdU después de un reto inmune fue realizada por medio de la unión de anticuerpos específicos con BrdU, los cuales estaban conjugados a fluoresceína (Sección 3, Material y Métodos). La intensidad de incorporación dependió del tipo de microorganismo utilizado para inducir la respuesta inmune. En los ensayos *in vitro*, se observó la incorporación del BrdU en epitelios de las membranas pleurales, células

pericárdicas, células epiteliales, células progenitoras del ovario y células del cuerpo graso. Por otro lado, en los ensayos de incorporación de BrdU *in vivo*, la señal fue observada en células del cuerpo graso y en células pericárdicas. Los ensayos realizados con virus Dengue (únicamente *in vivo*) mostraron resultados similares. La Tabla 1 presenta un resumen de la intensidad, medida de forma cualitativa, de incorporación de BrdU en los diferentes tejidos durante estos ensayos.

En los experimentos de incorporación *in vivo* de BrdU, se utilizó como control el DNA de mosquitos *An. albimanus* tratados solo con medio de cultivo RPMI. En todos los tratamientos se detectó incorporación de BrdU en el núcleo de células de cuerpo graso, aunque en diferente grado. El cuerpo graso es un tejido dinámico el cual tiene múltiples funciones metabólicas, la mayor parte de las proteínas de la hemolinfa son sintetizadas en este tejido además presenta funciones de almacenamiento de proteínas, lípidos y carbohidratos. La función más importante que realiza para el sistema inmune es la síntesis de péptidos antimicrobianos los que secreta a la hemolinfa (Roma *et al*, 2010).

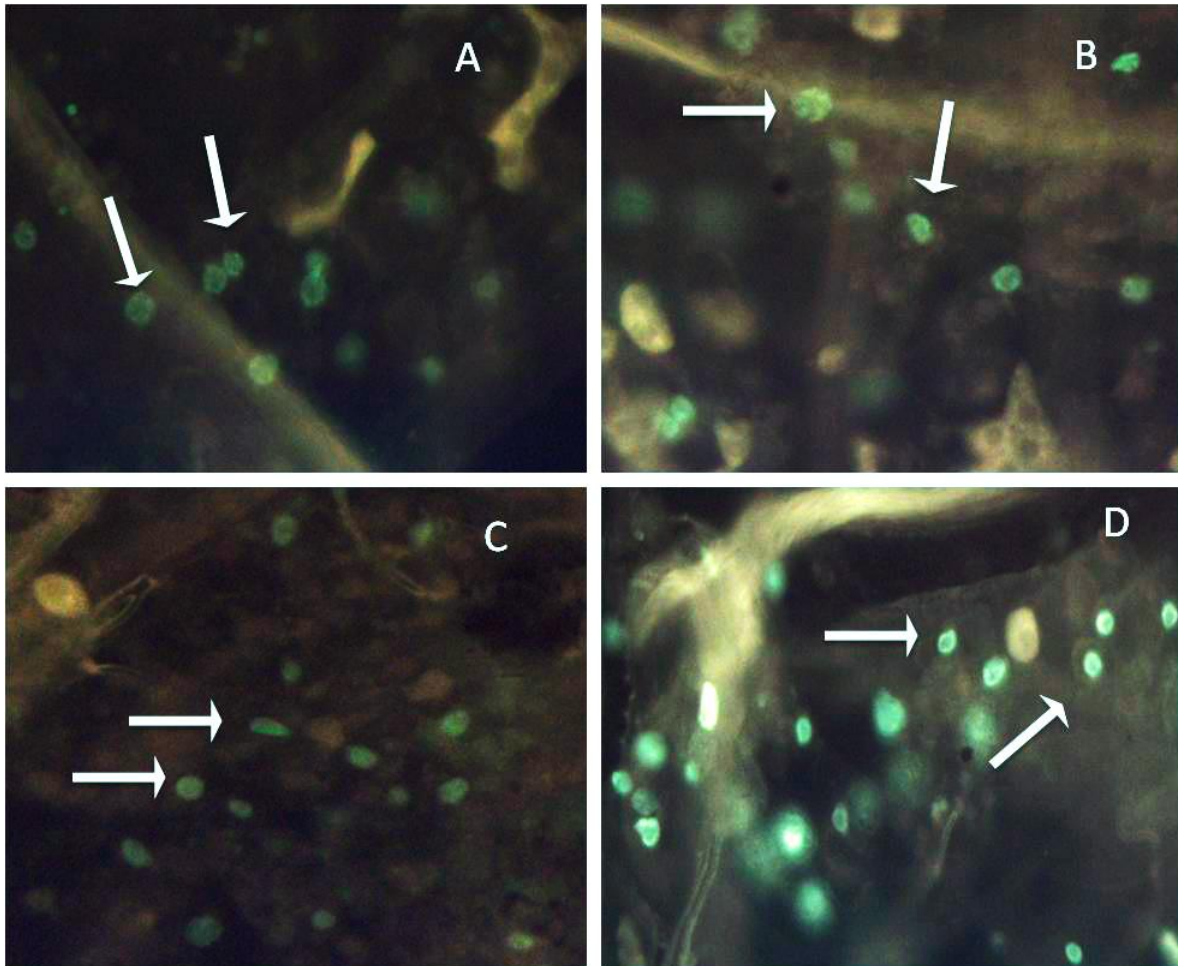


Figura 3. Inmunofluorescencia de la incorporación de BrdU *in vivo* en tejidos de *An. albimanus* después de un reto inmune con diferentes microorganismos. El análisis por inmunofluorescencia de la región abdominal mostró incorporación de BrdU en los diferentes ensayos *in vivo*. Ante los diferentes estímulos, la señal fluorescente se presentó en el cuerpo grasoso, uno de los principales tejidos del sistema inmune del mosquito. Los controles tratados con RPMI (A) mostraron señal escasa en células de cuerpo grasoso, la cual siempre fue menor a la observada en los grupos inoculados con *S. cerevisiae* (B), con *M. luteus* (C), o con *S. marcescens* (D). Microscopia de fluorescencia 40X.

Tabla 1. Evaluación cualitativa (inmunofluorescencia) de incorporación de BrdU en los diferentes tejidos de *An. albimanus* después de un reto inmune.

Estímulo/tejido	Células pericárdicas	Membrana pleural	Células epiteliales del ovario	Cuerpo graso	Ovarios
Gram positiva	In vitro (+++)	(+++)	(++)	(++)	(+)
<i>M. luteus</i>	In vivo (++)	(-)	(-)	(++)	(-)
Levaduras	In vitro (+)	(++)	(-)	(++)	(+)
<i>S. cerevisiae</i>	In vivo (+)	(-)	(-)	(++)	(-)
Gram negativa	In vitro (+)	(++)	(-)	(++)	(+)
<i>S. marcescens</i>	In vivo (++)	(-)	(-)	(++)	(-)
Virus Dengue	In vivo (+)	(-)	(+)	(++)	(-)

El corazón del mosquito (parte abdominal del vaso dorsal) está formado por un endotelio simple, células musculares contráctiles y células pericárdicas (también llamadas nefrocitos). Las células pericárdicas son en parte responsables de la composición de la hemolinfa, debido a que son capaces de tomar y regresar moléculas a la hemolinfa (Chapman, 1998). En la Figura 4 se muestra la comparación de incorporación de BrdU en células pericárdicas de ensayos *in vivo*. En las muestras control (inoculados con RPMI), no se observó incorporación de BrdU en las células pericárdicas.

Las ubicaciones del cuerpo graso y el corazón dentro del mosquito se muestran en un esquema que se encuentra en el Apéndice 18

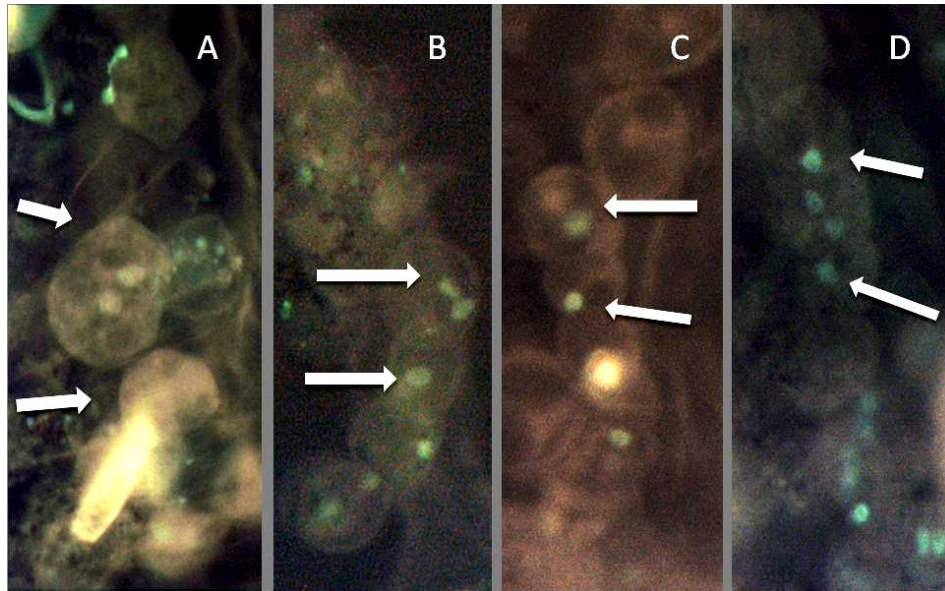


Figura 4. Inmunofluorescencia de la incorporación de BrdU *in vivo* en células pericárdicas ante un reto inmune. Los controles inoculados con RPMI no presentaron incorporación de BrdU (A). La inoculación con *S. cerevisiae* (B), *M. luteus* (C) o *S. marcescens* (D), indujo incorporación de BrdU en diferentes tejidos, siendo las células pericárdicas (flechas) el común para los diferentes estímulos. Microscopia de Fluorescencia 40X.

Adicionalmente, nuestro grupo ha reportado que algunos mecanismos oxidativos pueden ser en parte responsables de la eliminación de virus Dengue en mosquitos no vectores (Ramos–Castañeda *et al.*, 2008). El interés en el mecanismo con el cual el virus es eliminado de los mosquitos no vectores, como el caso de *An. albimanus*, nos llevó a realizar algunos experimentos piloto. El virus inactivado por medio de la exposición a luz UV fue diluido en una solución de medio de cultivo Schneider suplementado con suero bovino fetal. Este mismo medio de cultivo con suero fue usado como control en estos ensayos piloto como se describió en Material y Métodos. La Figura 5 muestra la comparación entre el cuerpo graso y los corazones de los mosquitos que fueron inoculados con las partículas virales inactivadas. De manera interesante, únicamente las células pericárdicas de corazones provenientes de mosquitos inoculados con virus mostraron incorporación de BrdU.

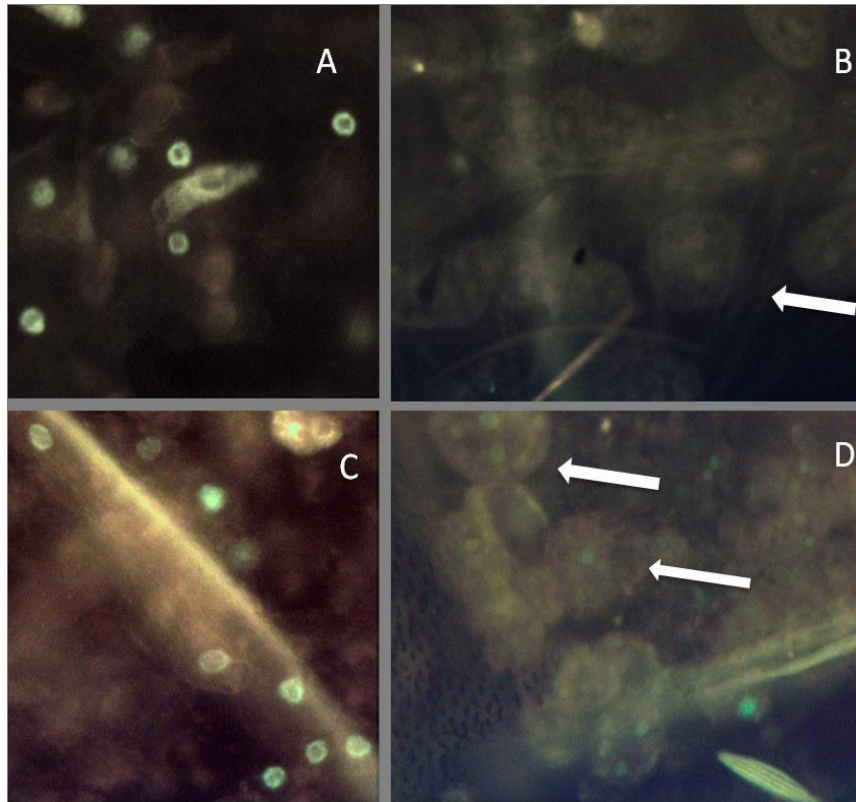


Figura 5. Inmunohistoquímica de la incorporación de BrdU *in vivo* en *An. albimanus* inoculados con virus Dengue. El inoculo de virus fue preparado en medio Schneider suplementado con suero fetal bovino, como se describe en Material y Métodos. Los mosquitos inoculados con virus Dengue (C, D) mostraron menor señal en comparación con los otros microorganismos utilizados (Fig. 3). Sin embargo, en comparación con los grupos control inoculados con medio Schneider suplementado con suero fetal bovino (A, B), la señal fue mayor en el caso del cuerpo graso (C). En el caso del corazón, los estimulados con virus si presentaron señal, a diferencia de los controles que siempre fueron negativos (B). Las células pericárdicas se indican con flechas. Microscopia de 40X.

Demostración de incorporación de BrdU en tejidos de An. albimanus in vitro, después de un reto inmune, mediante ensayos de inmunofluorescencia.

La Figura 6 muestra la comparación de BrdU incorporado al núcleo de células epiteliales, que forman parte de las membranas pleurales, en mosquitos inoculados con diferentes microorganismos. La mayor cantidad de células con marca fue observada en abdómenes de mosquitos inoculados con *M. luteus*.

Durante el análisis de las muestras, se observó que la incorporación de BrdU fue de mayor o menor intensidad, lo cual dependió del tipo de microorganismo utilizado. El estímulo realizado con *Micrococcus* indujo siempre una mayor cantidad de células marcadas en los diferentes tejidos.

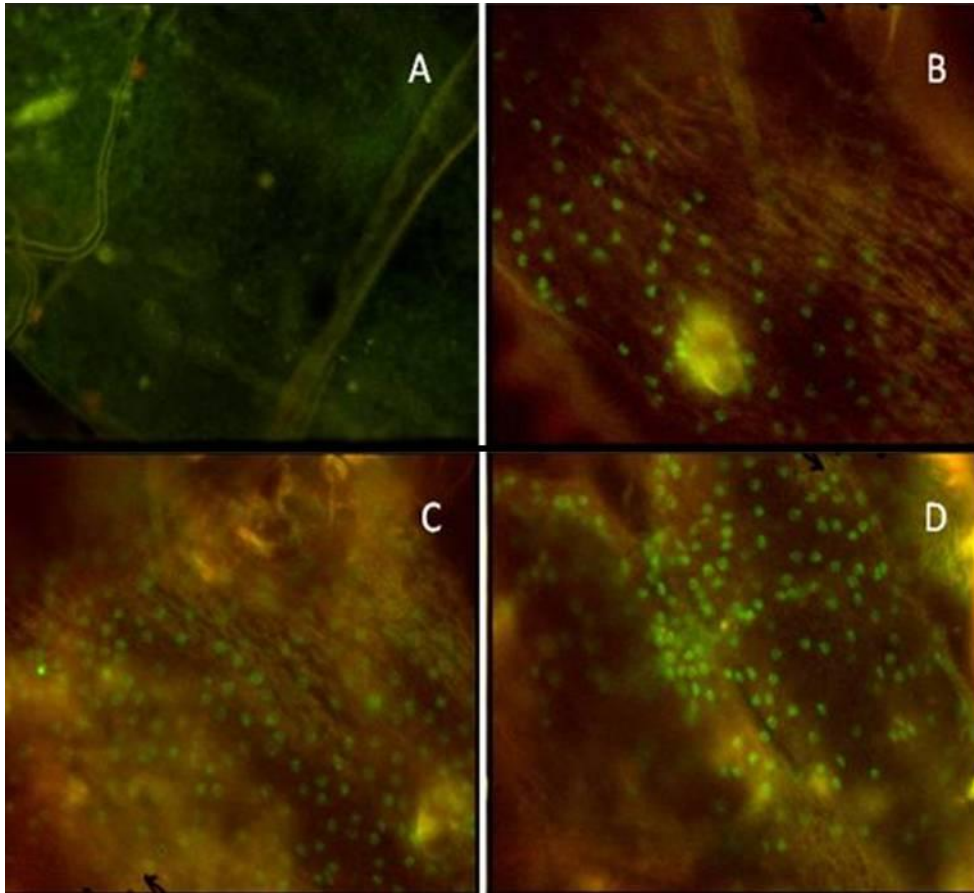


Figura 6. Inmunofluorescencia de la incorporación de BrdU *in vitro* en células epiteliales de las membranas pleurales de *An. albimanus*. La epidermis en las membranas pleurales está formada por una monocapa de células epiteliales. Ante los diferentes tratamientos con microorganismos (todos inactivados por calor) como *S. cerevisiae* (B), *M. luteus* (C), *S. marcescens* (D), se observó una señal fluorescente intensa en los núcleos de éste tejido, debida a la incorporación de BrdU. En los controles inoculados con RPMI (A) se puede observar una clara diferencia en cuanto al la cantidad de células marcadas, siendo siempre mucho menor en estas muestra comparado con los diferentes tratamiento.-Microscopia de 20X.

Inmunohistoquímica de la incorporación de BrdU in vivo durante la infección con P. berghei.

Como se mencionó en Material y Métodos, en el grupo de trabajo contamos con oocinetos de *P. berghei* que ha sido modificado genéticamente para expresar la GFP, y con una cepa de mosquitos susceptible y otra resistente a la infección con éste parásito (Hernández-Martínez *et. al.* Datos no publicados). Con estas herramientas se llevaron a cabo experimentos comparativos entre los mosquitos que presentaron el desarrollo de ooquistes (susceptibles) en el intestino, y los que no presentaron ningún ooquiste (resistentes). La inmunofluorescencia se realizó como se describió en la sección 3 de Material y Métodos.

Esta cepa genéticamente modificada expresa la GFP durante todo su ciclo de vida. En la figura 7 A-B, es mostrada la fase de oocineto de *P. berghei*-GFP presente en el lumen del intestinos del mosquito *An. albimanus*. En la cepa susceptible el oocineto sigue su desarrollo normal hasta ooquiste, el cual es fácilmente visto con microscopía de fluorescencia. En la cepa resistente, debido a que los parásitos mueren, dejan de expresar la GFP y una fluorescencia residual de color naranja-amarillo puede ser identificada.

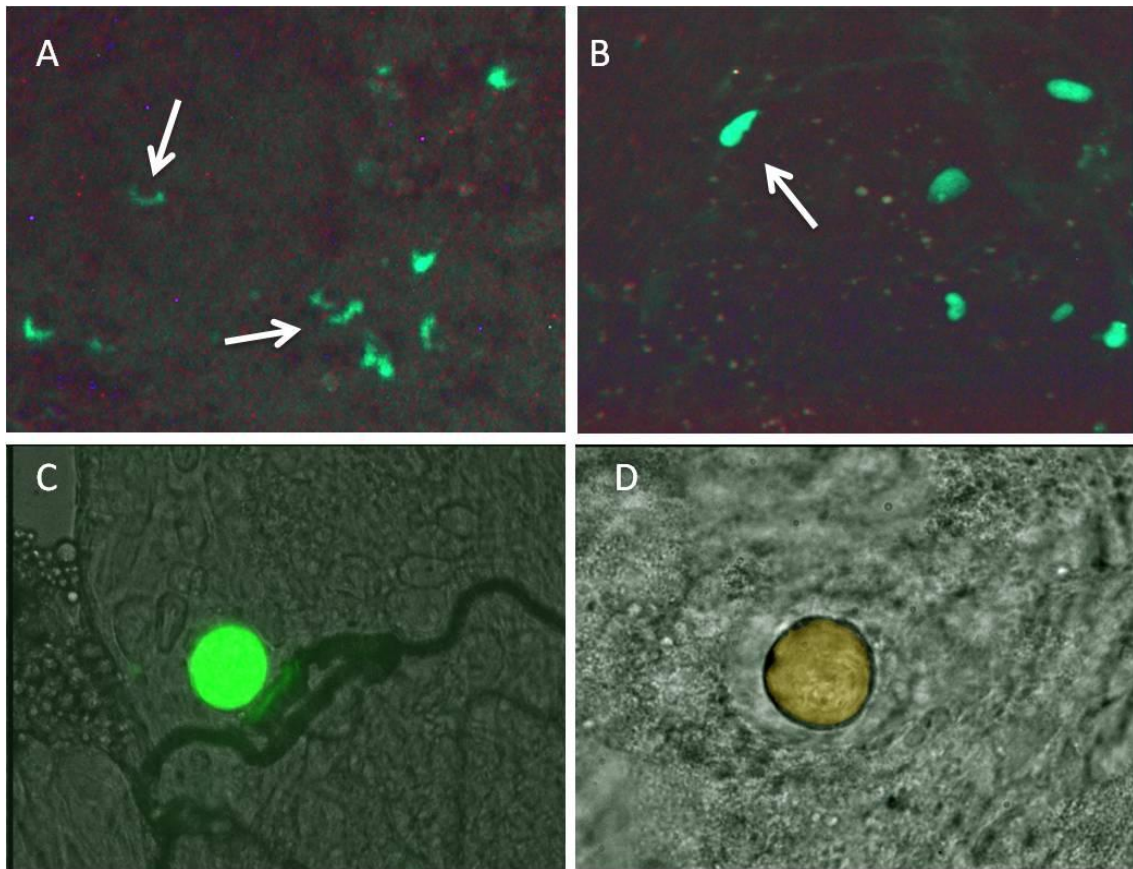


Figura 7.- Detección de parásitos *P. berghei* que expresan GFP en el intestino de *An. albimanus* A) Oocinetos de *P. berghei* (señalados con las flechas) con su forma característica de media luna fueron observados en el lumen del intestino durante las primeras 48 h post-alimentación (10X). B) Magnificación de A, donde se aprecia con más detalle la forma ovalada de los oocinetos y una cierta polaridad en su morfología (40X). C) Pasadas 48 h, los parásitos se presentan en forma de ooquiste joven, el cual continúa expresando la GFP (100X). D) En la cepa resistente, algunos parásitos logran llegar hasta la fase de ooquiste joven, el cual al morir presenta una fluorescencia remanente de color naranja-amarillo (100X). Microscopia de fluorescencia.

En la figura 8 se muestra un panel de imágenes con la inmunohistoquímica de la incorporación de BrdU en mosquitos en los que fue observada la formación de ooquistes (cepa susceptible). En los días 3 y 5 post infección, la incorporación de BrdU en cuerpo graso fue evidente además de una muy escasa señal en el intestino medio (en ocasiones no detectada). En los controles solo algunas muestras llegaron a presentar señal muy escasa en el cuerpo graso, pero nunca en el intestino.

En la figura 9 se muestra la incorporación de BrdU en días posteriores (7 días post-alimentación), en donde fue posible confirmar lo observado al día 5 en el intestino medio con mejor claridad. En el día 9 post-infección los mosquitos susceptibles mostraron un incremento en la incorporación de BrdU principalmente en el intestino medio, y en el día 11, a diferencia de la cepa resistente, aún se lograron observar abundantes núcleos con la señal de BrdU incorporado (principalmente en el cuerpo graso).

En la figura 10 se muestra la incorporación de BrdU en la cepa de mosquitos que fue resistente a la infección con *P. berghei*. A diferencia de la cepa resistente, la incorporación de BrdU fue más rápida y abundante en estas muestras, tanto en el cuerpo graso como en el intestino medio. Desde el día 3, la incorporación de BrdU pudo ser observada de manera abundante en el cuerpo graso y el intestino medio. En la figura 11 se muestran los cambios a los 7, 9 y 11 días post-alimentación. Al día 7, la señal continuó siendo muy intensa, sin embargo ya para el día 9 está comenzó a disminuir a niveles prácticamente indetectables para el día 11. En todos estos experimentos de infecciones con *P. berghei*, fue evidente que la incorporación de BrdU se presentó de manera más

clara en el cuerpo graso e intestino (este último antes no visto), a diferencia de lo observado con otros microorganismos, y que esta incorporación fue diferencial entre la cepa susceptible y resistente.

La Tabla 2 muestra un resumen de la incorporación de BrdU al DNA de ambas cepas, observada del día 3 al día 11 post alimentación, donde de manera cualitativa se le dio 1 cruz a una señal baja, 3 cruces a la máxima señal observada y 2 guiones cuando no se observó señal en el tejido

Tabla 2. Evaluación cualitativa (inmunofluorescencia) de incorporación de BrdU en diferentes tejidos de *An. albimanus* después de alimentación con sangre infectada con *P.berghei*-GFP.

Cepa/día	Intestino	Cuerpo graso
Resistente/3	++	++
Susceptible/3	--	++
Resistente/5	++	++
Susceptible/5	--	++
Resistente/7	+++	++
Susceptible/7	+++	++
Resistente/9	--	--
Susceptible/9	++	++
Resistente/11	--	--
Susceptible/11	++	++

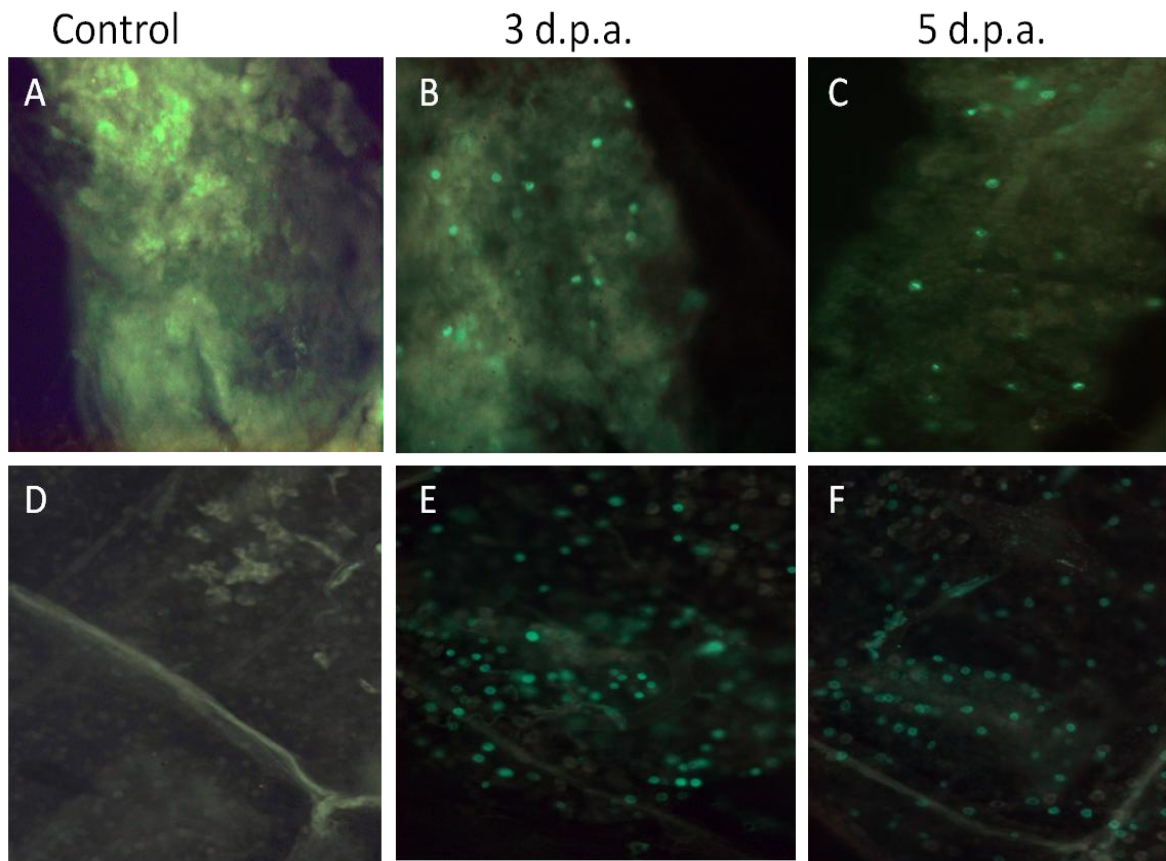


Figura 8.- Inmunofluorescencia de la incorporación de BrdU en mosquitos susceptibles a la infección con parásitos *P. berghei* en los primeros días post-alimentación. En los primeros días post-alimentación con sangre infectada, en términos generales la señal fue baja pero detectable sobre todo en el cuerpo graso. A-C) Intestinos mostrando el patrón de incorporación de BrdU en núcleos celulares (10X). D-F) cuerpo graso de los mosquitos con la señal de BrdU en el núcleo de sus células (20X). En los días 3 y 5 post-alimentación la incorporación de BrdU es detectable en cuerpo graso y muy escasa en el intestino medio A y D) Grupo control de mosquitos alimentados con BrdU y con sangre normal (sin parásitos).

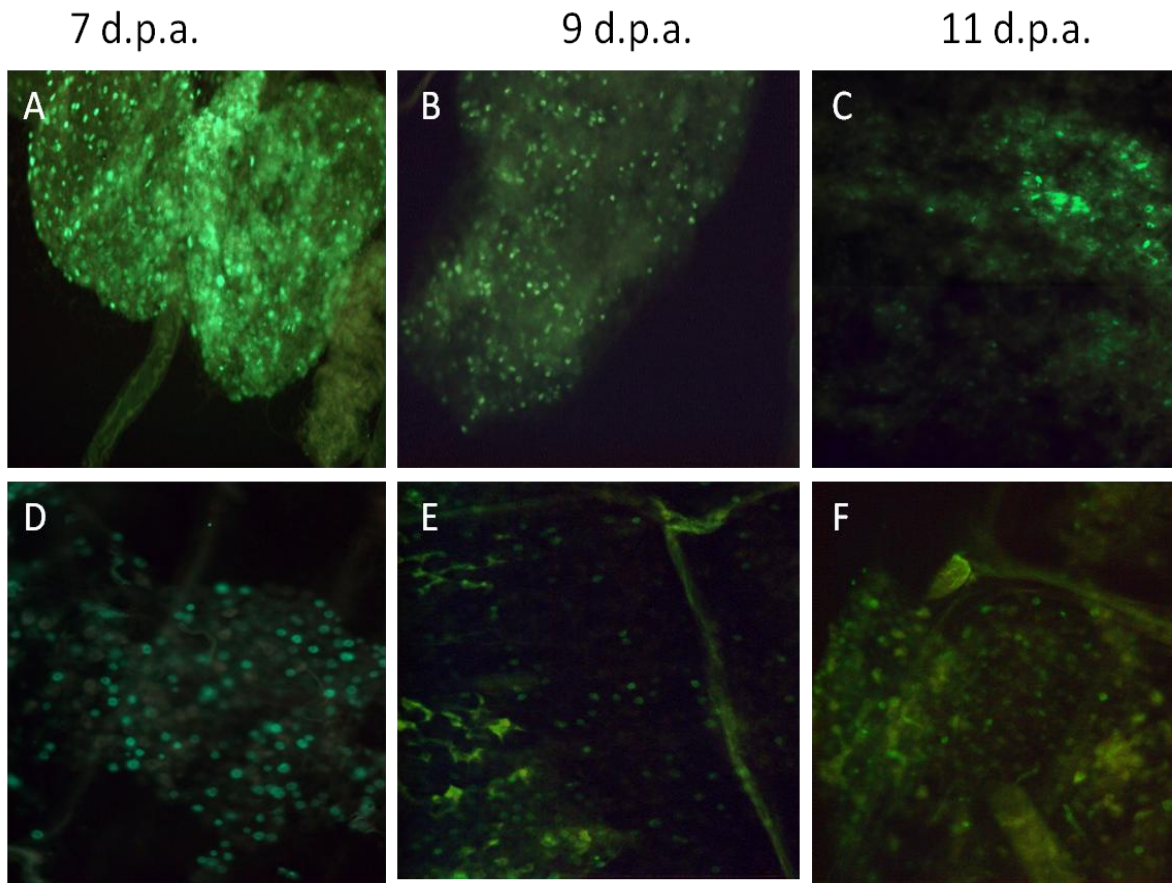


Figura 9.-Inmunofluorescencia de la incorporación de BrdU en mosquitos susceptibles a la infección con parásitos *P. berghei* en los últimos días post-alimentación. La señal de BrdU incorporado fue más evidente e intensa entre el 7^o y 9^o día post-alimentación en la cepa susceptible, posteriormente se observa una disminución en el número de núcleos marcados. A-C) Intestinos mostrando el patrón de incorporación de BrdU en núcleos celulares (10X), donde se observa una intensa incorporación a partir del día 7 post-alimentación, la cual aún es posible detectar hasta el día 11. D-F) Cuerpo graso de los mosquitos susceptibles con detección de la señal de BrdU en el núcleo de sus células (20X), en los que se aprecia una de intensidad baja y detectable. Cada par estomago-carcasa corresponde al día post alimentación en las que fue hecha la inmunohistoquímica.

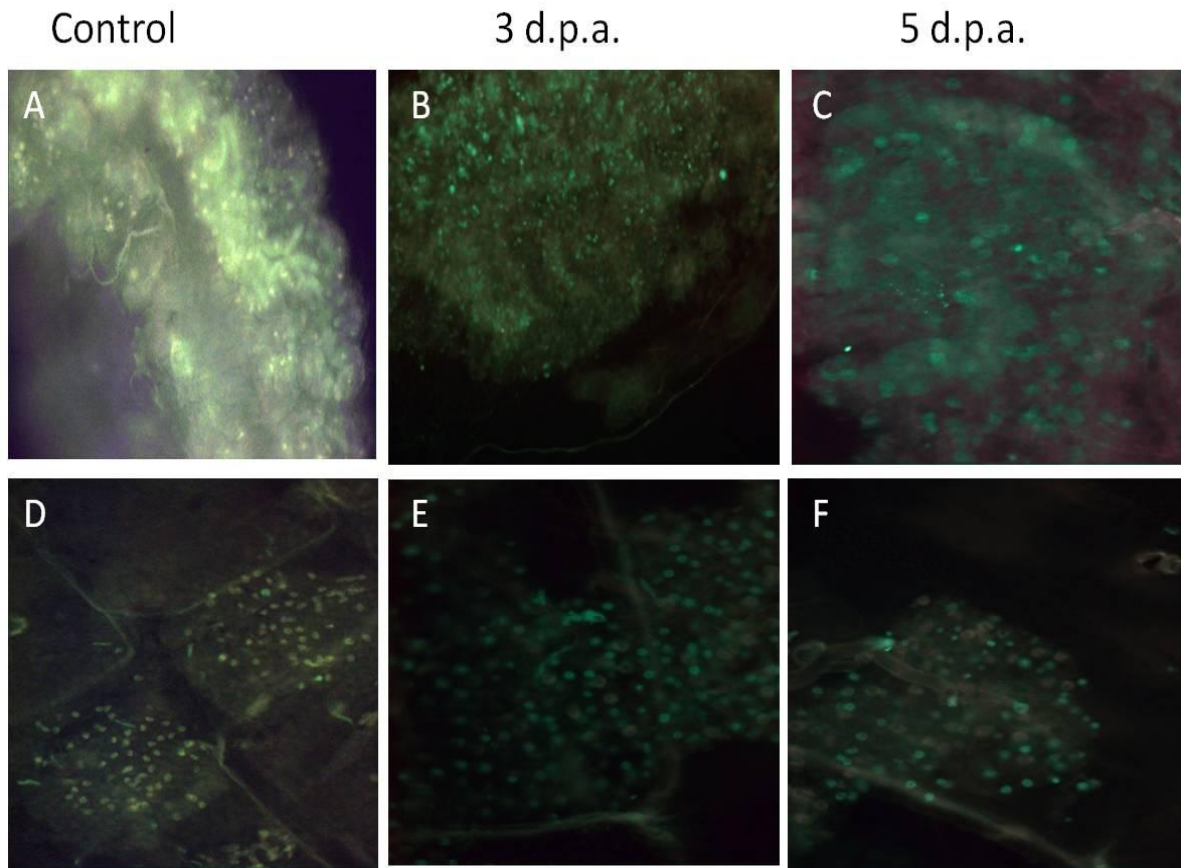


Figura 10.- Inmunofluorescencia de la incorporación de BrdU en mosquitos resistentes a la infección con parásitos *P. berghei*. A-C) Intestinos de mosquitos resistentes a la infección, en los cuales se puede apreciar una intensa incorporación de BrdU desde el tercer día post-alimentación con sangre infectada. D-F) Cuerpo graso de mosquitos en los que se observa gran número de núcleos incorporando BrdU desde el tercer día. A y D) grupo control, mosquitos alimentados con BrdU y sangre normal. A-C) 10X; D-F) 20X.

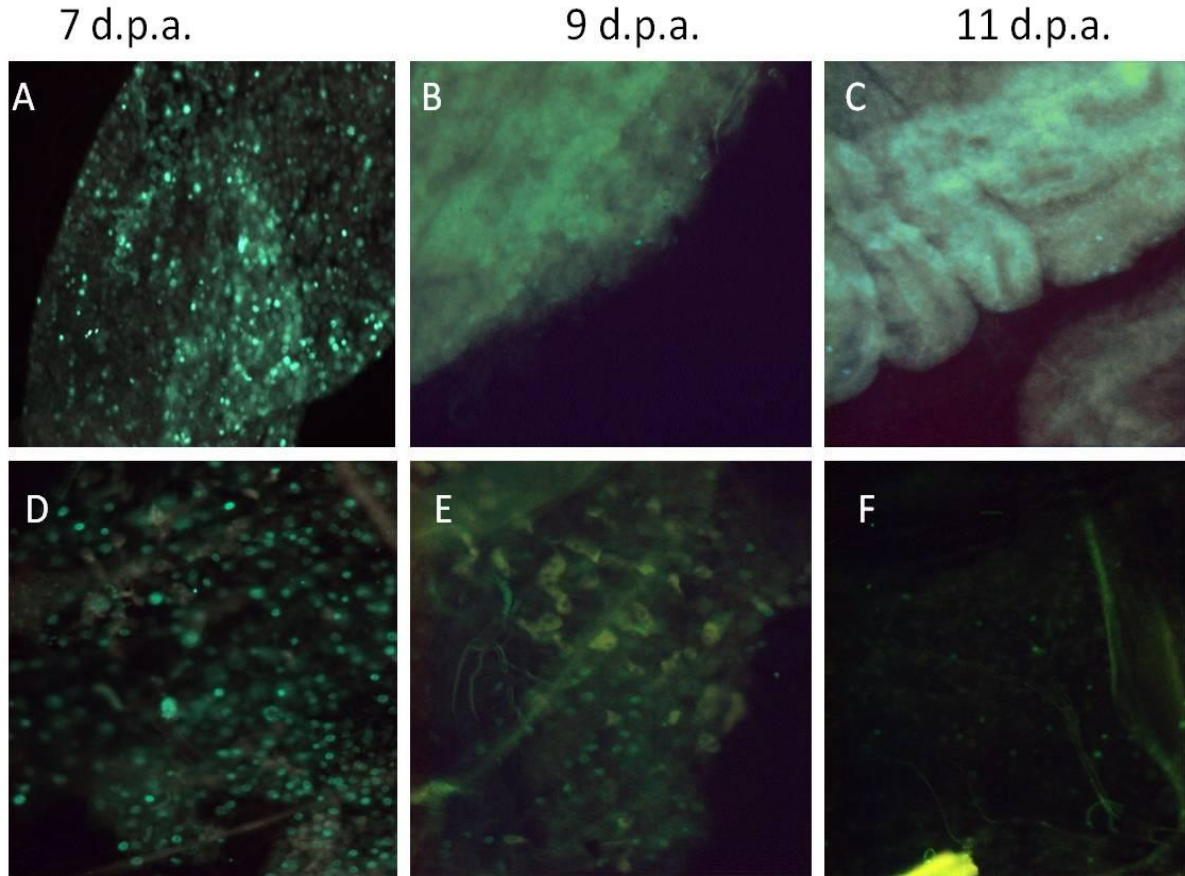


Figura 11.- Inmunofluorescencia de la incorporación de BrdU en mosquitos resistentes a la infección con parásitos *P. berghei*. A diferencia de los resultados obtenidos en mosquitos de la cepa susceptible, en estos ensayos la incorporación de BrdU fue detectada solo hasta el día 7, con una señal muy escasa en cuerpo graso y nula en intestinos al día 9. A-C) Intestinos de mosquitos resistentes, en los cuales se puede apreciar la fluorescencia en los núcleos celulares. D-F) Cuerpo graso de mosquitos en los que se aprecia la señal fluorescente en sus núcleos celulares de incorporación de BrdU. A-C) 10X; D-F) 20X.

Cuantificación relativa de la incorporación de BrdU in vitro e in vivo en mosquitos tratados con distintos estímulos.

La cuantificación relativa de incorporación de BrdU al DNA fue realizada por medio del método de ELISA (sección 4, Material y Métodos). Cada ensayo fue realizado por quintuplicado. Para las evaluaciones *in vitro*, las muestras de DNA obtenidas de los cultivos de abdómenes de mosquitos inoculados con los distintos microorganismos fueron analizadas. La inducción de incorporación de BrdU en mosquitos *An. albimanus* se realizó con *M. luteus*, *S. marcescens* y *S. cerevisiae*. La incorporación de BrdU evaluada por ELISA confirmó las observaciones realizadas por detección de inmunofluorescencia. La intensidad de incorporación de BrdU dependió del tratamiento suministrado a los mosquitos.

En el caso de la incorporación de BrdU *in vitro*, las muestras control para los ensayos de ELISA consistieron en lo siguiente: una muestra de DNA proveniente de abdómenes de mosquitos no inoculados ni tratados con BrdU fue utilizada como blanco para calibrar el sistema (dato no mostrado). El DNA de abdómenes de mosquitos sin inoculación pero cultivados en presencia de BrdU fue empleado como muestra control del proceso de disecación. Finalmente, el DNA proveniente de abdómenes cultivados en presencia de BrdU, de mosquitos inoculados solamente con RPMI, fue utilizado como control del daño causado por la inoculación. En todos los casos, los controles mostraron menor incorporación de BrdU que los inoculados con microorganismos.

Incorporación relativa de BrdU en ensayos *in vitro*

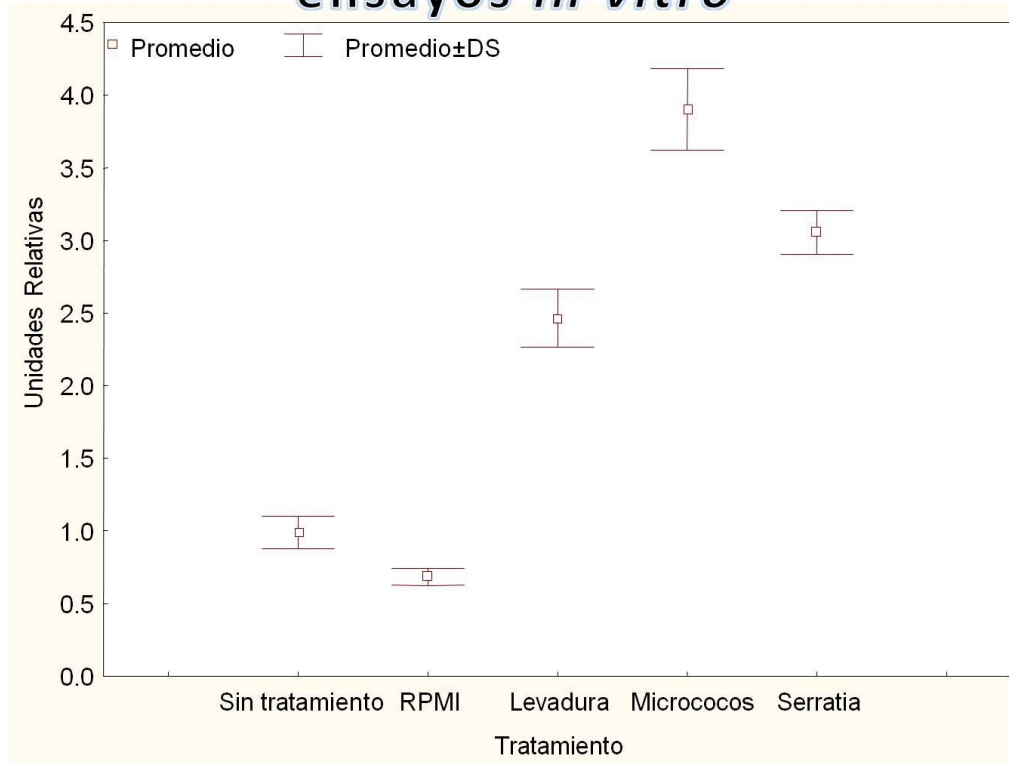


Figura 12.- Cuantificación por ELISA de la incorporación *in vitro* de BrdU en abdómenes de *An. albimanus* retados con diferentes estímulos antigénicos. La incorporación de BrdU fue medida en un ensayo de ELISA a una absorbancia de 450 nm. La evaluación fue realizada en 2 ensayos independientes de abdómenes en cultivo, y en cada ensayo las muestras de DNA fueron colocadas por triplicado. Cada grupo corresponde al tratamiento mostrado en la gráfica. Los abdómenes tratados con microorganismos (*M. luteus*, *S. marcescens* y *S. cerevisiae*.) mostraron mayor incorporación con respecto a los controles (Sin tratamiento, RPMI). Los mosquitos tratados con bacterias Gram + fueron los que mayor incorporación de BrdU presentaron. El análisis de varianza de rangos de Kruskal-Wallis muestra que las diferencias son estadísticamente significativas ($H_{(4, N= 18)} = 16.26316$; $p = .0027$).

La Figura 12 muestra la comparación de incorporación de BrdU en cultivos de abdómenes de mosquitos *An. albimanus* inoculados con *M. luteus*, *S. marcescens*, *S. cerevisiae* y sus controles ya mencionados.

La estimulación con levaduras mostró una incorporación mayor que la de los controles, lo cual concuerda con lo previamente reportado (Hernández-Martínez *et al.*, 2006). Sin embargo, en el presente estudio, se observó que la estimulación con *M. luteus*, o *S. marcescens*, indujo una mayor incorporación de BrdU comparadas con la inducida por la estimulación con levaduras. La inoculación con *S. marcescens* indujo una incorporación cerca de tres veces mayor comparado con los controles. El grupo con mayor incorporación de BrdU fue obtenido de cultivos de abdómenes de mosquitos inoculados con *M. luteus*. La incorporación de BrdU *in vitro* inducida por la inoculación de *M. luteus* mostró ser cinco veces mayor con respecto a los controles.

Debido a que los datos no cumplen con los supuestos de normalidad de los análisis paramétricos, se aplicó una prueba no paramétrica de análisis de varianza de rangos de Kruskal-Wallis la cual mostró que las diferencias entre los grupos son estadísticamente significativas ($H_{(4, N= 18)} = 16.26316$; $p = .0027$). Para el análisis de los datos obtenidos de los ensayos *in vivo*, mostrados en la figura 13, también se aplicó la misma prueba ya que tampoco cumplen con los supuestos de normalidad de los análisis paramétricos.

Incorporación relativa de BrdU en ensayos *in vivo*

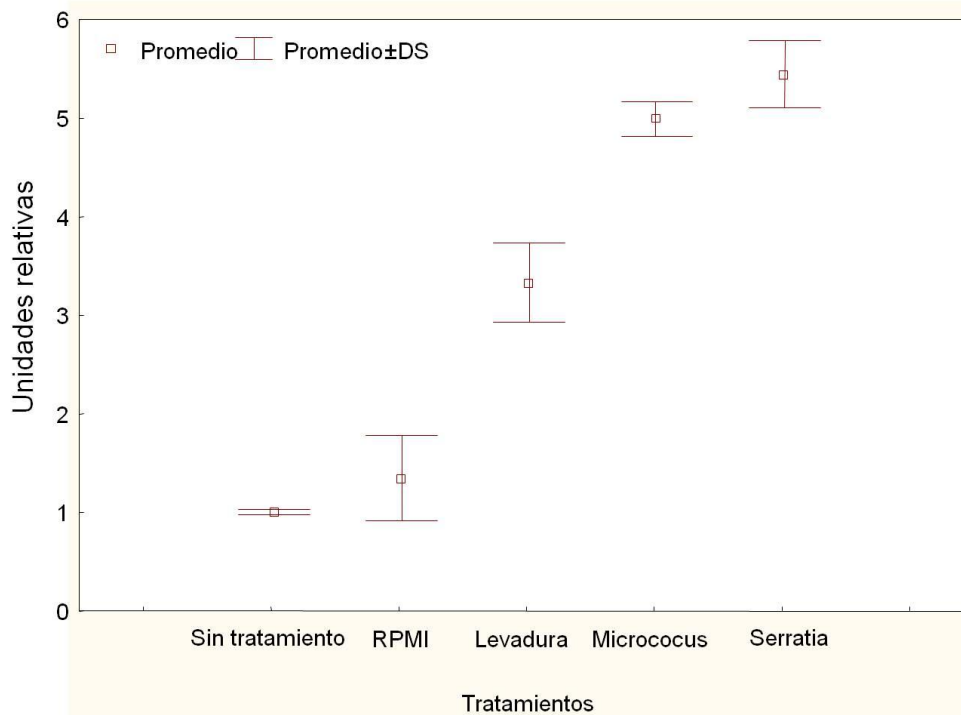


Figura 13.- Cuantificación por ELISA de la incorporación *in vivo* de BrdU en mosquitos *An. albimanus* retados con diferentes estímulos antigénicos. La incorporación de BrdU al DNA fue medida por ELISA a una absorbancia de 450 nm. La evaluación fue realizada en 3 ensayos independientes, y en cada uno las muestras fueron colocadas por triplicado. El DNA fue obtenido por extracción fenólica y el ELISA se realizó como se describe en Material y Métodos (sección 4). Sin tratamiento: mosquitos sin tratamiento alimentados con BrdU. RPMI: mosquitos inoculados solo con medio RPMI. Levadura: mosquitos inoculados con *S. cerevisiae*, Micrococos: mosquitos inoculados con *M. luteus* y *Serratia*: mosquitos inoculados con *S. marcescens*; todos los microorganismos fueron disueltos en medio de cultivo RPMI. El análisis de varianza de rangos de Kruskal-Wallis muestra que las diferencias son estadísticamente significativas ($H_{(4, N=14)} = 11.82857$; $p = .0187$).

La figura 13 muestra el resultado obtenido de la cuantificación relativa de incorporación de BrdU al DNA *in vivo* en *An. albimanus*. El método de ELISA utilizado fue descrito en la sección 4 de Materiales y Métodos. Las muestras fueron colocadas por triplicado para cada grupo en cada ensayo.

Como ya se mencionó, los datos no cumplieron con los supuestos de normalidad de los análisis paramétricos, por lo que se empleó un análisis no paramétrico de varianza de rangos de Kruskal-Wallis, lo que permitió evaluar las diferencias entre los distintos tratamientos. Las diferencias entre los grupos fueron estadísticamente significativas ($H_{(4, N=14)} = 11.82857$; $p = .0187$).

El análisis de varianza de dos factores en una prueba *post-hoc* de Tukey, mostró que las diferencias tanto en las condiciones *in vivo* e *in vitro*, fueron estadísticamente significativas ($F = 18.476$; $p < 0.00$). Analizando las diferencias entre grupos y condiciones, las diferencias entre los grupos controles “Sin tratamiento” y “RPMI” de ambas condiciones, *in vivo* e *in vitro*, no fueron estadísticamente significativas.

Por otro lado, este análisis mostró que las diferencias entre los grupos inoculados con *M. luteus*, y *S. marcescens* en la condición *in vivo* no fueron estadísticamente significativas. Comparado estos dos grupos con los grupos control la incorporación fue cerca de cinco veces mayor en los grupos inoculados con microorganismos bacterianos. Así también reveló que las diferencias entre los grupos inoculados con Levadura y *Serratia* en la condición *in vitro* no presentan una clara diferencia estadística. La incorporación de BrdU observada en los grupos Sin tratamiento, fue considerada como basal en ambas condiciones.

Análisis de secuencias expresadas en *An. albimanus* relacionados al sistema inmune del mosquito en un “macroarreglo”

con el objetivo de identificar de manera general algunos de los genes involucrados en la síntesis de DNA después del reto inmune con levadura se desarrollo de una estrategia que denominamos “macroarreglo”. El estímulo con levadura fue elegido en primer lugar, debido a que con este microorganismos ya existe un reporte publicado (Hernández-Martínez *et al.*, 2006), y en segundo lugar, a que dada la complejidad del protocolo, se decidió comenzar estos ensayos utilizando un solo microorganismo como modelo. La estrategia fue nombrada “macroarreglo” debido a la relación entre el número de genes y el área de la superficie donde fueron fijados (aproximadamente 1 gen/cm²). La técnica consistió en una combinación entre Dot, Southern, y Western blot, en la que productos de PCR de 93 distintas EST seleccionadas del transcriptoma de *An. albimanus* fueron inmovilizadas en una membrana de nitrocelulosa por medio de una bomba de vacío y fijadas con calor. La membrana fue utilizada para los ensayos de hibridación en los cuales se empleo como sonda el DNA marcado con BrdU proveniente de mosquitos estimulados con levadura (ver sección 12 de Material y Métodos).

La sonda fue elaborada a partir de DNA marcado con BrdU proveniente de mosquitos inoculados con levadura en un ensayo *in vivo*, y la hibridación fue revelada por medio del uso de anticuerpos conjugados a peroxidasa y quimioluminiscencia.

La figura 14 muestra el resultado obtenido del macroarreglo. Los sitios donde la sonda hibridó, se muestran como anillos de color negro. De las 93 muestras experimentales se contaron 46 marcas en el macroarreglo como

positivas. La diferencia de intensidad en las diferentes posiciones de los positivos es discutida en la sección correspondiente.

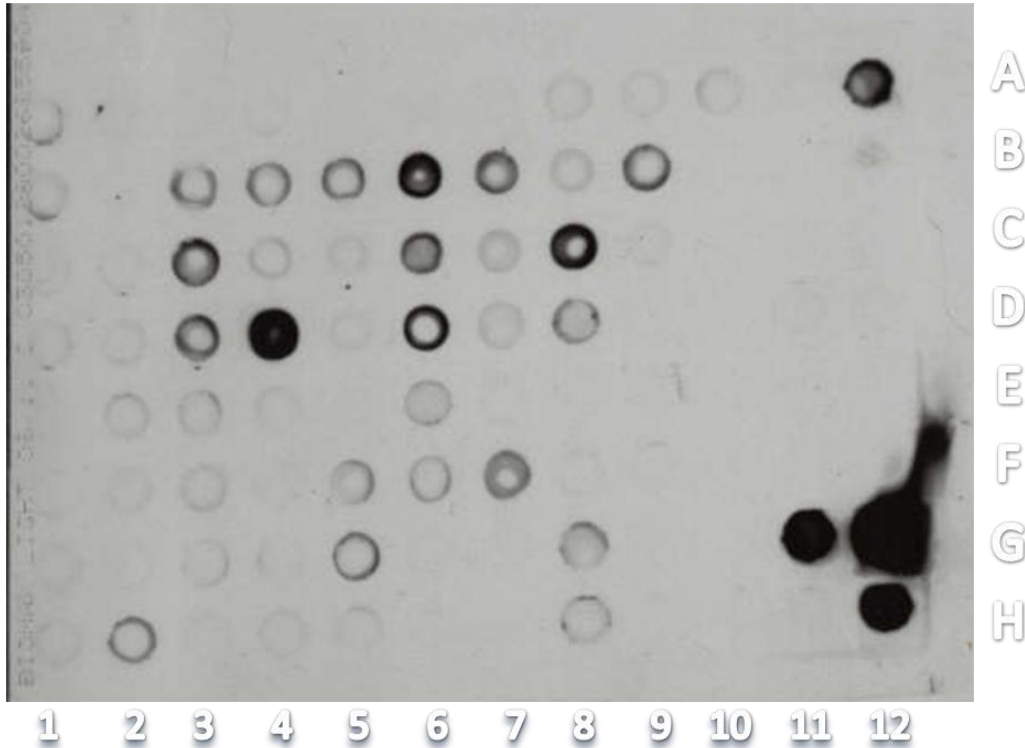


Figura 14. Placa de revelado del macroarreglo. La hibridación en membrana de nitrocelulosa de la sonda marcada con BrdU, generó una señal en forma de anillos en la placa debido al sistema de vacío usado para fijar las secuencias a la membrana. Las clonas con señal más intensa (G11, G12 y H12) formaron un círculo totalmente obscuro aun cuando todas las muestras fueron fijadas a la membrana a una concentración de 500 ng/μl. Los controles, negativo (DNA plasmidico), positivo (DNA genómico de *An. albimanus* marcado con BrdU *in vitro*) y de hibridación (DNA genómico de *An. albimanus* sin ningún tratamiento) se encuentran localizados en C10, G12y H12 respectivamente.

Las 15 muestras que produjeron la señal positiva más intensa en reacción de hibridación, fueron agrupadas en una lista para su análisis (Tabla 3). La clasificación de la señal positiva fue cualitativa donde las muestras que se observaron como un círculo negro se les asignó un valor arbitrario de 6 y las muestras observadas como circunferencias pálidas se les asignó un valor de 1 (La lista completa de las muestras consideradas positivas del macroarreglo es proporcionada en el Apéndice 11). En la Tabla 3 se muestra la descripción obtenida de InterPro, una clave de identificación de la base de datos del transcriptoma de *An. albimanus* (GDAV, Genome Delinked Analyzer Viewer), un valor arbitrario de la intensidad con la que se observa la marca y la posición en el macroarreglo. No todos los EST encontrados tuvieron una clave dentro de la base de datos GDAV, sin embargo siempre contaron con una descripción de InterPro.

Tabla 3. Lista de las muestras con señal más intensa en macroarreglo ordenados por valores arbitrarios

Descripciones InterPro	ID GDAV	Valor	Posición
Repetido rico en leucina 1	EV409186	6	D4
Defensina	EV407402	6	G11
Defensina	EV407485	5	A12
Receptor de α-2-macroglobulina 1	EV409059	5	B6
Receptor de superficie celular de IPT/TIG	EV408998	4	D6
Repetido rico en leucina 2	Sin registro	4	C3
Región adyacente Bromo	EV409975	4	C8
Sito de unión de FAD/NAD(P)	EV409881	3	H2
Ferritina	EV409972	3	B3
Fibrinógeno, cadena alfa/beta/gamma	EV410042	3	D3
Familia helicasa DNA2/NAM7	EV409141	3	B4
GTPasa Ras	EV409319	3	B5
Receptor de α-2-macroglobulina 2	CL338Contig1	3	F5
Inmunoglobulina grupo I y V, tipo C1	Sin registro	3	G5
Fosfatidilinositol 3- and 4-cinasa(PIK related kinase), con dominio FATC	EV408982	3	C6

El análisis bioinformático se realizó como fue descrito en Material y Métodos, mediante la comparación del genoma de *An. gambiae* con los 15 mejores EST que produjeron mejor señal del macroarreglo. Los genes vecinos de tales hits son mostrados en la Tabla 4. Después de una búsqueda en la base de datos del transcriptoma de *An. albimanus* GDAV, encontramos solo 12 secuencias nuevas para amplificar a partir de DNA genómico de *An. albimanus*. Entre las secuencias que identificamos con este análisis, encontramos el factor transcripcional REL2, galectina 5, una agrupación de proteínas con dominios tioester (TEP), una peroxidasa, una glutatión transferasa (GSTT2) y una agrupación de secuencias de proteínas de cutícula (CPR).

Tabla 4 Lista de genes encontrados con tblastx en el transcriptoma de *An. albimanus*.

ID interna	Vectorbase	Descripción	Tamaño calculado
FBO8G5402FUHN6	AGAP010831	TEP8	262 bp
FBO8G5402ILIQL	AGAP010816	TEP3	155 bp
FBO8G5401EIGHV	AGAP006747	REL2	210 bp
ALB_20G17_F_ab1	AGAP000888	GSTT2	550 bp
contig04100		CPR74,CRP75,CPR133	644 bp
contig04471		CPR73,CPR74,CRP75	325 bp
contig02540		CPR73,CPR74,CRP75,CPR133	181 bp
contig00202	AGAP010734	Peroxidasa 9	483 bp
contig03933		TEP3,TEP17,TEP8,TEP9	688 bp
contig00571		TEP3,TEP17,TEP8,TEP9	445 bp
contig01744		TEP3,TEP17,TEP8,TEP9	171 bp
contig01665	AGAP011287	GALE5	362 bp

Diseño de cebadores para PCR

Las secuencias obtenidas en la búsqueda bioinformática fueron utilizadas para el diseño de cebadores para PCR. Para el diseño de los cebadores óptimos para la amplificación de cada una de las nuevas secuencias identificadas del transcriptoma de *An. albimanus*, se utilizó el programa de diseño de cebadores de invitrogen Vector NTI. Adicionalmente se realizó un análisis de la calidad de las secuencias y el modelaje exón-intrón generado anteriormente con Exonerate para darle mayor certidumbre al diseño. Cada pareja de cebadores fue evaluada para la formación de homo- y hetero- complementariedad, buscando que las secuencias de los cebadores presentaran una TM de 55°C, con una longitud de 19 a 25 nucleótidos. Los tamaños esperados de los productos para cada par de cebadores fueron de 175 a 780 bp. La lista de los cebadores diseñados es mostrada en la Tabla 5.

Los cebadores llevan en el nombre “F” si son cebadores sentido, “R” si son reversos y al final la clave o el nombre que identifica al gen correspondiente.

Tabla 5 Lista de cebadores diseñados usando Vector NTI

Nombre	Secuencia de oligonucleótidos	longitud	TM	%GC	TM SIGMA
P_F_DID_C00202	GCAAGCTGGAACAAGGCAATAC	22	55.5	50	66.6
P_F_NTI_C00571	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	23	54.7	47.8	65.9
P_F_NTI_C01665	TGGGGTGTGAGGAACGGT	19	54.8	57.9	67.8
P_F_DID_C01744	AGGATTGCATAATGTTTGCGATT	23	54.5	34.8	65.1
P_F_NTI_C02540	CGCCCGATGGTCAGTTGAT	19	55.5	57.9	68.4
P_F_NTI_C03933	CATCGATTGCAGTTGAATGAGC	22	54.8	47.9	66.6
P_F_DID_C04100	ATGGTTTGTATCCTCACTCATCCA	25	55.5	40	66.2
P_F_C04471	GAAACGGCCAACGGTATCC	19	54.2	57.9	66.3
P_F_DID_TEP3	AAATTATTCGAGTCCACGCGATAC	24	55.5	48.9	65.7
P_F_DID_TEP8	CAGACGCCTAACTTCAGGGAAG	22	54.7	54.5	65.9
P_F_REL	CGAGAAGTATCCGCGAAGTCAC	22	55.5	54.5	66.9
P_R_NTI_C00202	CTCCTTTCGGCAACGACCT	19	54.1	57.9	66.5
P_R_C00571	TGTTTGTAAGATCGCTCTCATGC	24	55.3	41.7	66.1
P_R_NTI_C01665	CCAGGCAGGATTCATTGGA	20	54.7	50	67
P_R_NTI_C01744	AGAAATCAAGATCCTCTACGGTGG	24	54.6	45.8	65.2
P_R_DID_C02540	CGTGATGACACCTAGTACCTTCGC	24	56.7	54.2	67.6
P_R_DID_C03933	ATCCGGTGGTCAGAATGTATCC	22	54.2	50	65.8
P_R_DID_C04100	CGTGTTATCTCATCGAGCAGTTTC	24	54.8	45.8	65.7
P_R_C04471	AATCTTCCTCTGGTCAATGGCA	22	55.1	47.9	66.7
P_R_DID_TEP3	TTCGTTAGTGCTTTCCTCGC	21	56	52.4	67.3
P_R_DID_TEP8	CCCAGCATCAAACAAACACCTAT	23	54.7	43.5	65.7
P_R_NTI_REL	TGATGGGCTCTGGGATTGC	19	55.5	57.9	68.9

Enriquecimiento del macroarreglo mediante la amplificación y clonación de fragmentos nuevos.

Los productos de PCR fueron purificados utilizando el kit AxyPrep (AXYGEN, siguiendo las recomendaciones del proveedor), ligando al vector de clonación pCR 2.1-TOPO (Invitrogen, siguiendo las recomendaciones del proveedor).

Los productos de PCR fueron analizados en geles de agarosa al 2%. Se utilizaron distintas temperaturas de alineamiento, ya que en cada caso la temperatura de alineamiento fue calculada con un algoritmo distinto (mostradas en la Tabla 5, columna 6) por la compañía proveedora de los oligonucleótidos (SIGMA). Con esto se obtuvo un mejor rendimiento de reacción que con las temperaturas de alineamiento calculadas con anterioridad.

La figura 15 y la figura 16 muestran todas las secuencias obtenidas por PCR. Las secuencias obtenidas tuvieron un peso molecular muy cercano al peso calculado.

Las únicas secuencias de las que no se obtuvo ningún tipo de producto, aunque se probaron diferentes rangos de temperatura de alineamiento, fueron las correspondientes a C00571, C01774 mostradas en la figura 16. La secuencia de Tep3 fue la única en la que los cebadores mostraron la formación de un dímero el cual tenía un tamaño similar a la secuencia esperada. Estas tres secuencias fueron descartadas.

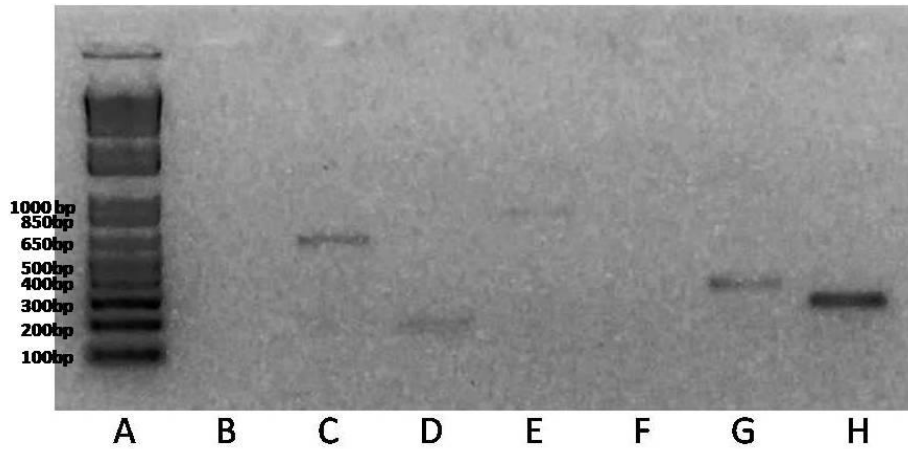


Figura 15.- Gel al 2% de agarosa mostrando cinco de los productos amplificados por PCR. A) Marcador de peso molecular 1Kb ladder plus marca Invitrogen. B) Control negativo. C) C00202_483bp. D) C02540_181bp. E) C03933_688bp. F) C04100_644bp. G) C04471_325bp. H) Tep8_262bp.

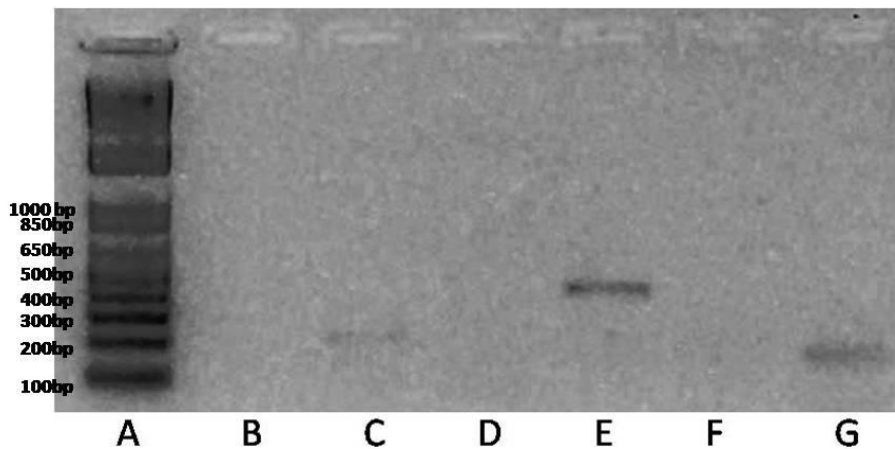


Figura 16.- Gel al 2% de agarosa mostrando cinco productos amplificados por PCR. A) Marcador de peso molecular 1Kb ladder plus marca Invitrogen. B) Control negativo. C) REL2_210 bp. D) C00571 negativo. E) C01665_362bp. F) C01774 negativo. G) dímero de Tep3_155bp.

DISCUSION

Inmunodetección de BrdU en los tejidos de An. albimanus.

En el presente trabajo se logró observar la inducción de síntesis de DNA después de diferentes retos inmunes, tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo* en diferentes tejidos de mosquitos.

Asimismo, se lograron identificar diferencias importantes. Por ejemplo, en los estudios *in vitro* se observó mayor incorporación de BrdU en los núcleos celulares, comparado con los ensayos *in vivo*.

Un dato interesante fue que las células de las membranas pleurales y epiteliales del ovario presentaron señal exclusivamente en los experimentos *in vitro*. En contraste las células pericárdicas que se encuentran estrechamente asociadas al vaso dorsal, son multinucleadas, y se encuentran en constante contacto con la hemolinfa de los mosquitos, fueron capaces de incorporar BrdU al núcleo tanto *in vitro* como *in vivo*. Esto también ocurrió en las células del cuerpo graso

Estas diferencias pueden ser explicadas en base al tratamiento realizado en las diferentes muestras, sobre todo porque en los ensayos *in vitro* las muestras sufren un daño importante al ser procesadas para los cultivos. No obstante, el modelo permitió observar y evaluar diferencias importantes entre los diferentes tratamientos *in vitro*, aunado a que la intensidad de la señal siempre fue mayor en estas muestras comparadas con las muestras de los ensayos *in vivo* y ello permitió realizar mejores comparaciones. Por ejemplo, aún cuando la síntesis de DNA (medida por BrdU incorporado) se presentó solo en el epitelio de los

oviductos de ovarios de los tratamientos *in vitro*, esta no se presentó en todos los tratamientos, incluso ni en las muestras control. En el caso de las membranas pleurales, también con síntesis de DNA solo *in vitro*, la intensidad de la señal cualitativamente fue diferente en los diferentes tratamientos, siendo en las muestras control mucho más baja que en las experimentales. Todo lo anterior demuestra que el modelo *in vitro* de incorporación de BrdU será muy útil para estudios y evaluaciones futuras de este fenómeno en insectos.

Una posibilidad adicional que podría explicar las diferencias en la intensidad de síntesis de DNA observada entre los ensayos *in vitro* e *in vivo*, es que la concentración de BrdU en los experimentos *in vivo* no haya sido la óptima y que la cantidad tomada por el mosquito no fuera la suficiente como para que el BrdU alcance distribuirse a todos los tejidos, siendo incorporado en su mayoría en las células de cuerpo graso. Sin embargo, algunos ensayos realizados alimentando a los mosquitos con una concentración 10 veces más alta de BrdU (1 mg/ml en su dieta) mostró no ser la más adecuada, ya que en diferentes pruebas en promedio el 90% de mosquitos murieron (ensayos no mostrados). Aun cuando en estudios futuros se podrían incluir más puntos intermedios de concentración de BrdU (entre 100 y 1000 m/ml), es poco probable que el resultado reportado en el presente estudio cambie mucho, principalmente en lo que se refiere a los tejidos reportados. Aclarar esta situación será relevante para estudios futuros, sin embargo como ya se mencionó será necesario tener en cuenta que la concentración de BrdU podría afectar la sobrevivencia del mosquito, o su estado fisiológico normal (Pérez-Zamorano; comunicación personal).

En cuanto a los ensayos de ELISA, con los cuales se buscó cuantificar de manera relativa la incorporación de BrdU, se encontró una buena correlación entre los datos obtenidos por la inmunohistoquímica y la cantidad relativa de BrdU que fue incorporada ante los distintos retos microbianos. La condición *in vivo* tuvo un problema de sensibilidad y se tuvo que colocar el doble de la concentración de la muestra para obtener una lectura dentro del rango de confiabilidad de la técnica. La relativización de los datos usando como estándar la incorporación basal en mosquitos solo alimentados con BrdU, permitió eliminar este problema y hacer comparaciones entre las condiciones *in vitro* e *in vivo*. El análisis de varianza de dos factores mostró que las diferencias entre los grupos control de los experimentos tanto *in vivo* como *in vitro* no eran estadísticamente significativas. Los datos presentados en los ensayos de ELISA tanto *in vivo* como *in vitro* muestran una clara inducción de síntesis de DNA provocada por la presencia de microorganismos. Sin embargo, por la inmunofluorescencia se observó que si existe una diferencia en la inducción de síntesis de DNA observada en el cuerpo graso de los mosquitos inoculados con RPM con respecto al control solo alimentado con BrdU. Las razones pueden ser muchas, pero una que podría ser la más probable es que en los ensayos *in vivo*, en la hemolinfa existan “factores” necesarios para que el cuerpo graso, después de un daño mecánico, pueda internalizar más fácilmente el BrdU, o bien que sean necesarios para que el BrdU se incorpore más fácilmente al DNA. En otras palabras, que durante los ensayos *in vivo* algunos tejidos con el solo daño mecánico estén requiriendo de “factores” que se encuentran de manera constitutiva en la hemolinfa, posiblemente provenientes del sistema nervioso.

Sin embargo, en términos generales la cuantificación relativa en los experimentos *in vivo* presentó un comportamiento similar a los realizados *in vitro* los mosquitos inoculados con microorganismos tienen una clara inducción de síntesis de DNA. El análisis de varianza de rangos realizado tanto para los ensayos *in vitro* como *in vivo* mostró que las diferencias entre los grupos de los mosquitos inoculados con microorganismos y sus controles son estadísticamente significativas. En la condición *in vitro* la mayor incorporación la mostró el grupo de mosquitos inoculados con micrococos siendo hasta 4 veces mayor con respecto a los controles. Los mosquitos inoculados con levadura y *Serratia* también indujeron una incorporación de BrdU de 3 veces mayor con respecto a los controles, y las diferencias entre estos dos grupos no mostró una significancia importante ($p = 0.078268$).

Para el caso de los ensayos *in vivo* no hubo diferencias estadísticamente significativas en la incorporación inducida por los tratamientos con micrococos y *Serratia*. En la condición *in vivo*, los microorganismos bacterianos indujeron alrededor de 5 veces, las levaduras indujeron 3.5 veces más que los controles las y diferencias entre tratamientos fueron estadísticamente significativas. En general en ambas condiciones, *in vivo* e *in vitro*, los microorganismos bacterianos fueron mejores inductores de la síntesis con respecto a la levadura.

Esta clara diferencia entre los microorganismos bacterianos y la levadura podría deberse a los patrones de reconocimiento de patógenos y sus vías de señalización. En *Drosophila* las vías de reconocimiento para las bacterias Gram positivas y levadura están controladas por el mismo tipo de receptor (Toll), mientras que para las Gram negativa están controladas por uno diferente (IMD)

(Aggarwal y Silverman, 2008; De Gregorio *et al.*, 2002). Un resultado esperado por la analogía con *Drosophila*, sería que la levadura y los micrococcos en ambas condiciones, *in vivo* e *in vitro*, indujeran la incorporación de una cantidad similar de marca en el mosquito. Sin embargo, la cantidad incorporada en el estímulo por la levadura en ambas condiciones fue de alrededor de tres veces mayor que el control; mientras que el estímulo con micrococcos indujo siempre una incorporación mayor. Este resultado podría indicar que aún cuando las vías de señalización sean conservadas, el mecanismo de reconocimiento para uno o para otro microorganismo podría no ser el mismo que *Drosophila*. Sin embargo, otra explicación posible para este hecho, podría estar relacionada a la cantidad de estímulo, principalmente porque si pensamos que las cantidades inoculadas nunca fueron equimolares (pensando en LPS, péptidoglicanos y LPS) y en que el número de microorganismos no representa una cantidad similar de estímulo.

Otro dato interesante es la incorporación inducida por *Serratia*, la cual forma parte de la flora intestinal natural del mosquito. Mientras que en la condición *in vitro* hubo un aumento de tres veces, *in vivo* aumentó hasta cinco veces. Quizá en la condición *in vitro* falta algún factor adicional que se encuentra en la condición *in vivo*, similar a lo discutido en la comparación de los controles. Este “factor” o “factores” faltantes podrían estar exacerbando la respuesta inmune del mosquito a *Serratia* o censando cuando la flora interna del mosquito se sale de la concentración fisiológica aceptada. En el trabajo de Hernández y cols. (2006), los estudios *in vitro* utilizando levaduras, les permitieron proponer entre otras cosas la existencia de un “factor no identificado” presente en la hemolinfa del mosquito, el cual es necesario para que se dispare la síntesis de DNA.

Las infecciones cruzadas son una herramienta muy útil para entender los mecanismos de eliminación de diversos patógenos. La incorporación de BrdU en los ensayos con virus dengue fueron interesantes ya que *An. albimanus* no es un vector natural de este virus. Aunque fue un ensayo piloto en una condición *in vivo*, la inmunofluorescencia nos permitió notar diferencias entre los mosquitos control y los mosquitos inoculados con virus. Tanto en el control como en los experimentales el cuerpo graso incorporó BrdU de manera similar. Sin embargo la diferencia más notable fue la incorporación que ocurrió en las células pericárdicas. En los ensayos de inmunofluorescencia con retos con bacterias y levaduras se observó que las células pericárdicas presentan capacidad de incorporar BrdU al núcleo. En el caso del virus Dengue también se presentó incorporación de BrdU, pero ésta fue de menor intensidad. No obstante los controles sin virus Dengue siempre fueron negativos. En el grupo se cuenta con fuertes evidencias que la región abdominal del vaso dorsal (corazón), puede responder por medio de diferentes mecanismos inmunes contra diferentes patógenos, incluso contra esporozoítos de *Plasmodium* (Hernández-Martínez *et al.*, datos no publicados). Lo anterior hace muy interesante determinar si el fenómeno de síntesis está relacionado con las respuestas inmunes observadas en el corazón, así como con mecanismos de estrés oxidativo disparados por la presencia de virus en mosquitos (Ramos–Castañeda *et al.*, 2008). Previamente se ha propuesto que el reconocimiento de virus en el sistema inmune de *Drosophila* puede estar mediado por la vía de señalización Toll (Zambon *et al.*, 2005) y como complemento a los mecanismos regulados por esta vía, la apoptosis (Cooper *et al.*, 2007). Por otro lado, Dostert y cols. (2005) proponen que la vía de señalización JaK-STAT es

requerida para el reconocimiento de virus en *Drosophila*, y más recientemente se encontró que esta vía presenta una participación directa en la resistencia a virus Dengue (Souza-Neto *et al.*, 2009). Estudios recientes en genómica, que han permitido el estudio de cepas naturalmente resistentes de *Ae. aegypti* a la infección de virus dengue, mostraron que no hay una regulación positiva de genes de inmunidad, al menos a nivel transcripcional (Barón *et al.*, 2010). Por su parte, Sim y Dimopoulos (2010) encuentran que la infección por virus Dengue, en una línea celular de *Ae. aegypti*, provoca una inhibición en la expresión de genes inmunes regulados por las vías IMD y Toll. De todo lo anterior, podemos deducir que la presencia de virus Dengue afecta de manera positiva la transcripción de ciertos genes en vías de señalización como en el caso de *Drosophila* o negativa como en el caso de *Ae. aegypti*, mostrando que la interacción de las vías de señalización, y que la regulación (aún negativa) podría estar asociada a la producción elevada de un grupo específico de moléculas efectoras o represoras de la respuesta inmune.

La síntesis de DNA observada en los ensayos de virus Dengue en *An. albimanus*, por no ser un vector natural de éste virus, y en analogía por lo observado por Dostert y cols. (2005) en *Drosophila*, podría estar asociada a la vía de señalización JaK-STAT. Sin embargo es algo que aún deberá ser comprobado. Asimismo, será de importancia que en el futuro se realicen ensayos alimentando al mosquito con el virus, ya que su forma natural de entrada nos confirmará si el corazón tiene alguna participación en este fenómeno y nos dará información adicional sobre otros tejidos (como las células del intestino) que puedan o no

entrar en síntesis de DNA. Adicionalmente, también será de suma importancia comparar estos hallazgos en el mosquito vector, *Ae. aegypti*.

Incorporación de BrdU en mosquitos *An. albimanus* alimentados con sangre infectada con parásitos GFP

Los ensayos realizados alimentando a los mosquitos con sangre infectada con *Plasmodium berghei* nos permitieron observar la incorporación de BrdU de una manera diferencial en las cepas de mosquitos analizadas. La cepa resistente a la infección por estos parásitos, mostró una incorporación de BrdU intensa en los primeros días, y al final de la cinética realizada (Día 11) esta incorporación apenas fue detectable. La cepa positiva a la infección con este parásito, mostró ser una herramienta interesante ya que como se mostró en la sección de resultados, en los primeros días (3 y 5), la incorporación de BrdU comenzó a ser detectable (a diferencia de la cepa resistente donde la señal ya era intensa) en el intestino y cuerpo graso. Ya para el séptimo y noveno día la señal cualitativa fue más intensa y el número de núcleos marcados fue mayor, los cuales comenzaron a decaer en día 11. Las diferencias en el patrón de la incorporación de BrdU entre las cepas, puede estar relacionado directamente a la capacidad de respuesta de ambas contra el parásito. Los resultados obtenidos son por demás interesantes y relevantes en el entendimiento de la interacción vector-parásito y de los mecanismos de resistencia que pudieran ser relevantes en la eliminación de parásitos de malaria en el mosquito *An. albimanus*. Con estos resultados se puede construir un cronograma de eventos en ambas cepas de mosquitos, que expliquen el posible mecanismo de resistencia y la posible relación con el fenómeno de

síntesis de DNA: En la cepa de *An. albimanus* resistente a la infección con *P. berghei*, se ha observado que el parásito es eliminado, en los primeros días post-alimentación con la sangre infectada, en donde al tercer día ya no es posible observar la fluorescencia producida por la GFP de estos parásitos (cuando están vivos). En algunos casos es posible observar una autofluorescencia remanente, de color amarillento, en quistes jóvenes que lograron llegar a la lamina basal del intestino (Hernández-Martínez *et al.*, Datos no publicados). Los resultados del presente estudio mostraron que en esta cepa al tercer día ya se observa una intensa marca de incorporación de BrdU en los núcleos del intestino y cuerpo graso, la cual se mantiene hasta el día 7.

En el caso de la cepa susceptible, se ha observado que *P. berghei* se logra desarrollar hasta quiste maduro, incluso libera las fases de esporozoíto al hemocele (como visto por la expresión de la GFP), faltando solo la invasión de glándulas salivales para poder ser transmitido al hospedero vertebrado (Hernández-Martínez *et al.*, Datos no publicados). Los resultados presentes muestran que esta cepa de mosquito es capaz de ser inducida a un estado de síntesis de DNA, sin embargo durante una infección con *P. berghei* a pesar de que la síntesis de DNA se presenta, esta parece ser un tardía (comienza a ser detectada al día 5 y su mayor intensidad se alcanza al día 7-9) pues el parásito ya se ha establecido. Con lo anterior se podría pensar que el fenómeno de síntesis de DNA está directamente relacionado a la resistencia observada en estas cepas, y que esta resistencia podría estar dependiendo de la capacidad (velocidad) del mosquito para detectar al parásito y montar a tiempo el proceso de síntesis de DNA, fenómeno que a su vez podría estar involucrado en la producción de

moléculas efectoras de la respuesta inmune del mosquito (lo que es discutido más adelante).

Como se mencionó, la diferencia temporal de la incorporación de BrdU entre las cepas podría deberse a la prontitud con la que las cepas pueden reconocer al parásito, siendo la cepa resistente la que reconoce al parásito en cuanto entra al lumen del intestino. Una vez en el lumen del intestino, el oocineto encuentra barreras físicas dentro del mosquito la primera es la membrana peritrófica que se forma para aislar el bolo alimenticio de sangre del contacto directo con el epitelio intestinal. El oocineto es capaz de cruzar esa membrana y entrar en contacto con las células intestinales para iniciar el proceso de invasión y provocar un daño físico, el cual activa señales de alarma dentro del mosquito como una elevada presencia de especies reactivas de oxígeno y óxido nítrico, quizá provocando la apoptosis de las células dañadas (Han *et al.*, 2000). El sistema inmune de la cepa resistente podría, o bien detectar al parásito antes de que empiece el proceso de invasión o mientras el proceso de invasión está ocurriendo. En el caso de la cepa susceptible se permite el desarrollo del parásito a quiste. Aunque el mosquito es dañado y levanta una respuesta inmune, esta es tardía ya que el parásito burla las primeras barreras físicas del sistema inmune que son la membrana peritrófica y las células del intestino medio y se aloja en la membrana basal de las células epiteliales del intestino, evitando así ser detectado por el sistema inmune del mosquito. Después de cierto tiempo cuando este ooquiste ha madurado, libera esporozoítos a la hemolinfa, los esporozoítos, que son otra fase móvil del *Plasmodium* entran a la hemolinfa. En los ensayos con microorganismos tanto en condiciones *in vivo* como *in vitro* se observó que otros

órganos son capaces de incorporar BrdU, los cuales son capaces de responder a un estímulo y podrían estar activándose en conjunto para detener la infección. En esta cepa la incorporación más intensa de BrdU correspondió a los días 7 y 9 post alimentación, En este intervalo de tiempo es cuando el ooquiste madura y libera los esporozoítos al hemocele. Los esporozoítos que se liberan a la hemolinfa podrían ser censados y atacados por lo que podría ser una combinación de fagocitosis, encapsulación y producción de moléculas inmunes. Las células que son capaces de producir moléculas inmunes, se encontrarían con una demanda metabólica alta para contender con la infección de miles de esporozoítos. Los órganos como pueden ser el cuerpo graso, el corazón y demás podrían tener una capacidad de respuesta aumentada con genes inmunes que estuvieran amplificándose. Aún después en el día 11 era posible detectar la incorporación de BrdU lo que podría estar indicando la duración de la respuesta quizá en caso de que hubiera una reinfección, no pasaría por todo el proceso de síntesis una vez más.

Quizá la susceptibilidad de esta cepa está ligada a la capacidad disminuida de estos mosquitos para entrar en síntesis de DNA. Una razón podría ser que cuando el parásito se encuentra en el estómago no se generan suficientes señales de alarma como especies reactivas de nitrógeno, oxígeno u óxido nítrico, para estimular a las células por lo que no entran en síntesis de DNA, solo cuando se encuentra en un gran estrés por segunda vez las células se ven forzadas a entrar en síntesis de DNA. Será interesante evaluar la capacidad de la cepa susceptible para iniciar la síntesis de DNA, con respecto a la cepa resistente y a la cepa Tapachula. Evaluar la capacidad de las cepas para entrar en síntesis de DNA

podría darnos un indicio de si la síntesis de DNA se encuentra realmente ligada a la característica de resistencia y susceptibilidad.

Genes amplificados durante la síntesis de DNA en An. albimanus

Con la estandarización de la técnica del macroarreglo y con un ensayo piloto obtuvimos indicios de diferentes genes amplificados durante la respuesta inmune del mosquito,

El ensayo piloto del macroarreglo, nos proporcionó las bases sobre las cuales construimos una plataforma que nos permitió ampliar el número de genes que podemos analizar con esta técnica. Sin embargo surgieron problemas técnicos que no permitieron concentrar un número mayor de muestras en un área igual a la utilizada en el ensayo piloto

Las secuencias identificadas por este primer ensayo preliminar pueden ser ensambladas en una historia ya que tiene desde componentes de reconocimiento hasta moléculas de la parte efectora del sistema inmune.

Al analizar los resultados, se puede observar que 46 diferentes clonas de EST presentaron una señal similar de incorporación de BrdU en el macroarreglo. A grandes rasgos, se puede mencionar la identificación de genes amplificados que codifican para dominios de unión a DNA presentes en diferentes factores transcripcionales importantes para la síntesis de péptidos antimicrobianos, proteínas de señalización intracelular, proteínas de reconocimiento microbiano, y proteínas relacionadas con especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés).

La muestra que mostro mayor intensidad de señal correspondió a un repetido rico de leucina (LRR por sus siglas en inglés). La familia de péptidos ricos en repetidos leucina involucra a proteínas que participan en una gran variedad de funciones. Los receptores Toll en *Drosophila* y Toll-like en mamíferos son ejemplos de proteínas con dominios LRR con función central en las vías de señalización para la eliminación de patógenos. Hasta hace poco se descubrió una proteína antagonista del desarrollo de *Plasmodium* en el mosquito llamada, gen inmune de repetido rico en leucina (*LRIM1*, por sus siglas en ingles) (Koutsos; 2006).

Otra muestra igualmente interesante fue el de la Fosfatidilinositol 3 y 4 cinasa (PIK related kinase), la cual posee un dominio FATC que se encuentra en el C terminal de la proteína. Los miembros de esta familia pueden funcionar como sensores intracelulares que gobiernan caminos de señalización horizontal y radial. Muchos de estas proteínas tienen una función en los puntos de verificación del ciclo celular (Bosotti *et al*; 2000). La interacción de vías de señalización permitiría explicar la regulación de moléculas como TEP por la vía de JAK/STAT sin tener un receptor que dispare la cascada de forma directa (Tzou *et al.*; 2002).

Otra muestra positiva interesante es el de la Glutati6n S transferasa, la cual pertenece a una familia multigénica de enzimas involucradas en la detoxificaci6n de compuestos reactivos electrofílicos, lo que sugiere una posible funci6n en la protecci6n de los tejidos contra un da6o cr6nico causado por ROS (Eaton y Bammler; 1999). Las super6xido dismutasas que igualmente fueron positivas en el macroarreglo, pertenece al grupo de metaloproteínas que previene el da6o por radicales libres de oxígeno catalizando la reacci6n de super6xido a oxígeno y per6xido de hidrógeno. El sitio de uni6n de FAD/NAD (P), tambi6n identificado en

el macroarreglo, es un motivo ampliamente distribuido entre enzimas capaces de formar ROS en sus reacciones, como la óxido nítrico sintasa (Bredt *et al.*, 1991). La producción de ROS como una forma de defensa de los mosquitos *Anopheles* ante patógenos ha sido sugerida por experimentos hechos en cultivos de abdómenes de *An pseudopuntipennis* (Herrera-Ortíz *et al.*; 2004).

La caja DEAD/DEAH, una de las muestras consideradas positivas de los EST en el macroarreglo, pertenece a una familia de proteínas con función de RNA helicasas. Los miembros mejor caracterizados de esta familia presentan una actividad de helicasa dependiente de ATP. Se encuentran involucradas en varios procesos celulares. Tales como el inicio de la traducción crecimiento celular y división, (Schmid y Linder; 1992).

La región adyacente Bromo identificada en el macroarreglo, forma parte de una familia que contiene varias proteínas que participan en la metilación, replicación y regulación transcripcional del DNA. Este dominio es particularmente interesante debido a que en nuestro sistema asumimos que se sobre expresan genes por medio de la amplificación génica, y la familia de proteínas de homología con adyacente a bromo (BAH, por sus siglas en ingles) se encuentra participando en el silenciamiento de genes (Callebaut *et al.*; 1999). Esto nos plantea un panorama interesante donde podríamos tener algún mecanismo que relaciona en el silenciamiento de algunos genes y la expresión de otros en el sistema inmune del mosquito.

De las clonas en el macroarreglo, que representaron a los péptidos antimicrobianos usados por los mosquitos en la respuesta inmune (cecropina, defensina, gambicina y atacina) sólo defensina fue positiva para la incorporación

de BrdU, siendo uno de los dos mejores hits del macroarreglo. Las defensinas forman una familia de proteínas ricas en cisteínas, las cuales se activan de forma preferencial contra las bacterias Gram positivas (Yamada K y Natori S, 1993). Estos péptidos presentan una longitud de 38 a 51 aminoácidos y contienen 6 cisteínas conservadas las cuales forman puentes disulfuro.

El resultado del macroarreglo fue muy importante, ya que si observamos los datos de manera global se podría armar la secuencia de sucesos de la respuesta inmune del mosquito ante un reto con levaduras. Tenemos algunos de los hits que apuntan a receptores de reconocimiento, como los repetidos ricos en leucina y las lectinas tipo C; otra parte de los hits apuntan a cascadas de señalización, como es el caso de la fosfolipasa C, y la subunidad α de la proteína G. Otros hits encontrados están relacionados con la regulación de transcripción como Ras y la región adyacente a Bromo. También se encuentra la parte efectora representadas por las defensinas y los ROS generados por la cascada de la PO, con los que interactúan enzimas reguladoras como la Glutación S transferasa. El mecanismo de la inmunidad innata, puede ahora ser diseccionado en sus componentes moleculares con la técnica generada en el presente trabajo.

Una desventaja por la cual se planteó un cambio de técnica para el fijado de DNA en una membrana de nitrocelulosa era el número de secuencias que se podían analizar y la falta de una réplica dentro de la misma membrana. Sin embargo este primer ensayo es la primera evidencia de que solo algunos genes están siendo blancos de este fenómeno de síntesis. Lamentablemente la técnica de fijado alternativo que se probó presento dificultades técnicas que no permitieron un estudio con mayor número de muestras.

La siguiente idea para aprovechar el macroarreglo es buscar la relación o diferencias de expresión de los genes candidatos con diferentes patógenos como bacterias y parásitos de *Plasmodium* para observar en tejidos específicos, como el cuerpo graso y los genes que éste expresa de manera única, y de esta forma iniciar una caracterización molecular de este fenómeno en la respuesta inmune del mosquito.

Clonación de secuencias de An. albimanus encontradas por medio de “estimaciones razonadas”

Con el resultado del ensayo piloto del macroarreglo, nos planteamos la búsqueda de nuevos genes de *An. albimanus* basándonos en el conocimiento de la existencia de microsintenia en los genomas de los insectos y sobretodo en genomas de insectos vectores (Zdobnov y Bork, 2007; Nene *et al.*, 2007). Con este tipo de inferencias identificamos 12 secuencias, de las cuales una se ya encontraba almacenada en un plásmido dentro un clon de *E. coli* de la genoteca del transcriptoma de *An. albimanus* que posee el grupo. Las 11 secuencias restantes que se encontraban en la base de datos del transcriptoma, 7 fueron obtenidas por PCR a partir del DNA genómico del mosquito entero. El objetivo de encontrar y amplificar estas secuencias fue el de enriquecer las secuencias que se utilizaron para el macroarreglo, y asumiendo sintenia en los genomas de mosquitos *Anopheles*, probar si estas secuencias, que teóricamente eran vecinas de los genes identificados en el ensayo piloto, también eran blancos de la síntesis de DNA

Mediante el uso de la base de datos del transcriptoma de *An. albimanus*, de diversas herramientas de bioinformática y la sustentación en la literatura, se realizó la búsqueda de secuencias de genes entre dos genomas evolutivamente distantes de organismos con capacidades vectoriales muy similares, siendo *An. albimanus* y *An. gambiae* transmisores de parásitos del género *Plasmodium*.

Sin embargo no se debe olvidar que las aproximaciones de este tipo corren el riesgo de estar afectadas por diferentes artefactos, tales como anotaciones inadecuadas en el genoma de referencia. Adicionalmente, el salto entre genomas que están evolutivamente distantes puede provocar la generación de datos espurios o inexactos, tales como la existencia o inexistencia de intrones que pueden ser pasados por alto. Este tipo errores se vio reflejado en que dos de las secuencias que habíamos encontrado por esta estrategia no pudieron ser amplificadas. Lo anterior posiblemente a que dichas secuencias no existen en el genoma de *An. albimanus*, o a que el diseño de los cebadores no fue el adecuado para que los diferentes pares encontraran una secuencia diana a amplificar.

Estas secuencias identificadas cerca de la vecindad génica de las muestras que tuvieron mayor señal en el macroarreglo, nos sirvieron como complemento para probar si su cercanía también las hacía blanco de la síntesis de DNA. Este experimento nos abrió una posibilidad de identificar bloques conservados de genes inmunes que se amplifiquen específicamente en una situación de infección. Estas suposiciones están basadas en el modelo propuesto de síntesis de DNA en bloques para *Drosophila*, llamada piel de cebolla (Claycomb y Orr-Weaver, 2005). En este modelo existen horquillas de replicación anidadas las cuales son creadas por inicios repetidos en un sitio de origen central. Este tipo de mecanismos de

amplificación génica amplifican conjuntos de genes. Encontrar conjuntos de genes relacionados con la inmunidad que se amplifiquen de esta manera en insectos no solo sería novedoso, sino que daría las bases para entender el mecanismo de los insectos para contender con retos inmunes con un número de células limitado.

CONCLUSIONES

1) Las células del cuerpo graso de *An. albimanus* incorporan BrdU después de ser inoculados con medio de cultivo con y sin microorganismos.

2) Las células pericárdicas de *An. albimanus* incorporan BrdU únicamente ante un reto inmune.

3) El número de tejidos que incorporan BrdU fue mayor en la condición *in vitro* que *in vivo*

4) Los tejidos de mosquitos inoculados con micrococos mostraron una mayor intensidad de incorporación de BrdU medida por fluorescencia con respecto a los demás tratamientos.

5) Las células pericárdicas y del cuerpo graso del mosquito *An. albimanus*, que no es vector natural de dengue, mostraron incorporación de BrdU después de la inoculación de este virus.

6) Las células del cuerpo graso presentaron señal de incorporación de BrdU después de recibir el daño provocado por la inoculación. Es posible que este tejido se encuentre involucrado en la respuesta a daños en la cutícula

7) La síntesis de DNA parece estar involucrada en el mecanismo de eliminación de parásitos *P. berghei* en su fase de oocinetos en *An. albimanus*.

8) La cuantificación relativa mostró que la incorporación de BrdU al DNA de los mosquitos siempre fue mayor en las muestras tratadas con microorganismos con respecto a los controles, tanto en condiciones *in vivo* como *in vitro*.

9) Con los datos relativizados se encontró que en general las muestras de la condición *in vivo* incorporaron más BrdU que las muestras de la condición *in*

vitro. Los microorganismos bacterianos fueron mejores inductores de síntesis de DNA

10) La estrategia del macroarreglo permitió identificar secuencias que pueden estar siendo amplificadas en un fenómeno de síntesis de DNA, evidenciadas con la incorporación de BrdU

11) El diseño de cebadores basados en el transcriptoma de *An. albimanus* y el uso de herramientas bioinformáticas permitió encontrar secuencias genéticas relacionadas con el sistema inmune del mosquito, lo que permitió obtener y clonar dichas secuencias.

PERSPECTIVAS

1) Aislar órganos del abdomen para evaluar la incorporación en estos órganos particulares tanto por ensayos de inmunofluorescencia como por ensayos de ELISA.

2) Realizar ensayos comparativos entre distintas especies de mosquitos, también utilizando infecciones cruzadas para observar si existe el fenómeno de síntesis.

3) Realizar ensayos por los cuales los microorganismos sean introducidos en los mosquitos sin generar daño y evaluar si la síntesis de BrdU se presenta en los mismos tejidos observados.

4) Evaluar por ensayos de ELISA la incorporación observada en las cepas susceptibles y resistentes a la infección con *P. berghei*.

5) Determinar si las secuencias identificadas por métodos bioinformáticos son vecinos de las secuencias que fueron consideradas positivas del macroarreglo.

6) Corroborar el aumento de copias de las secuencias identificadas por la técnica de macroarreglo, utilizando otras técnicas como ensayos de PCR tiempo real o ensayos similares.

7) Realizar ensayos de macroarreglos con DNA de mosquitos retados con microorganismos bacterianos así como usar DNA de mosquitos infectados con *P. berghei*.

REFERENCIAS

- Aggawal K, Silverman N. (2008). Positive and negative regulation of the *Drosophila* immune response. *BMB Rep.*41:267-77.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. (2002). *Molecular Biology of the Cell*. (New York y Londres: Garland Science).
- Ausube FM, Brent R, Kingston RE, Moorre DA, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. (1995). *Current protocols in molecular biology*, 8va edición (John Wiley and Sons Press).
- Baldacci P, Ménard R. (2004). The elusive malaria sporozoite in the mammalian host. *Mol Microbiol* 54: 298–306.
- Barón OL, Ursic-Bedoya RJ, Lowenberger CA, Ocampo CB. (2010). Differential gene expression from midguts of refractory and susceptible lines of the mosquito, *Aedes aegypti*, infected with Dengue-2 virus. *J Insect Sci.* 10:41.
- Boletín Epidemiología 2010. (<http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/>).
- Botchan M, Levine M. (2004). A genome analysis of endoreplication in the *Drosophila* ovary. *Dev. Cell*, 6:4-5.
- Bredt DS, Hwang PM, Glatt CE, Lowenstein C, Reed RR, Snyder SH. (1991). Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature.* 351: 714-718
- Brey PT, Lee W, Yamakawa M, Koizumi Y, Perrot S, Francois M, Ashida M. (1993). Role of the integument in insect immunity: epicuticular abrasion and induction of cecropin synthesis in cuticular epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 90: 6275-6279.

- Campos J, Andrade CF, Recco-Pimentel SM. (2003). Malpighian tubule polytene chromosomes of *Culex quinquefasciatus* (Diptera, Culicinae). Mem Inst Oswaldo Cruz. 98:383-6.
- Carter V, Cable HC, Underhill BA, Williams J, Hurd H. (2003). Isolation of *Plasmodium berghei* ookinetes in culture using Nycodenz density gradient columns and magnetic isolation. Malar. J. 2: 35- 41.
- Callebaut I, Courvalin JC, Mornon JP. (1999). The BAH (bromo-adjacent homology) domain: a link between DNA methylation, replication and transcriptional regulation. FEBS Letters. 446: 189-193.
- Chapman RF. (1998). The insect structure and function. 4a edición. (Cambridge University Press, England)
- Christophides GK, Vlachou D, Kafatos FC. (2004). Comparative and functional genomics of the innate immune system in the malaria vector *Anopheles gambiae*. Immun. Rev. 198: 127–148.
- Claycomb JM, Benasutti M, Bosco G, Fenger DD, Orr-Weaver TL. (2004). Gene Amplification as a developmental strategy: isolation of two developmental amplicons in *Drosophila*. Dev. Cell. 6: 145–155.
- Claycomb JM. , Orr-Weaver TL. (2005) Developmental gene amplification: insights into DNA replication and gene expression .Trends. Genet. 21: 149-162.
- Cooper DM, Pio F, Thi EP, Theilmann D, Lowenberger C. (2007). Characterization of *Aedes Dredd*: a novel initiator caspase from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. Insect Biochem Mol Biol. 37:559-69.
- De Gregorio E, Spellman PT, Tzou P, Rubin GM, Lemaitre B. (2002). The Toll and IMD pathways are the major regulators of the immune response in *Drosophila*. EMBO J.21:2568-79.

- Dittmann F, Kogan PH, Hagedorn H. (1989). Ploidy levels and DNA synthesis in fat body cells of the adult mosquito, *Aedes aegypti*: the role of juvenile hormone. Arch. Insect. Biochem. Physiol. 12: 133-143.
- Dostert C, Jouanguy E, Irving P, Troxler L, Galiana-Arnoux D, *et al.* (2005). The Jak-STAT signaling pathway is required but not sufficient for the antiviral response of *Drosophila*. Nat. Immunol. 6: 946–953.
- Du Pasquier L, Flajnik M. (1999) Origin and evolution of the vertebrate immune system. Fundamental Immunology. Philadelphia. (Lippincott-Raven).
- Eaton DL, Bammler TK. (1999). Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology. Toxicological Sciences. 49: 156-164.
- Edgar BA, Orr-Weaver TL. (2001). Endoreplication cell cycles: more for less. Cell. 105: 297–306.
- Engström PG, Ho-Sui SJ, Drivenes Ø, Becker TS and Lenhard B. (2007). Genomic regulatory blocks underlie extensive microsynteny conservation in insects. Genome Res. 17: 1898-1908
- Franke-Fayard B, Trueman H, Ramesar J, Mendoza J, Van der Keur M, Van der Linden R, Sinden RE, Waters AP, Janse CJ. (2004). A *Plasmodium berghei* reference line that constitutively expresses GFP at a high level throughout the complete life cycle. Mol. Biochem. Parasitol. 137:23–33
- Frevert U. (2004). Sneaking in through the back entrance: the biology of malaria liver stages. Tr. Parasitol. 20: 417-424.
- Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT, Lewontin RC, Gelbart WM. (1999). Introduction to genetic analysis. (W. H. Freeman & Co, New York).
- Guesdon JL, (1992). *In vivo* labeling of DNA probes with 5-BrdU. Nonradioactive labeling and detection of biomolecules (Springer, Heidelberg).

- Han, Y.S., Thompson, J., Kafatos, F.C., 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: 6030–6040.
- Hemingway J, Hawkes N, Prapanthadara L, Jayawardena KGI, Ranson H. (1998). The role of gene splicing, gene amplification and regulation in mosquito insecticide resistance. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 353:1695-1699.
- 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: 61–69.
- Hernández-Martínez S, Román-Martínez U, Martínez-Bartneche J, Rodríguez M, Lanz-Mendoza H. (2006). Induction of DNA synthesis in *Anopheles albimanus* tissue cultures by *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 63: 147-158.
- Herrera-Ortiz A, Martínez-Bartneche J, Hernández-Martínez S, Villarreal-Treviño C, Aguilar-Marcelino L, Rodríguez MH, Lanz-Mendoza H. (2004). *Plasmodium berghei* ookinetes induce Nitric Oxide production in *Anopheles pseudopunctipennis* midguts cultured *in vitro*. *Insect Biochem Mol Biol.* 34: 893-901.
- Hoffman JA, Kafatos FC, Janeway CA, Ezekowitz RA. (1999). Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science*; 284: 1313-1318.
- Holt RA, Subramanian GM, Halpern A, Sutton GG, Charlab R, Nusskern DR, Wincker P, Clark AG, Ribeiro JM, Wides R, *et al.*,. (2002). The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Science* 298: 129-149.

- Koutsos A, (2006). Functional Genomics and Developmental Transcriptomics of the mosquito malaria vector, *Anopheles gambiae*. Tesis doctoral. European Molecular Biology Laboratory y Universidad de Creta, Depto. de Biol. London.
- Lawson D, Arensburger P, Atkinson P, Besansky NJ, Bruggner RV, Butler R, *et al.*(2009) VectorBase: a data resource for invertebrate vector genomics. *Nuc. Ac. Res.* 37: D583–D587
- Lenronne A, Pasarero P, Bensimon A, Schwob E. (2001). Monitoring S phase progression globally and locally using BrdU incorporation en TK+ yeast strains. *Nuc. Ac. Res.* 20: 1433-1442.
- Levashina EA. (2004). Immune responses in *Anopheles gambiae*. *Insect Biochem. Mol. Bio.* 34: 673 –678.
- Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Zipursky L, Darnell J.(2004). *Molecular Cell Biology.* (W. H. Freeman Company)
- Lowenberger C. (2001). Innate immune response of *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31: 219–229.
- Matuschewski K. (2006). Getting infectious: formation and maturation of *Plasmodium* sporozoites in the *Anopheles* vector. *Cell Microbiol.* 8: 1547 – 1556.
- Mavragani-Tsipidou P, Scouras ZG, Kastritsis CD. (1990) Comparison of the polytene chromosomes of the salivary gland, the fat body and the midgut nuclei of *Drosophila auraria*. *Genetica.*81:99-108.
- Nene V, Wortman JR, Lawson D, Haas B, Kodira C, Tu Z, Loftus B, Xi Z, Megy K, *et al.* (2007). Genome Sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector, *Science* 316, 1718-1722.

- Nishiura JT, Ho P, Ray K. (2003). Methoprene interferes with mosquito midgut remodeling during metamorphosis. *J. Med. Entomol.* 40:498-507.
- Park SY, Asano M (2008). The origin recognition complex is dispensable for endoreplication in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105:12343–12348
- Ramos-Castañeda J, González C, Jiménez MA, Duran J, Hernández-Martínez S, Rodríguez MH,
Rodríguez MC, Margos G, Compton H, Ku M, Lanz H, Rodríguez MH, Sinden RE. (2002) *Plasmodium berghei*: routine production of pure gametocytes, extracellular gametes, zygotes, and ookinetes *Exp. Parasitol* 101: 73–76
- Roma GC, Bueno OC, Camargo-Mathias MI. (2010). Morpho-physiological analysis of the insect fat body: a review. *Micron.* 41:395-401.
- Sambrook J, Russell DW. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3a. edición (Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Schmid SR, Linder P. (1992). D-E-A-D protein family of putative RNA helicases. *Mol Microbiol.* 6: 283-291.
- Sim S, Dimopoulos G (2010) Dengue Virus Inhibits Immune Responses in *Aedes aegypti* Cells. *PLoS ONE* 5(5): e10678. doi:10.1371/journal.pone.0010678.
- Smith AV, Orr-Weaver TL. (1991). The regulation of the cell cycle during *Drosophila* embryogenesis-the transition to polyteny. *Dev.* 112: 997-1008.
- Souza-Neto JA, Sim S, Dimopoulos G (2009) An evolutionary conserved function of the JAK-STAT pathway in anti-dengue defense. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 106: 17841–17846.
- Traas J, Hiilskamp M, Gendreauz E, Hijfte H, (1998). Endoreduplication and development: rule without dividing? *Cur. Opin. Plant Biol.* 1: 498-503.
- Tzou P, Reichhart JM, Lemaitre B. (2002). Constitutive expression of a single antimicrobial peptide can restore wild-type resistance to infection in

- immunodeficient *Drosophila* mutants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 99: 2152-2157.
- World Health Organization. (2008).Global Health Atlas.
- Yamada K, Natori S. (1993). Purification, sequence and antibacterial activity of two novel sapecin homologues from *Sarcophaga* embryonic cells: similarity of sapecin B to charybdotoxin. Biochem. J. 291: 275-279
- Zambetaki A, Kleanthous K, Mavragani-Tsipidou P. (1995) Cytogenetic analysis of Malpighian tubule and salivary gland polytene chromosomes of *Bactrocera oleae* (*Dacus oleae*) (Diptera: Tephritidae). Genome. 38:1070-81.
- Zambon RA, Nandakumar M, Vakharia VN, Wu LP (2005). The Toll pathway is important for an antiviral response in *Drosophila*. Proc Natl Acad Sci U S A. 102:7257-62.
- Zdobnov EM., Bork P. (2007).Quantification of insect genome divergence. Tr. in Gen. 23:16-20.
- Zdobnov EM., von Mering C, Letunic I, Torrents D, Suyama M, Copley RR, Christophides GK, D Thomasova, Holt RA, Subramanian G.M, *et al.* (2002). Comparative genome and proteome analysis of *Anopheles gambiae* and *Drosophila melanogaster*. Science 298:149-59.

APÉNDICES

1. Preparación de stock de Levaduras (SIGMA), Micrococcus (SIGMA) y Serratia

Se pesa 1 g de *Saccharomyces cerevisiae*, se agregan 10 ml de agua miliQ y se inactivan por calor (10 min en baño María de agua hirviendo). Se cuentan en una cámara de Neubauer, se hacen alícuotas de 50 µl y se guardan a 4°C. La solución de trabajo se prepara en medio de cultivo RPMI y se ajusta a una concentración de 4×10^6 células/ml

Se pesan 5 mg de *Micrococcus luteus* se agregan 5 ml de PBS 1X y se inactivan por calor (10 min en baño María en ebullición) La solución de trabajo se prepara en medio de cultivo RPMI y se ajusta a una concentración 100 µg/ml.

Serratia se cultivó en agar LB líquido. Del cultivo original se hace una dilución 1:100, se centrifuga a 4500 rpm y el botón se resuspende en agua miliQ. Se inactiva por calor (10 min en baño María en ebullición). Se cuentan en una cámara de Neubauer, se hacen alícuotas de 500 µl y se guardan a 4°C. La solución de trabajo se prepara en medio de cultivo RPMI y se ajusta a una concentración de 34×10^6 células/ml.

2. Preparación de medio de cultivo para los ensayos in vitro de incorporación de BrdU.

El medio de cultivo se prepara en RPMI pH 8.3 al momento de usarse. Cada 200 µl de medio de cultivo lleva los siguientes componentes a las concentraciones señaladas:

- 20 µg /ml de BrdU, stock a 1 mg/ml en agua destilada
- 10% de suero fetal bovino
- 1X de antibiótico antimicótico (penicilina 100 unidades/ml; estreptomicina 100 µg/ ml y anfotericina B 0.25 µg/ ml)

3. PBS 10X.

La solución de trabajo PBS 1X se prepara como una dilución de este amortiguador concentrado

- Disolver lo siguiente en 800 ml de agua destilada
 - 80 g de NaCl
 - 2 g de KCl
 - 14.4 g de Na₂HPO₄
 - 2.4 g de KH₂PO₄
- Ajustar el pH a 7.4
- Ajustar el volumen a 1 l con agua destilada adicional
- Esterilizar por autoclave

4. Mezcla de inhibidores de proteasas.

La mezcla de inhibidores se prepara en PBS 1X al momento, a las siguientes concentraciones

- 2 mM fenil-metil-sulfonil fluoruro (PMSF), de un stock 100 mM en etanol absoluto
- 0.1 mM N β-p-tosyl-L-lisina cloro-metil cetona (TLCK), stock 10 mM en agua deionizada
- 1 mM EDTA, stock 100 mM en agua deionizada
- 0.2 mM leupeptina, stock 20 mM en agua deionizada

Las soluciones stock se almacenan en alícuotas de 20 µl a -20°C

5. Solución bloqueadora 5%: leche descremada

- Disolver lo siguiente en 20 ml de agua destilada
 - 1.5 g de leche descremada
 - 3 ml de PBS 10X
 - 150 µl de Tween 20
- Ajustar el volumen a 30 ml con agua destilada adicional
- Esta solución debe usarse fresca o almacenarse por corto tiempo a 4°C

6. Solución bloqueadora 1% leche descremada PBS 1X, Tween 20

- Disolver lo siguiente en 10 ml de agua destilada
 - 0.2 g de leche descremada
 - 2 ml de PBS 10X
 - 100 µl de Tween 20
- Ajuste el volumen a 20 ml con agua destilada adicional
- Esta solución debe usarse fresca o almacenarse por corto tiempo a 4°C

7. TBS 1X

- Disolver lo siguiente en 800 ml de agua destilada
 - 8 g de NaCl
 - 0.2 g de KCl
 - 3 g de Tris base
- Ajustar el pH a 7.4 con HCl
- Ajustar el volumen a 1 l con agua destilada adicional
- Esterilizar por autoclave

8. Solución de magnesio

La mezcla de los compuestos para la solución de magnesio se hace en agua destilada, se puede mantener a 4°C y se ajusta para un pH de 9.5, a las siguientes concentraciones

- 100 mM de Tris-Cl; stock 2M en agua destilada
- 100 mM de NaCl; stock 5M en agua destilada
- 20 mM de MgCl₂; stock 2M en agua destilada

9. Solución de prehibridación/hibridación (SPH)

La mezcla de la solución se prepara al momento en agua destilada a temperatura ambiente con las concentraciones señaladas:

- SSC 6X; stock a 20X en agua destilada

- Solución de Denhardt 5X; stock a 50X (apéndice 13.2) almacenado en alícuotas de 50 ml a -20°C
- 0.1% SDS, stock a 10%, en agua destilada

10. SSC 20X

Las soluciones de trabajo SSC 10X, SSC 6X, SSC 2X son preparadas como diluciones de este amortiguador concentrado

- Disolver lo siguiente a 900 ml de agua destilada
 - 175.3 gr de NaCl
 - 88.2 gr de citrato de sodio
- Ajustar el pH a 7 con NaOH 1N
- Ajustar el volumen a 1 l con agua destilada
- Esterilizar por autoclave

11. Listado de secuencias consideradas positivas en el macroarreglo.

Descripciones InterPro	ID GDAV	Valor	Posición
Repetido rico en leucina	EV409186	6	D4
Defensina	EV407402	6	G11
Defensina	EV407485	5	A12
Receptor de α -2-macroglobulina	EV409059	5	B6
Receptor de superficie celular de IPT/TIG	EV408998	4	D6
Repetido rico en leucina		4	C3
Región adyacente Bromo	EV409975	4	C8
Sito de unión de FAD/NAD(P)	EV409881	3	H2
Ferritina	EV409972	3	B3
Fibrinógeno, cadena alfa/beta/gamma	EV410042	3	D3
Familia helicasa DNA2/NAM7	EV409141	3	B4
GTPasa Ras	EV409319	3	B5
Receptor de α -2-macroglobulina	CL338Contig1	3	F5
Inmunoglobulina grupo I y V, tipo C1		3	G5
Fosfatidilinositol 3- and 4-cinasa(PIK related kinase), con dominio FATC	EV408982	3	C6
Peroxidasa	CL50Contig1	3	E6
Caja DEAD/DEAH, Helicasa dependiente de ATP	EV406189	3	F6
Glutación S-transferasa N y C terminal,	CL340Contig1	3	B7

dominio gamma eEF1

Reverso transcriptasa	EV406328	3	F7
Fosfatidilinositol fosfolipasa C (PLC)	EV406694	3	G8
Proteína G subunidad α	EV406714	2	H8
Superóxido dismutasa	CL332Contig1	2	A9
Quimiotripsina, Peptidasa S1 y S6	CL1Contig22	2	A10
Lectina tipo C	EV406471	2	D8
Proteinasa inhibidora I4, serpina	EV409594	2	A1
Muskelina	EV409601	2	B1
Modulador esencial NF kappa B	EV409621	2	D1
Glutación-S-transferasa, N terminal	EV410043	2	E3
Proteínas del grupo de alta movilidad. HMG1/2 (high mobility group) box	EV410065	2	F3
Subunidad RPB5 de la RNA polimerasa	EV410066	2	G3
Glutación-S-transferasa N y C terminal	EV409149	2	C4
Saposina tipo A y B	EV406247	2	C7
Cierre de leucina	EV406270	2	D7
Unión de quitina peritrofina-A		1	C5
Caja DEAD/DEAH, N-terminal	EV409469	1	D5
Unión de quitina peritrofina-A	CL30Contig2	1	C2
Componente del complejo CCR4-Not	EV409805	1	D2
Motivo de reconocimiento de RNA	EV409818	1	E2
Quimiotripsina, Peptidasa S1 y S6	EV409823	1	F2
Proteína cinasa Serin/threonina	Sin registro	1	F1
Proteína fosfatasa Serin/threonina y bis(5-nucleosyl)-tetrafosfatasa	Sin registro	1	G1
Dedos de Zinc, tipo C2H2	EV409648	1	H1
Antígeno CD9/CD37/CD63	EV409619	1	C1
Citocromo C oxidasa, subunidad VIIa	EV409040	1	H5
Escramblasa	EV409207	1	G4
Glutación peroxidasa	CL255Contig1	1	H4

12. Lista enriquecida con nuevas secuencias y sus descripciones.

Clona	Descripción Interpro	Clave Interpro/GDAV
ALB_23P05_F	Citocromo C oxidasa, subunidad VIIa	IPR003177
ALB_25G03	Proteína con dominio14-3-3	IPR000308
ALB_25E08	Peptidasa S1 and S6, quiomitripsina/Hap Peptidasa S1A	IPR001254IPR001314
ALB_23M02_F	Peptidasa S28	IPR008758
ALB_25P23	Región parecida a EGF	IPR013032
ALB_25F21	Histona H5	IPR005819
ALBGS_04H09_F	Ferritina y Dps parecido a ferritina	IPR008331
ALB_02M03	Dedos de Zinc, tipo AN1	IPR000058
ALB_25F22	Ubiquitina	IPR000626
ALB_25K23	NADH-ubiquinona oxidoreductasa subunidad b14.5b	IPR009423
ALBGS_04D02_F	Factor de ribosilación con ADP, ARF/SAR, GTPasa Ras Parecida a Miro	IPR006688IPR006689IPR001806IPR013684IPR013753
ALB_23C05_F	Tropomiosina locus 6	IPR000533IPR007019
ALB_02L18	Fosfatasa específicas Serina/threonina y bis(5-nucleosil)-tetrafosfatasa, Metallofosfoesterasa	IPR006186IPR004843
ALB_02G08	Peptidasa M17 extremo C-terminal, leucil aminopeptidasa,	IPR000819IPR000169
ALB_02O08	5'-Nucleotidasa y apirasa, Metallofosfoesterasa	IPR006146IPR006179IPR004843IPR008334
ALB_25K04	Proteína de función desconocida DUF227	IPR004119
ALB_23F21_F	Enzima de restricción Tipo III, subunidades	IPR006935
ALB_02N22	Purina/pirimidina fosforibosil transferasa, Orotidina 5'-fosfato descarboxilasa	IPR002375IPR001754IPR000836
ALB_02F01	Proteína de transporte de lípidos, fragmento N-terminal	IPR001747IPR001747IPR001846IPR001846IPR001747IPR001846
ALB_25B14	Receptor adrenérgico, α -1A,GYF	IPR000363,IPR003169
ALB_23K11_F	DNA polimerasa subunidad ϵ B	IPR007185
ALBGS_04F14_F	Nucleoplasmina	IPR004301

ALB_25A09	RNA polimerasa Rpb1, dominio 1 ,	IPR007080IPR000722IPR007066IPR007083IPR007081
ALB_25H13	Estimulador de disociación de nucleótido Guanina- CDC25, parecido a Pleckstrina	IPR001895,IPR001849
ALBGS_04F20_F	Componente del Proteosoma región PCI	IPR000717
ALB_23J09_F	Glutaredoxina	IPR011767,IPR002109
ALBGS_04P19_F	Tetratricopéptido TPR_1 y TPR_2, Tetratricopéptido	IPR001440,IPR013105IPR013026
ALB_02G18	Péptidoglicano de unión a Lisina	IPR002482
ALBGS_04N11_F	PSP, región rica en prolina	IPR006568
ALB_02O07	Secuencia de transporte al retículo endoplásmico	IPR000886
ALB_02K02	Iniciador de la transcripción Spt4	IPR009287
ALB_25M18	Dominio de thioredoxina; Proteína de función desconocida DUF1000	IPR006662;IPR013766;IPR010400
ALB_02F10	PfkB	IPR011611
ALB_02K12	Proteína del grupo de alta movilidad HMG14 y HMG17, proteína ribosomal L14	IPR000079,IPR002784
ALB_23F03_F	Proteína Ribosomal L23, proteína anticongelamiento, tipo I, Histona H5, alérgeno del Polen Poa pIX/Phl pVI, fragmento C-terminal	IPR001014;IPR000104;IPR005819;IPR001778;IPR009148;IPR005633;IPR013025
ALBGS_04P09_F	Alérgeno Ves , alérgeno relacionado a V5/Tpx-1	IPR002413IPR001283IPR014044
ALBGS_04D10_F	Proteína de membrana GNS1/SUR4	IPR002076
ALB_23A01_F	Peptidasa S1 y S6, quimiotripsina/Hap Peptidasa S1A, alérgeno de Polen Poa pIX/Phl pVI, fragmento C-terminal	IPR001254IPR001314IPR001778
ALB_02N24	Proteína de unión a quitina Peritrofina-A	IPR002557
ALB_25L18	Parecido a Pleckstrina, unión a lípidos START	IPR001849,IPR002913
ALB_25D20	Nucleósido difosfato cinasa	IPR001564
ALB_25K21	Osteopontina, factor de transcripción factor CBF/NF-Y/ histona arqueal	IPR002038,IPR003958
ALB_23A04_F	Inmunoglobulina grupo I, Inmunoglobulina grupo V, parecido a Inmunoglobulina	IPR007110,IPR000354

ALB_23G24_F	Inmunoglobulina grupo I, Inmunoglobulina grupo V, parecido a Inmunoglobulina	IPR007110,IPR 013106,IPR013 098
ALB_02C16	Proteína de función desconocida DUF757	IPR008476
ALBGS_04J06_F	Alérgeno Ves , alérgeno relacionado a V5/Tpx-1	IPR001283,IPR 002413,IPR014 044
ALBGS_04J13_F	Proteína de función desconocida DUF1397	IPR009832
ALBGS_04H02_F	Ubiquitina, proteína ribosomal L40e	IPR000626,IPR 001975
ALB_25B13	Dedos de Zinc , tipo RING	IPR001841
ALB_25J13	Homología a Src-3, factor citológico 2 de neutrofilos , Espectrina cadena α , Cdc15/Fes/CIP4, variante SH3	IPR001452IPR 000108IPR013 315IPR001060I PR011511
ALB_25J16	Citocromo P450 clase E, grupo I II, CYP3A	Sin registro
ALB_02M22	Citocromo P450 clase E,B, grupo I, II,IV, CYP3A	IPR001128IPR 002401IPR002 402IPR002403I PR002397IPR0 08072
ALB_23B11_F	eRF1 dominios 1, 2 y 3	IPR005140IPR 005141IPR005 142
ALB_02A11	Peptidasa S1A, quimiomotripsina, Peptidasa S1 y S6, quimiotripsina/Hap	IPR001254,IPR 001314
ALB_23E05_F	Peptidasa S1A, quimiomotripsina, Peptidasa S1 y S6, quimiotripsina/Hap	IPR001254,IPR 001314
ALB_25B04	Helicasa dependiente de ATP, proteína del cascaron de huevo, Caja de helicadas DEAD/DEAH fragmentos N y C-terminal RNA helicasa motivo Q	IPR000629IPR 002952IPR011 545IPR001650I PR014014
ALBGS_04H23_F	Peptidasa T1A, proteosoma beta- subunidad 20S, subunidad A y B	IPR000243IPR 001353
ALB_23C03_F	Peptidasa S1A, quimiomotripsina, Peptidasa S1 y S6, quimiotripsina/Hap	IPR001254IPR 001314
ALB_02N20	Proteína inhibidora I1, tipo Kazal	IPR002350IPR 001239IPR011 497
ALB_02I16	Peptidasa S1A, quimiomotripsina, Peptidasa S1 y S6, quimiotripsina/Hap	IPR001314IPR 001254
ALB_02D10	Proteína de unión a quitina Peritrofina-A	IPR002557
ALB_23O04_F	Complejo proteínico 1 LYR	IPR008011

ALB_02A02	RNA polimerasa Rpb5, fragmento N-terminal	IPR000783IPR005571
ALB_02C24	Repetido WD-40	IPR001680
ALBGS_04B04_F	Peroxidasa hemática animal	IPR002007
ALBGS_04N08_F	5'-Nucleotidasa fragmentos C y N-terminal y apirasa , Metalofosfoesterasa	IPR006146IPR006179IPR004843IPR008334
ALB_23H08_F	Aldo/ceto reductasa	IPR001395
ALB_25D12	GTP1/OBGNGP1, N-terminal, proteína de unión a GTP, relacionado a HSR1	IPR006073IPR012971IPR002917
ALB_23D08_F	Complejo proteínico 1 LYR	IPR008011
ALB_23N19_F	Unión a actina, tipo cofilin/tropomiosina	IPR002108
ALB_25H15	Proteína ribosomal , L21e, Peptidasa S1A, quimiomotripsina, Peptidasa S1 y S6, quimiotripsina/Hap	IPR001147IPR001254IPR001314
ALB_02A04	Actividad de endopeptidasa tipo serina-proteasa	IPR001254
alb_03h07_f	Repetido rico en leucina	EV409186
ALBINT_03H02_R	Defensina	EV407402
ALBINT_03M21_R	Defensina	EV407485
ALBSCV_03A10_F	Receptor de A-macroglobulina, Alfa-2-macroglobulina, A-macroglobulina, componente del complemento, fragmento N-terminal.	EV409059
alb_scvc11_f	Receptor de la superficie celular de IPT/TIG	EV408998
albgs_01O20_r	Repetido rico en leucina subtipo típico, receptor de interleucina-1, tipo I/ Precursor de Toll, Tiolasa , receptor Toll-Interleucina	Sin registro
alb_21O12f	Región adjacente Bromo AAA, ATPasa	EV409975
alb_21H24f	Flavoproteína piridin nucleótido citocromo reductasa, Flavodoxina/óxido nítrico sintasa, fenol hidroxilasa reductasa, Oxidoreductasa de unión a FAD/NAD(P)	EV409881
alb_21O03f	Ferritina y Dps , parecido a Ferritina	EV409972
alb_27e08_f	Fibrinógeno, cadenas alfa/beta/gamma , fragmento globular C-terminal	EV410042
alb_03e01_f	Familia de helicasas DNA2/NAM7	EV409141
alb_04a17_f	Ras GTPasa, proteína nuclear de unión a GTP Ran	EV409319
alb_04m22_f	Receptor de A-macroglobulina, Alfa-2-macroglobulina, A-macroglobulina , componente del complemento,	CL338Contig1

fragmento N-terminal		
alb_scv2a08_f	Inmunoglobulina grupo I, Fibronectina, tipo III, Inmunoglobulina /complejo mayor de histocompatibilidad, Inmunoglobulina grupo V, tipo C1	Sin registró
ALBSCV_01A07_F	Cinasa relacionada a PIK, FATC, FAT, región Tetratricopeptido, HEAT, sintetasa y ligasa dependiente de AMP, fosfatidilinositol cinasa 3 y 4-	EV408982
albgs_01A04_r	Peroxidasa hemática animal	CL50Contig1
albgs_01E05_r	Helicasa dependiente de ATP, caja de helicasas DEAD/DEAH	EV406189
albgs_01H04_r	Factor de elongación 1, cadena gamma, Glutación S-transferasa, fragmentos C-terminal y N-terminal	CL340Contig1
albgs_01L23_r	RNA polimerasa dependiente de DNA (Reverso transcriptasa)	EV406328
albgs_03c20_f	Fosfolipasa C especifica de fosfatidilinositol (PLC), región X, domino Y	EV406694
albgs_03e19_f	Proteína G subunidad α , grupo Q, grupo 12, grupo I,	EV406714
albgs_03m22_f	Superoxido dismutasa, unión a cobre/zinc	CL332Contig1
alb_18b05_f	Peptidasa S1 y S6, quimiotripsina/Hap	CL1Contig22
albgs_02E05_r	Lectina Tipo C	EV406471
alb_18b18_f	Proteinasa inhibidora I4, Serpina	EV409594
alb_18c10_f	Muskelina, fragmento N-terminal, repetido Kelch, factor de Coagulación tipo 5/8, fregmento C-terminal,	EV409601
alb_18e01_f	Esencial modulador NF kappa B	EV409621
alb_27e09_f	Glutación S-transferasa, fragmento N-terminal	EV410043
alb_27g01_f	Proteínas del grupo de alta movilidad HMG1y HMG2, caja HMG1/2 (grupo de alta movilidad)	EV410065
alb_27g02_f	RNA polimerasa Rpb5, fragmento N-terminal	EV410066
alb_03e13_f	Glutación S-transferasa, fragmentos N-terminal y C-terminal	EV409149
albgs_01H15_r	Saposina B tipo A y B, dedos de Zinc tipo C2H2,	EV406247
albgs_01I18_r	Cierre básico de leucinas	EV406270
alb_04f01_f	Proteína de unión a quitina Peritrofina-A	Sin registro

alb_04j24_f	Caja de helicasas DEAD/DEAH, fragmento N-terminal	EV409469
alb_18n02_f	Proteína de unión a quitina Peritrofina-A	CL30Contig2
alb_21B20f	Componente del complejo CCR4-Not, Not1, Lectina de leguminosa dominio beta	EV409805
alb_21C23f	Región de unión al RNA RNP-1 (motivo de reconocimiento de RNA)	EV409818
alb_21D14f	Peptidasa S1 y S6, quimiotripsina/Hap, Proteína de unión a quitina Peritrofina-A, Peptidasa S1A, receptor de lipoproteína de baja densidad, clase A	EV409823
alb_18f06_f	Proteína Serina/threonina cinasa, sitio activo, proteína Tirosina cinasa.	Sin registró
alb_18f19_f	Región tetratricopeptido ,Metalofosfoesterasa, proteína fosfatasa, Serina/threonina y bis(5-nucleosil)-tetrafosfatasa, PPP5, Tetratricopeptido TPR_2 y TPR_1	Sin registro
alb_18g02_f	Proteína anticongelamiento, tipo I, Kv1.4 canal de K+ regulado por voltaje, cisteína peptidasa, sitio activo, BTB, proteína del cascarón, dedos de Zinc, tipo C2H2, BTB/POZ	EV409648
alb_18d22_f	Antígeno CD9/CD37/CD63	EV409619
ALBSCV_02_F07	Citocromo c oxidasa, subunidad VIIa	EV409040
alb_03i20_f	Región rica en Prolina, Rhodopsina de molusco cola C-terminal , Escramblasa	EV409207
alb_03p04_f	Glutación peroxidasa	IPR000889
alb_21C23f	Región de unión al RNA RNP-1 (motivo de reconocimiento de RNA)	IPR000504
alb_3m13_f	Factor tisular	IPR001187
alb_4a07_f	Citocromo c oxidasa, subunidad Va	IPR003204
alb_4m03_r	HCaRG	IPR009886
alb_scva06_f	Proteína de unión a quitina Peritrofina-A	IPR002557
alb_scvb08_f	Superfamilia ARF/SAR, Ras GTPasa	IPR006689, IPR001806
alb_scvc01_f	CUB	IPR000859
albgs_1F02r	CybS	IPR007992
albgs_1M12r	Peroxidasa hemática animal	IPR002007
albgs_2E07_r	Variante SH3, union a Calcio Mano EF, homología a Src 3, factor citósolico 2 de Neutrofilos, repetido de Espectrina	IPR002048
albgs_2J18_r	Ferredoxina, Adrenodoxina	IPR001041
albgs_3m11_f	Lectina parecida a proteína de leguminosas	IPR005052

ALB_03H19	Atacina	EV409193
ALB_27H21	Cecropina	EV410192
ALB_27P21	Cecropina	EV410089
ALBINT_01J14	Cecropina	EV407002
ALBINT_01L04	Defensina	EV407029
ALBINT_02A08	Cecropina	EV407092
ALBINT_02A24	Cecropina	EV407102
ALBINT_02C03	Cecropina	EV407118
ALBINT_02F15	Defensina	EV407166
ALBINT_03G24	Defensina	EV407400
ALBINT_03H01	Defensina	EV407401
ALBINT_03L01	Cecropina	EV407458
ALBINT_03O07	Defensina	EV407503
ALBINT_05G20	Defensina	EV407542
ALBINT_05I17	Defensina	EV407545
ALBSCV_01H10	Cecropina	EV409013
ALBSCV_03H08	Gambicina	EV409086
FBO8G5402FUHN6	TEP8	AGAP010831
FBO8G5402ILIQL	TEP3	AGAP010816
FBO8G5401EIGHV	REL2	AGAP006747
ALB_20G17_F_ab1	Glutación S transferasa 2	AGAP000888
contig04100	CPR74,CRP75,CPR133	Sin registro
contig04471	CPR73,CPR74,CRP75	Sin registro
contig02540	CPR73,CPR74,CRP75,CPR133	Sin registro
contig00202	Peroxidasa 9	AGAP010734
contig03933	TEP3,TEP17,TEP8,TEP9	Sin registro
contig00571	TEP3,TEP17,TEP8,TEP9	Sin registro
contig01744	TEP3,TEP17,TEP8,TEP9	Sin registro
contig01665	Galectina 5	AGAP011287

13. Amortiguador de carbonatos 0.1 M

- Disolver en 80 ml de agua destilada lo siguiente
 - 0.136 gr de carbonato de sodio
 - 0.735 gr bicarbonato de sodio
- Ajuste el pH a 9.2 con HCl o con NaOH
- Ajustar el volumen a 100 ml con agua destilada adicional

14. Preparación de Orto Fenil Diamina (OPD) para el ensayo de ELISA.

Se agregan 6 mg de OPD en 12 ml de amortiguador de citratos, o en caso de presentarse en tabletas añadir 1 tableta a mismo volumen del amortiguador de citratos

Antes de usarse añadir 120 µl de H₂O₂ comercial para se encuentre en la mezcla al 0.03%

Mantener protegido de la luz hasta el momento de su uso

15. ELISA Wash 20X

La solución ELISA Wash 1X es preparada como dilución de este amortiguador concentrado

- Disolver en 80 ml de agua destilada lo siguiente
 - 0.5125 gr de NaH₂PO₄
 - 2.3125 gr de Na₂HPO₄
- Añadir al final 17.525 gr y 1ml de Tween 20
- Checar el pH 7.2-7.4
- Ajustar el volumen a 100 ml con agua destilada adicional

16. Amortiguador de lisis de células eucariotas

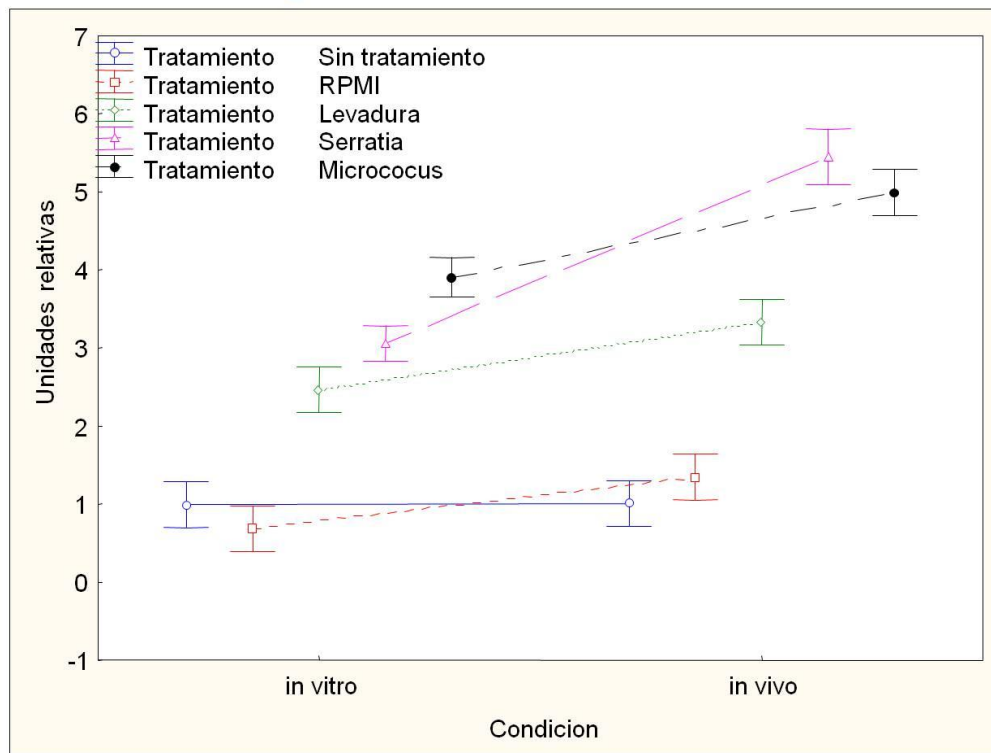
La mezcla de los reactivos para el amortiguador se hace a temperatura ambiente en agua destilada se ajusta el pH a 8.0 con NaOH IN a las siguientes concentraciones

- 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, stock 2M en agua destilada
- 25 mM EDTA, stock 100 mM en agua destilada
- 100 mM NaCl, stock 5M en agua destilada
- 0.5% de SDS, stock 10% disuelto en agua destilada

Esta mezcla se conserva a temperatura ambiente. Añadir en hielo y sólo antes de usarse 1 mg/ml proteinasa K

17. Grafica de análisis estadístico de incorporación relativa de BrdU

Comparación entre distintas condiciones de la incorporación relativa de BrdU



18. Representación esquemática de la ubicación del cuerpo graso y el corazón dentro del mosquito

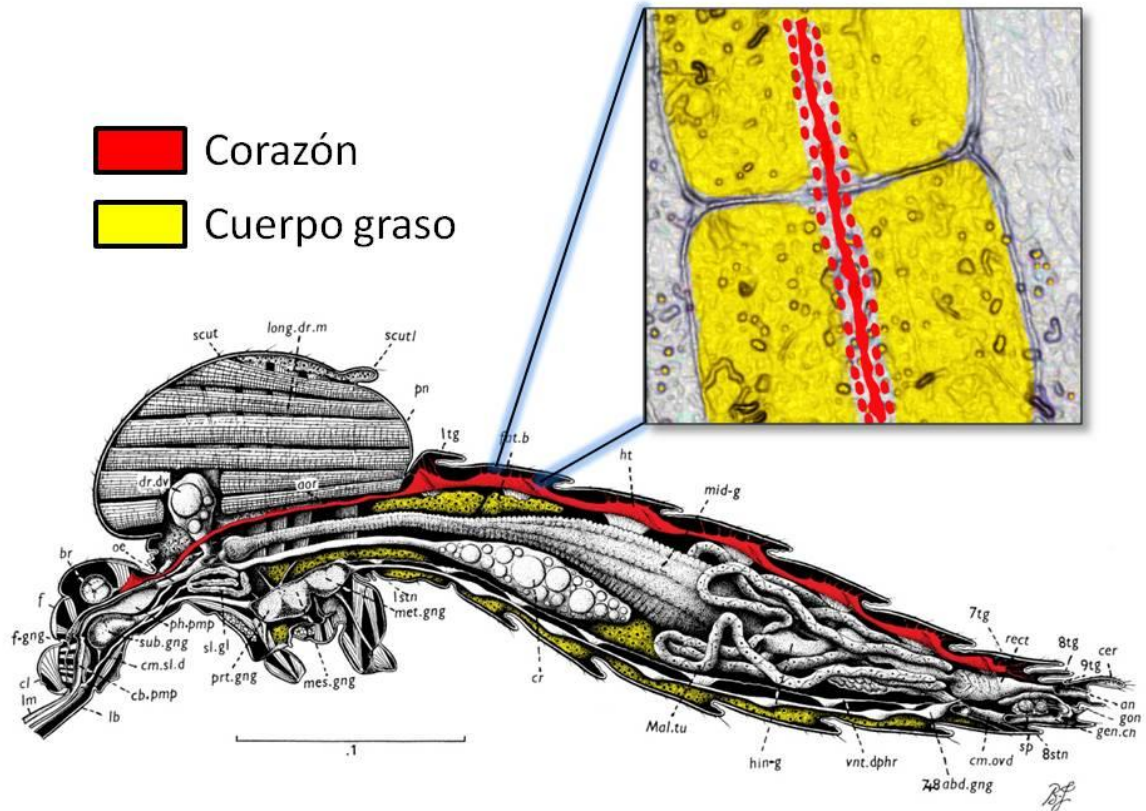


Fig. 138 *Aedes aegypti*, ♀; general organisation.

Copyright ©1985 Wellcome Trust

Figura suplementaria. En la figura se muestra la organización general del mosquito en un corte sagital. El corazón del mosquito en la parte abdominal se puede identificar como una serie de células de forma ovalada en dos cordones, el corazón completo recorre desde la parte anterior hasta la parte posterior, en la figura esta resaltado en color rojo. El cuerpo graso se encuentra distribuido en todo el cuerpo del mosquito aquí se presenta tanto en la parte dorsal como en la ventral, en la figura esta resaltado en color amarillo.