



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOMEDICINA

**MODULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE INNATA POR EL ENDOCICLO
CELULAR EN *ANOPHELES ALBIMANUS*, VECTOR DE ENFERMEDADES**

INFECCIOSAS

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ING. BIOTEC. TOSCANO SALAZAR MICHELLE ADELINA

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: VALVERDE GARDUÑO BERTHA VERÓNICA.D. PHIL (OXON.)

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA, INSP

COMITÉ TUTOR: DRA. SEGURA VALDEZ MARIA DE LOURDES

FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

DRA. CALDERÓN CORTÉS NANCY

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES, UNIDAD MORELIA, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., DICIEMBRE, 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOMEDICINA

**MODULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE INNATA POR EL ENDOCICLO
CELULAR EN *ANOPHELES ALBIMANUS*, VECTOR DE ENFERMEDADES**

INFECCIOSAS

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ING. BIOTEC. TOSCANO SALAZAR MICHELLE ADELINA

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: VALVERDE GARDUÑO BERTHA VERÓNICA.D. PHIL (OXON.)

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA, INSP

COMITÉ TUTOR: DRA. SEGURA VALDEZ MARIA DE LOURDES

FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

DRA. CALDERÓN CORTÉS NANCY

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES, UNIDAD MORELIA, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., DICIEMBRE, 2023

COORDINACIÓN GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO
COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
ENTIDAD (FACULTAD DE MEDICINA)
OFICIO: CGEP/CPCB/FMED/0816/2023
ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **19 de junio de 2023** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biomedicina** de la estudiante **TOSCANO SALAZAR MICHELLE ADELINA** con número de cuenta **522461479** con la tesis titulada **“MODULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE INNATA POR EL ENDOCICLO CELULAR EN ANOPHELES ALBIMANUS, VECTOR DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS”**, realizada bajo la dirección de la **DRA. BERTHA VERÓNICA VALVERDE GARDUÑO**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. ROGELIO ALEJANDRO ALONSO MORALES
Vocal: DR. SANTIAGO MARTÍNEZ CALVILLO
Vocal: DR. TOMÁS NEPOMUCENO MEJÍA
Vocal: DRA. MARÍA DE LOURDES GUTIÉRREZ XICOTÉNCATL
Secretario: DRA. MARÍA DE LOURDES SEGURA VALDEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 17 de octubre de 2023

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



c. c. p. Expediente del alumno

AGNS/RCHT/EARR/rcht

Agradecimientos institucionales

Agradezco al posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México por la oportunidad de ser parte de su programa de estudio y brindarme los recursos necesarios para una graduación oportuna.

Agradezco a CONAHCyT (número de CVU 1151748) por la beca otorgada durante mi periodo de formación como maestra en Ciencias Biológicas.

Agradezco a mi tutora principal Dra. Verónica Valverde Garduño por aceptarme en su laboratorio en el Instituto Nacional de Salud Pública como estudiante de posgrado, por brindarme todo lo necesario para cumplir con el avance de mi proyecto, por su dirección, apoyo, consejo y confianza durante este periodo de aprendizaje.

Agradezco a mis tutoras del Comité tutorial: Dra. Nancy Calderón y Dra. Lourdes Segura por su apoyo, disponibilidad y confianza que depositaron en mi para cumplir con el avance de mi proyecto de tesis.

Agradecimientos a título personal

En primer lugar, quiero dar gracias a Dios por presentarme caminos que conllevaron a la oportunidad de una graduación oportuna, y a su vez me ha dado las fuerzas para seguir adelante junto con personas que han llegado a ser parte mi experiencia lejos de mi tierra natal.

Agradezco al Instituto Nacional de Salud Pública y al Centro de Investigaciones Sobre Enfermedades Infecciosas por utilizar sus instalaciones para elaborar el proyecto de investigación.

Agradezco a American Society of Tropical Medicine and Hygiene que otorgó el Gorgas Memorial Institute Research Award a la Dra. Verónica Valverde en colaboración con el Dr. Bruce M. Christensen para establecer una línea de estudios de competencia vectorial mediante genética reversa (2007).

Es grato para mi agradecer a mis seres queridos, mi familia y mis amigos que estuvieron ahí para apoyarme, especialmente a mi madre Ligia, a mis abuelitos Jonás y Yolanda, a mis hermanos Víctor y Giselle, a mi cuñado Francis.

Agradezco a mis tres tutoras: Dra. Verónica, Dra. Nancy y Dra. Lourdes, por apoyarme en todo el proceso de titulación y en el avance de mi proyecto durante los cuatro semestres de la maestría.

Un especial agradecimiento a la Dra. Verónica Valverde por su activa ayuda, consejo y tutoría durante mi estancia.

Quiero agradecer a mis compañeras del laboratorio, en especial a la Dra. Heidi Gabriela por su tutoría durante todo el programa académico. Gracias por sus consejos y recomendaciones laborales y personales.

Finalmente, estoy agradecida con mi papi Jaimucho, con mi abuelito Manuel y con mi abuelita Adelina, con mi mejor amigo Raúl que me cuidan y me bendicen desde el cielo.

ÍNDICE

Resumen	1
Abstract.....	3
1. Introducción.....	5
1.1. Paludismo o malaria	5
1.2. Características biológicas de los mosquitos del género <i>Anopheles</i>	8
1.3. Sistema inmunitario de mosquitos	10
1.3.1. Sistema inmune innato.....	10
1.3.2. Barreras físicas.....	10
1.3.3. Barreras fisiológicas.....	11
1.3.4. Bases moleculares del sistema inmune innato	11
2. Antecedentes.....	14
2.3. Mecanismo de memoria en el sistema inmunitario de los mosquitos.....	14
2.3.1. El aumento de material genético en respuesta frente a un patógeno	15
2.4. Regulación del ciclo celular	17
2.5. Endorreplicación o endociclo	20
2.5.1. Endorrepliación en dípteros.....	22
2.6. Gen Hindsight (<i>hnt</i>) en la endorreplicación en <i>Drosophila</i>	25
3. Hipótesis y objetivos	29
4 Metodología	30
4.1 Crianza de mosquitos <i>A. albimanus</i>	30
4.1.1 Eclosión de los huevos.....	30
4.1.2 Mantenimiento de las larvas.....	30
4.1.3 Colecta de pupas.....	30
4.1.4 Mantenimiento de mosquitos adultos	30
4.2 Búsqueda e identificación del gen <i>hnt</i> en <i>D. melanogaster</i> y <i>A. albimanus</i> mediante las bases de datos Flybase y Vectorbase	31
4.3 Extracción de DNA genómico <i>A. albimanus</i>	31
4.4 Obtención de RNAi de los genes: proteína verde fluorescente (GFP) y <i>hnt</i>	32
4.4.1. Obtención de DNA molde GFP por plásmido	33
4.4.2. Obtención de DNA molde <i>hnt</i> por DNA genómico.....	34
4.4.3. Adición de la secuencia promotor T7 al extremo 5' de los cebadores sentido y antisentido.....	35
4.4.4. Purificación de los productos de PCR de la secuencia molde GFP.....	37
4.4.5. Transcripción <i>in vitro</i> de las dobles cadenas de RNA de GFP y <i>hnt</i>	37
4.5. Microinyección de RNAi de GFP y <i>hnt</i> a mosquitos para silenciamiento génico	38

4.6.	Extracción de RNA total, cuantificación y síntesis de cDNA	40
4.7.	Cuantificación relativa por PCR en tiempo real.....	41
4.7.1.	Cálculos de normalización por medio del método delta delta Ct.....	43
4.8.	Reto inmunológico en mosquitos con silenciamiento	44
5.	Resultados.....	46
5.1.	Identificación del ortólogo del gen <i>hnt</i> en el genoma de <i>A. albimanus</i>	46
5.1.1.	Búsqueda in silico del gen <i>hnt</i> en el genoma de <i>D. melanogaster</i>	46
5.2.	Síntesis de RNAi	49
5.3.	Microinyección de mosquitos con RNAi	51
5.4.	Análisis de la expresión de genes	52
5.4.1.	Análisis de la expresión relativa del gen <i>hnt</i> a partir del intestino de mosquitos silenciados.	52
5.4.2.	Efecto del silenciamiento de <i>hnt</i> sobre la expresión de genes de inmunidad .	54
6.	Discusión	56
7.	Conclusiones	61
8.	Perspectivas	62
9.	Referencias bibliográficas	63
10.	Anexos.....	72

Resumen

Las enfermedades transmitidas por vectores son un problema de salud pública a nivel mundial. La malaria es una enfermedad transmitida por mosquitos del género *Anopheles* y causada principalmente por *Plasmodium falciparum* y *P. vivax*. El sistema inmune innato de los mosquitos responde fuertemente con mecanismos de defensa contra los patógenos que ingresan en su organismo. Una de las maneras para defenderse es la liberación de péptidos antimicrobianos (PAMs). En diferentes estudios se han reportado que la cantidad de DNA genómico aumenta cuando se expone al mosquito a patógenos, y al mismo tiempo los genes que codifican a PAMs aumentan como parte de la respuesta inmune. En este contexto, existe un proceso biológico conocido como endorreplicación (la célula realiza síntesis de DNA pero no entra a mitosis). Además, se ha mostrado que la síntesis de DNA aumenta después de una segunda exposición al mismo patógeno. Esto sugiere una posible modulación de la respuesta inmune por parte del endociclo celular. Por otro lado, se ha encontrado que en la respuesta inmune de *Anopheles albimanus* está co-expresado el gen *hnt*, factor clave en el cambio del ciclo celular canónico a endociclo. Por lo que, cabe la posibilidad de que al afectar al endociclo celular se verá afectada la respuesta inmune.

Para conocer si la endorreplicación modula la respuesta inmune innata se realizó atenuación de la expresión del gen *hnt* que se requiere para el inicio del endociclo celular. Esta atenuación se hizo mediante genética reversa como estrategia experimental. La genética reversa se aplica para dilucidar la función de un gen de interés por medio de ingeniería genética. A partir de la modificación y/o interrupción de un gen o producto génico se logra el objetivo de conocer la función del gen blanco. La técnica para aplicar esta estrategia fue RNA interferente (RNAi). El RNAi es un proceso que ocurre naturalmente dentro de las células, involucrado en la regulación postranscripcional. Este proceso inhibe la expresión de un gen blanco mediante RNA de doble cadena (RNAi).

La estrategia metodológica que se aplicó para cumplir con los objetivos planteados en el presente proyecto fue: encontrar el ortólogo de *hnt* de *D. melanogaster* en mosquito *A. albimanus* por medio de bases de datos como Flybase y Vectorbase. Se sintetizó RNA interferente para silenciar a *hnt* en *A. albimanus*. Con el RNAi se realizó el silenciamiento del gen *hnt* que se corroboró por RT-qPCR. En mosquitos con silenciamiento se aplicó un reto inmunológico con *Micrococcus luteus*, y se observó una disminución en la expresión de los genes de inmunidad gambicina y cecropina.

Los resultados que se obtuvieron fueron: el 96% de silenciamiento en la expresión relativa de *hnt* y la baja expresión relativa de los genes de inmunidad (cecropina y gambicina) en intestino de mosquitos retados debido a la atenuación de *hnt*. La aplicación del RNAi para el silenciamiento de *hnt* fue exitoso. La baja expresión y la posible pérdida de la función de *hnt*, interfirió en el proceso normal de encendido de endociclo. Luego de la interferencia provocada en el gen *hnt*, en mosquitos silenciados se logró analizar si el proceso de endorreplicación es requerido para la expresión de genes de la respuesta inmune innata cuando estos son expuestos a un reto inmunológico, en este caso con bacterias muertas. Se concluye con la aceptación de la hipótesis planteada, es decir que se requiere la activación de *hnt* en la que se indica que existe una relación entre proceso de endorreplicación y el sistema inmune innato de los mosquitos *A. albimanus*.

Abstract

Vector-borne diseases are a global public health problem. Malaria is a disease transmitted by mosquitoes of the genus *Anopheles* and caused mainly by *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. The innate immune system of mosquitoes contributes to a strong response against pathogens that enter their body. One of the ways mosquitoes defend themselves is the release of antimicrobial peptides (AMPs). It has been reported that the amount of DNA increases when the mosquito is exposed to pathogens, and a possible consequence of this phenomenon is that the genes encoding AMPs increase proportionally at the same time. In this context, there is a biological process known as endoreplication that could be related to immune system, as there is evidence that DNA synthesis increases after a second exposure to the same pathogen. In turn, it has been found in this co-expressed response to the *gene hnt*, a key factor in the change of the canonical cell cycle to endocycle. Therefore, it is possible that *hnt*, one of the factors involved in endoreplication influences the expression of genes of innate immune response.

To determine whether the innate response is related to endoreplication, reverse genetics was applied as an experimental strategy. Reverse genetics is applied to elucidate the function of a gene of interest by means of genetic engineering. From the modification and/or interruption of a gene or gene product, it is possible to know the function of a target gene. The technique for applying this strategy was interfering RNA (RNAi). RNAi is a naturally occurring process within cells, involved in post-transcriptional regulation. This process inhibits the expression of a target gene by antisense and sense double-stranded RNA (dsRNA).

The methodological strategy that was applied to meet the objectives set in this project was: find the orthologue of *hnt* in *mosquito Anopheles albimanus* through databases such as Flybase and Vectorbase, synthesize interfering RNA to silence *hnt*, where DNA template sequences were obtained for *hnt* and control, corroborate the silencing of the *hnt* gene by RT-PCR, perform the immunological challenge with gram-positive bacteria *Micrococcus luteus*, and observe the effect on immunity genes such as gambicin and

cecropin in the intestines of mosquitoes when challenged with dead bacteria by means of the RT-qPCR technique to analyze their relative expression.

The results obtained were: 96% silencing in the relative expression of *hnt* and the low relative expression of immunity genes (cecropin and gambicin) in the intestine of challenged mosquitoes caused by the attenuation of the gene of interest. The application of interfering RNA for *hnt* silencing was successful. The low expression and possible loss of function of this indispensable factor to turn on the endocycle attributable to its post-transcriptional interference could stop this process of unconventional replication. Due to this, it was possible to analyze the results obtained with the hypothesis proposed. Therefore, it is possible to associate that the process of endoreplication is required for the expression of genes of the innate immune response when mosquitoes are exposed to an immune challenge, in this case dead bacteria.

1. Introducción

1.1. Paludismo o malaria

Las enfermedades transmitidas por vectores representan un 17% de las enfermedades infecciosas a nivel mundial (WHO, 2020) . Los mosquitos son vectores de una variedad de enfermedades infecciosas. Existen especies de dípteros vectores, entre ellos, los de los géneros *Aedes spp.* y *Culex spp.*, que mediante su picadura transmiten la enfermedad a las zonas tropicales y subtropicales (Norte América y África hasta el sudeste de Asia y Pacífico) afectando a las poblaciones vulnerables. Estos son los responsables de la transmisión de virus como del Dengue, Zika, Nilo Occidental, Chikungunya, entre otros (WHO, 2020). También, hay especies de mosquitos del género de *Anopheles* que transmiten la enfermedad de la malaria, conocida como Paludismo (Beerntsen et al., 2000).

El paludismo es considerado como un problema de salud pública mundial, es potencialmente mortal. Esta enfermedad es prevenible y tiene cura, sin embargo, su prevalencia en el mundo es alta (WHO, 2020). Las manifestaciones clínicas son variadas, los individuos infectados pueden presentar fiebre y escalofríos cada dos a tres días, sudoración, dolor de cabeza, heces con sangre, tos, dolor muscular, ictericia, fallo de la coagulación sanguínea, insuficiencia hepática o renal, trastornos del sistema nervioso y coma (González López, 2021).

Existen cinco especies de parásitos que ocasionan malaria en humanos, de los cuales dos son de representativa amenaza: *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium vivax*, debido a que pueden causar mayor morbilidad y muerte (Buck & Finnigan, 2023). El modo principal de transmisión es mediante la picadura de mosquitos hembras del género *Anopheles*, las cuales inoculan los esporozoitos (forma infectante del parásito) en el ser humano. Otra vía de infección directa es la inoculación de glóbulos rojos infectados por transfusión sanguínea, o por pinchazos con jeringas contaminadas. También, se han observado casos que la transmisión se difunde por transfusión sanguínea, lo que puede ocasionarse el primer mes, ya que la sangre se mantiene

infectante en ese periodo. El tiempo de incubación depende del parásito que se inoculó, en el caso de *P. falciparum* es de 7 a 14 días, mientras que para *P. vivax* es de 8 a 14 días. La persona infectada puede transmitir la enfermedad por medio de un vector (mosquito hembra) cuando se hallan gametocitos en la sangre contaminada, de esa manera ocasiona que el ciclo de transmisión continúe (figura 1). En el caso de los mosquitos, estos son infectantes toda su vida. (Subdirección de Vigilancia y Control en Salud Pública, 2011).

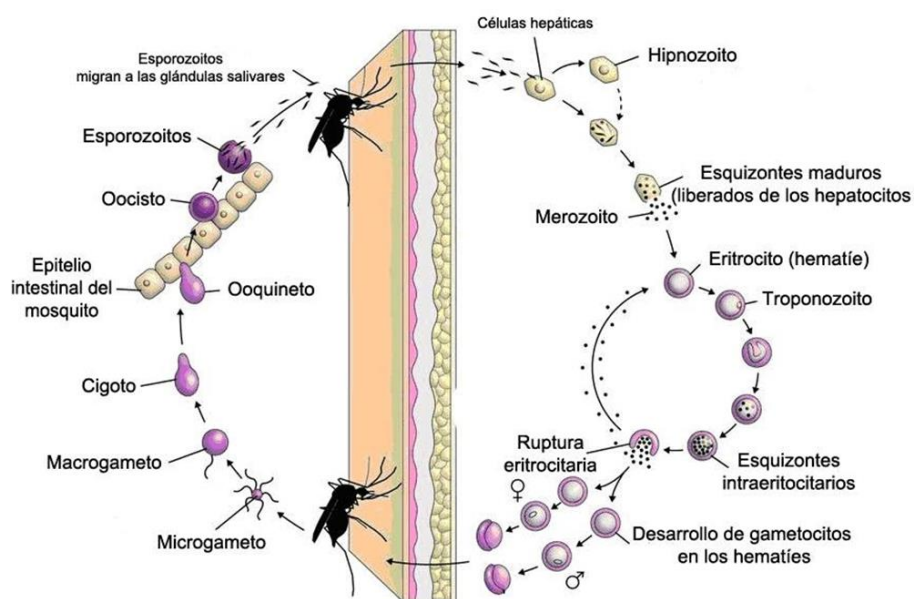


Figura 1. Ciclo de vida del parásito de la malaria (modificado de Karanja & Kiboi, 2016).

En la figura 1 se logra apreciar que los esporozoitos son inoculados por la hembra del mosquito del género *Anopheles*, viajan por el torrente sanguíneo e invaden a las células hepáticas. Luego de una semana aproximadamente, se presenta la esquizogonia hepática (el parásito se ha multiplicado dentro de los hepatocitos) y se liberan los merozoitos que infectan a los eritrocitos. El merozoito se multiplica dentro del glóbulo rojo, atravesando diferentes etapas que se conoce como anillo (trofozoíto, esquizonte inmaduro y esquizonte maduro); este ciclo dura 48 horas liberando al flujo sanguíneo de 16 a 32 nuevos merozoitos dependiendo de la especie. Los gametocitos se desarrollan dentro de los eritrocitos y son liberados junto a los merozoitos. Finalmente, el vector los ingiere y se produce la fertilización en el tubo digestivo del mismo. Producto de este proceso se forma el cigoto, el cual se divide para llegar a ser un oocisto, de donde

se liberan los esporozoitos que invaden las glándulas salivares del mosquito (Spencer et al., 2016).

Los casos reportados de paludismo a nivel mundial, en el 2015, fueron de 212 millones causando aproximadamente 429 000 muertes, recalando que la mayoría de los fallecidos fueron niños africanos. En el continente americano, en el año 2016, hubo 568 000 casos y aproximadamente 220 fallecimientos. El riesgo de contraer paludismo se acerca a la mitad de la población mundial, considerando especialmente a las poblaciones que residen en países en desarrollo. El riesgo puede aumentar por la movilidad entre zonas libres de paludismo y zonas en las que prevalece la incidencia de la enfermedad. En el aspecto económico, se ha llegado a estimar que el paludismo puede llegar a afectar en el crecimiento económico de países hasta 1,3% (OPS, 2020). En el informe mundial de la malaria 2022, se indica que se mantuvo estable la cantidad muertes a nivel mundial comparado con el 2021. El total de muertes reportadas en todo el mundo para el año 2021 fueron de 619 000 personas, mientras que en pandemia fueron 625 000 víctimas y en 2019 previo al impacto del COVID-19 era de 568 000 defunciones (OPS, 2023). En México se reporta al corte de la semana epidemiológica número 40 del 2022 que hubo un total de 118 casos autóctonos confirmados, los cuales se distribuyeron porcentualmente: 67.8% Chiapas, 22.9% Campeche, 6.8% Chihuahua, 1.7% Tabasco y 0.8% Sinaloa (CNIDSP, 2023).

Una de las estrategias más utilizadas para controlar y evitar la transmisión del parásito de la malaria es a través del control de los vectores mediante el uso de insecticidas, lo que provocado resistencia por parte del vector. Por lo que, se han desarrollado estrategias alternativas para tratar de comprender la interacción hospedero-patógeno, por medio: de la comprensión de la selectividad de los patógenos por ciertas células para su replicación, explorando la información genética de los mosquitos vectores, y a su vez, mediante el estudio de sus procesos biológicos. Debido a ello, se han identificado tres áreas que son de importancia para el control del vector: primero, la efectividad en el uso de insecticidas debe implementarse con mejores estrategias de aplicación, segundo, implementar de mejor manera los métodos de supresión de población, y tercero, enfocarse en estrategias efectivas para impedir el desarrollo del patógeno dentro del vector (Shaw & Catteruccia, 2019). El presente estudio se enfocará en la tercera área,

por ello a continuación se exponen las características biológicas de los mosquitos del género *Anopheles*.

1.2. Características biológicas de los mosquitos del género *Anopheles*

En el mundo existen alrededor de 430 especies de mosquitos dentro del género *Anopheles* que se adaptan a distintos hábitats, de las cuales alrededor de 40 son transmisores de parásitos de la malaria a humanos (Melero, 2016). De acuerdo con su morfología, la cabeza y el cuerpo se encuentran alineados, suelen presentar alas parcheadas o con escamas negras o blancas. Sus palpos tienen una longitud similar a la probóscide que les diferencia de los *Culicinos* (conocidos como zancudos). Cuando se hallan en reposo, toman una posición con un ángulo entre 30° a 45° respecto a la superficie de contacto. En el caso de *A. albimanus*, las características visibles están dadas por el patrón de manchas negras en sus alas y la longitud de sus palpos maxilares. La manera de interactuar con el humano es por medio de su alimentación debido que los mosquitos hembras se alimentan de sangre por la tarde y durante la noche. Otras especies del mismo género pueden transmitir parásitos de la malaria, gusanos filiares e incluso virus a diferentes mamíferos (Shaw & Catteruccia, 2019)(Shaw & Catteruccia, 2019).

El cuerpo del mosquito mide entre 4 a 10 mm de longitud, en la cabeza no tiene ocelos, posee una probóscide larga comparable a la longitud de la cabeza y tórax. En las hembras, el labio que envuelve seis estiletes es la parte del mosquito que atraviesa la piel y succiona la sangre. Las hembras se pueden distinguir de los machos por sus antenas, ya que en machos éstas son densamente plumosas. También, los palpos maxilares se diferencian de las hembras porque son más largos y los últimos segmentos son expandidos con estiletes menos desarrollados (Beltrán-Aguilar et al., 2011).

En cuanto a su anatomía es importante resaltar el hemocele, el intestino medio, las glándulas salivales y el cuerpo graso que son importantes para sistema inmunológico del mosquito. El hemocele es la cavidad corporal del mosquito que contiene todos los órganos viscerales, se encuentra delimitado por la cutícula externa y la lámina basal. En

este espacio fluye la hemolinfa que contiene a los hemocitos. El intestino medio se compone por dos regiones, una anterior y otra posterior. La región anterior está involucrada en la absorción de azúcar. En esta parte se encuentran microvellosidades, retículo endoplásmico liso y un laberinto basal. La región posterior más amplia (caso de las hembras) que involucra la ingesta de sangre, tiene un retículo endoplásmico rugoso y un alto número de mitocondrias. Las glándulas salivales poseen tres lóbulos conectados por un conducto principal. Este órgano secreta proteínas que participan en diferentes funciones biológicas, como las lectinas que son necesarias cuando los mosquitos se alimentan con azúcar (Ankit Kumar et al., 2018a). Finalmente, el cuerpo grasoso es un tejido que tiene un rol importante en el metabolismo intermedio, en la inmunidad innata, en el almacenamiento y transporte de compuesto de la hemolinfa. Este tejido está compuesto por grandes masas celulares formadas por trofocitos y oenocitos. Los trofocitos son células epiteliales ricas en lípidos, proteínas y glucógeno que se usan principalmente para proveer nutrientes y energía a otras células. Los oenocitos se pueden asociar a los trofocitos cuyas funciones se relacionan con la síntesis de hidrocarburos y la homeostasis (Martins et al., 2011). Véase figura 2.

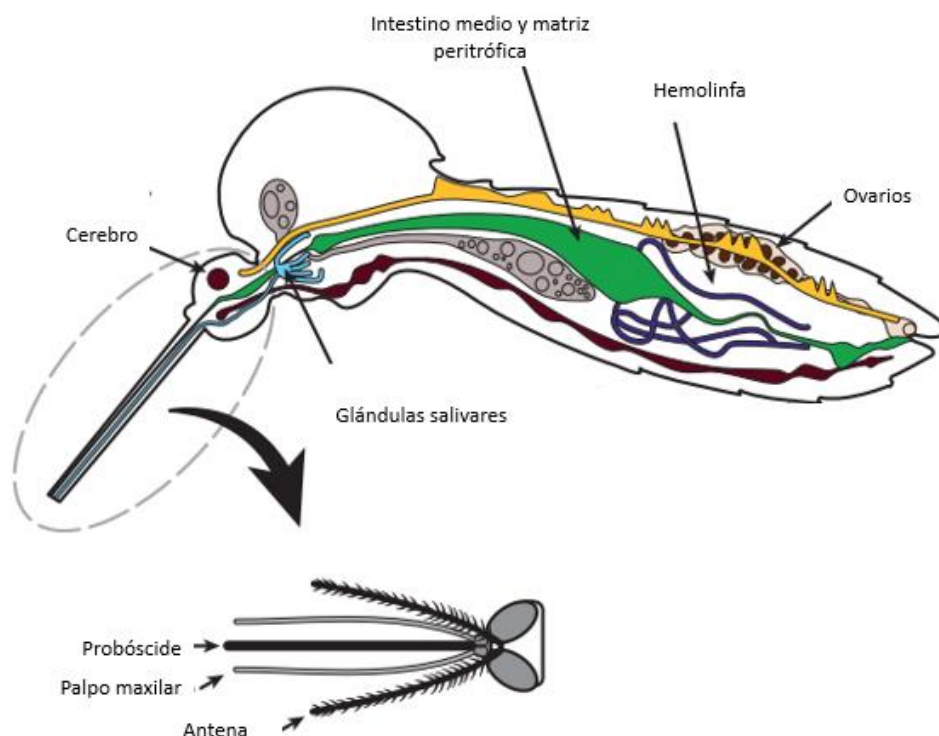


Figura 2. Anatomía de un mosquito del género *Anopheles* (Modificado de Hugo & Birrell, 2018).

1.3. Sistema inmunitario de mosquitos

1.3.1. Sistema inmune innato

A diferencia de los mamíferos, los mosquitos no poseen un sistema inmunitario adaptativo, por lo que dependen de la respuesta inmune innata para defenderse de infecciones de distintos patógenos como parásitos, hongos, bacterias y virus; los cuales no se eliminan completamente de su organismo, y por ende los convierte en vectores potenciales capaces de infectar al ser humano. En la respuesta del sistema inmunológico intervienen procesos como la fagocitosis, nodulación y encapsulación de sustancias extrañas al organismo, así como la activación de las respuestas efectoras y de señalización (Lee et al., 2019). El sistema inmune innato está compuesto por respuesta humoral y celular. En la primera, se encuentran inmiscuidos los receptores de reconocimiento de patrones, peptidos antimicrobianos, entre otros. En la segunda, los hemocitos forman parte de esa respuesta celular. En sí, los mosquitos poseen distintos mecanismos que se activan frente a la entrada de patógenos. Dentro del insecto el intestino medio, el hemocele y las glándulas salivales son barreras físicas, mientras que las barreras de infección y escape del intestino medio, y las barreras de infección y escape de las glándulas salivales son barreras fisiológicas (Shaw & Catteruccia, 2019).

1.3.2. Barreras físicas

Las respuestas humorales y celulares se extienden por las barreras físicas como el hemocele, intestino medio y glándulas salivales, permitiendo al mosquito responder con rapidez a las infecciones. El intestino medio es el espacio donde se ha observado que después de la ingesta de sangre hay cambios en su epitelio, condensación de núcleos, agrandamiento de mitocondrias y formación de verticilos concéntricos en el retículo endoplásmico rugoso (RER). Es importante que los patógenos que ingresen con la ingesta de sangre entren a las células epiteliales a través de las microvellosidades previo a la digestión (Ankit Kumar et al., 2018; Belachew, 2018).

El hemocele es una cavidad que los patógenos necesitan atravesar para entrar a la glándula salival u otros tejidos. En este espacio, los patógenos se encuentran expuestos al sistema inmunológico del mosquito, debido que a su alrededor se hallan los hemocitos y los factores inmunes humorales junto a los órganos circulatorios del

mosquito. Las glándulas salivales son importantes para que varios de los patógenos que ingresan al mosquito completen su ciclo de vida. La capa epitelial que conforma este órgano sirve como barrera física. Además que, la saliva posee mezclas complejas de péptidos y proteínas, antimicrobianos, antihemostáticos, proteínas con propiedades angiogénicas o antiinflamatorias que se encuentran en el hospedero junto a los patógenos (Belachew, 2018). Sin embargo, se ha observado como en el caso de *Plasmodium*, que patógenos han desarrollado mecanismos que permiten unirse a factores de superficies específicos para evitar esta barrera (Ankit Kumar et al., 2018a).

1.3.3. Barreras fisiológicas

Las barreras fisiológicas son procesos que intervienen en la respuesta inmune innata de los mosquito frente a los patógenos. Dependiendo del lugar de la infección las barreras fisiológicas se componen por: barrera de infección del intestino medio (MIB), barrera de escape del intestino medio (MEB), barrera de infección en las glándulas salivales (SGIB) y barrera de escape de las glándulas salivales (SGEB) (Ankit Kumar et al., 2018a).

La MIB impide que los patógenos infecten o se repliquen en las células del intestino medio, y la MEB impide que los patógenos salgan del intestino medio, incluso si hay presencia de títulos altos (Mukherjee et al., 2019). Sin embargo, vectores potenciales permiten en ocasiones que patógenos atraviesen esta barrera, tal es el caso de los ooquistos de *Plasmodium* en *A. gambiae* que rompen la barrera epitelial del intestino medio para escapar de ese espacio y difundirse por otros órganos del mosquito, incluyendo a las glándulas salivales. Los mecanismos de acción de las SGIB y SGEB no están bien definidos y aún no se tiene claro las bases moleculares que permiten a los patógenos escapar del lumen de la glándula salival y de ese modo completar su ciclo (Ankit Kumar et al., 2018a).

1.3.4. Bases moleculares del sistema inmune innato

Las bases moleculares de la inmunidad se pueden comprender mediante el reconocimiento por parte de la familia de proteínas que identifican al patógeno y lo neutralizan; las vías de señalización que tienen funciones de proteger a los mosquitos de la exposición continua frente a los patógenos, regular la microbiota, impulsar la

producción de PAMs (peptidos antimicrobianos), entre otros. Las vías de señalización principales son la vía de los receptores tipo Toll, la vía de la inmunodeficiencia (IMD), la vía de la transductor de señal de la cinasa Janus y el activador de la transcripción (JACK-STAT) y la vía de RNA de interferencia (RNAi). A continuación, se presenta una descripción de cada vía de señalización:

- **Vía de los receptores tipo Toll.** Es estimulada por la unión del ligando Spätzle con el receptor transmembrana Toll. El mosquito al ser invadido por bacterias o *Plasmodium*, desencadenan una serie de eventos que activan y translocan Rel1 al núcleo. De ese modo, se regula la transcripción de genes de inmunidad (defensinas, gambicina, cecropina 1, atacinas, reportadas en *A. gambiae* (Ankit Kumar et al., 2018)) responsables de la muerte microbiana (Clayton et al., 2014).
- **Vía de inmunodeficiencia (IMD).** Es la vía que se ha considerado la más eficaz en la defensa contra el parásito de la malaria (*Plasmodium falciparum*). Esta vía es estimulada cuando el receptor transmembrana PGRP-LC reconoce al parásito. Puesto que, provoca una cascada de señalización permitiendo la escisión de Rel2-F y la translocación de Rel2-S en el núcleo para la regulación de la transcripción de genes de inmunidad (Clayton et al., 2014a).
- **Vía del transductor de señal de la cinasa Janus y el activador de la transcripción (JACK-STAT).** Es la vía que inicia su cascada de señalización debido a la invasión de bacterias, virus y *Plasmodium*. Se estimula por medio de la unión de citocinas del péptido no apareado (UPD) al receptor transmembrana DOME, conduciendo a la translocación nuclear de las proteínas STAT y a la activación transcripcional de genes de inmunidad (Clayton et al., 2014a).
- **Vía de RNA de interferencia.** El RNAi es un mecanismo de silenciamiento génico. Esta vía mantiene la homeostasis celular durante las infecciones por patógenos. Se desencadenan la producción de diferentes RNAi como los siRNA, microRNA y piRNA, las cuales interactúan con el complejo silenciador inducido por RNA (RISC) (Ankit Kumar et al., 2018a).

El silenciamiento génico postranscripcional provocado por RNA de doble cadena se encuentra en la mayoría de las células eucariotas. El complejo RISC contiene miembros de la familia de proteínas agornautas que interactúan con RNA

pequeños para llevar a cabo la atenuación de un gen blanco que utiliza una plantilla de RNA para reconocer el mRNA. Este es un mecanismo importante en la regulación genética, así como, en la defensa contra infecciones virales (Balakrishna Pillai et al., 2017).

La modulación y los efectores, también son factores de las bases moleculares que comprenden la respuesta inmunitaria. El primero facilita la amplificación de las señales de reconocimiento, y el segundo engloba a los péptidos antimicrobianos (PAM), sustancias reactivas de oxígeno y nitrógeno, melanización, apoptosis, autofagia y fagocitosis que ayudan a combatir sustancias extrañas dentro del organismo del mosquito (Shaw & Catteruccia, 2019). En la respuesta inmune se ha observado que la producción de efectores PAM, se asocian a un incremento en el material genético, el cual se explicará con más detalle en próximos apartados.

2. Antecedentes

2.3. Mecanismo de memoria en el sistema inmunitario de los mosquitos

En el apartado anterior se expuso que el sistema inmunológico de invertebrados carece de un sistema inmune adaptativo (en este estudio en particular se expone en mosquitos). Pham y colaboradores (2007) han expuesto a *D. melanogaster* a dosis subletales de microorganismos como *Streptococcus pneumoniae* y *Beauveria bassiana* (patógeno natural de la mosca de la fruta). Donde se demuestra que existe un efecto protector con una alta especificidad contra un segundo desafío letal de los mismos microorganismos que persiste durante la vida del insecto. En este mecanismo estuvieron involucrados el efecto protector de los fagocitos y la vía Toll. Este trabajo contradice con la definición de la respuesta inmune innata, el cual impulsa a una continua investigación sobre este mecanismo de memoria inmunológica (Pham et al., 2007). Barrillas-Mury y colaboradores (2010), aplicaron el mismo principio a los mosquitos *A. gambiae*, exponiéndolos a los parásitos *Plasmodium*. Se desafiaron una primera y segunda vez, obteniendo como resultados una mejor respuesta inmunitaria en los mosquitos pre-desafiados. En ese estudio se concluyó que el sistema inmunológico de los mosquitos puede adaptarse dependiendo de la abundancia y capacidad de respuesta de las diferentes poblaciones de hemocitos. Además que, la infección con bacterias junto a *Plasmodium* aumenta la proporción de granulocitos circulantes, impulsando una mejor respuesta inmunitaria (Rodrigues et al., 2010).

Entre estos estudios, aparece el término “*priming*” inmunológico, el cual en su definición conlleva el principio experimental antes mencionado. Contreras-Garduño y colaboradores, lo definen como “la capacidad adquirida para combatir mejor un patógeno debido a una exposición previa a dosis subletales del mismo organismo”. El “*priming*” inmunológico se indujo por *Plasmodium berghei* en *A. albimanus*, en mosquitos asépticos (eliminaron la variable de las bacterias tratándolos con antibióticos). Para observar el “*priming*” inmunológico se realizaron dos infecciones con el parásito (una infección abortiva y después una infección normal) y un conteo de

oosquites. De donde, se determinó que en el control se encontraron mayor cantidad de oosquites en su intestino medio a comparación de los mosquitos infectados con primera y segunda infección; documentando que *A. albimanus* posee características de una respuesta inmune adaptativa: larga duración y una dinámica bifásica. Además que, se visualizó que en las dos infecciones hubo un aumento de material genético. (Contreras-Garduño et al., 2015).

2.3.1. El aumento de material genético en respuesta frente a un patógeno

El cuerpo graso es el principal tejido inmune innato, contribuye montando una fuerte respuesta contra los microorganismos invasores, esta respuesta se caracteriza por la liberación de proteínas efectoras, incluidos los PAMs en la hemolinfa (Osta et al., 2004). Como consecuencia un aumento en el contenido del DNA de la célula, en ausencia de mitosis. Por lo que, ese aumento de material genético podría estar involucrado en algunos procesos clave de la respuesta inmune (Contreras-Garduño et al., 2015; Cruz Hernandez-Hernandez, 2019).

En algunos casos, solo se replican loci genéticos específicos y en otros, el genoma completo experimenta varias rondas de replicación en ausencia de mitosis. Se han descrito tres mecanismos que implican la replicación activa del DNA para la poliploidía: mitosis acitoquinética, endomitosis y endoreplicación. Estos mecanismos proporcionan múltiples copias de genes disponibles para un rápido aumento de la transcripción y traducción para productos de proteínas específicas. Es por ello, que se ha indicado una posible relación del aumento de DNA con la respuesta inmune en mosquitos frente a diversos patógenos. En específico se ha identificado a la endorreplicación, donde una célula se somete a múltiples rondas de fase S sin entrar en la mitosis. Este proceso está bien documentado en *D. melanogaster* (Egdar y Orr-Weaver, 2001).

En la respuesta inmune se ha observado la expresión de genes de inmunidad que codifican para los péptidos antimicrobianos en el intestino medio de *A. albimanus*. Además que las células epiteliales de este órgano se comunican con el tejido abdominal que no tiene contacto directo con el parásito (Herrera-Ortiz et al., 2011). Estos genes de inmunidad se han utilizado para analizar la cinética bifásica que se encontró por la inducción del “*priming*” inmunológico en *A. albimanus* por medio de la técnica RT-PCR. Donde se visualizó la transcripción bifásica de PAMs, en el que se reveló un aumento en

los niveles relativos de mRNA de atacina, cecropina y gambicina en intestino medio después del “*priming*”, seguido por una disminución hasta alcanzar niveles basales pre-infección y finalmente, un aumento mayor a la primera infección después del segundo desafío con el parásito. Este patrón indica que existe una fuerte respuesta inmune ante una segunda exposición por el mismo patógeno (Contreras-Garduño et al., 2015). Es importante aclarar que esta respuesta inmune no es mejorada o adaptativa como tal se presenta en mamíferos, puesto que conlleva diferencias en sus mecanismos de acción (Bertha & Robledo, 2008).

El aumento de DNA se ha asociado al proceso de endorreplicación debido que al marcar los núcleos de las células del intestino medio con BrdU (5-Bromo-2'-Deoxiuridina, análogo de timidina que se utiliza como marcador por excelencia para identificar fases del ciclo celular y la proliferación (ThermoFisher, 2021)), se observó un mayor incorporación del reactivo en mosquitos con “*priming*” a comparación del control. También, se corroboró por el análisis de un ensayo ELISA semicuantitativo un aumento en la síntesis de DNA pasadas las 24 h de exposición al parásito. Durante, el “*priming*” no se observó que las células entraron a mitosis(Contreras-Garduño et al, 2015) . Entonces, se investigó al gen *hnt*, un factor de transcripción clave para el cambio del ciclo celular normal a endorreplicación en *Drosophila*, donde las células se replican sin entrar a mitosis (Sun & Deng, 2007). En la figura 3, se puede observar que hay una coexpresión de *hnt* en el intestino medio de mosquito durante la primera exposición y segunda exposición al patógeno (Contreras-Garduño et al, 2015). Por otro lado, en una revisión reciente se expone que esta respuesta de memoria ha sido analizada en algunos grupos de invertebrados. En tejidos de *A. albimanus* se ha observado la respuesta inmune cuando se expone a diferentes microorganismos, donde muestra como resultado un aumento significativo de su DNA (Cruz Hernandez-Hernandez, 2019).

El aumento de material genético que se ha mencionado en este apartado viene dado por el cambio en el ciclo celular convencional. A continuación se muestran aspectos de la regulación del ciclo celular.

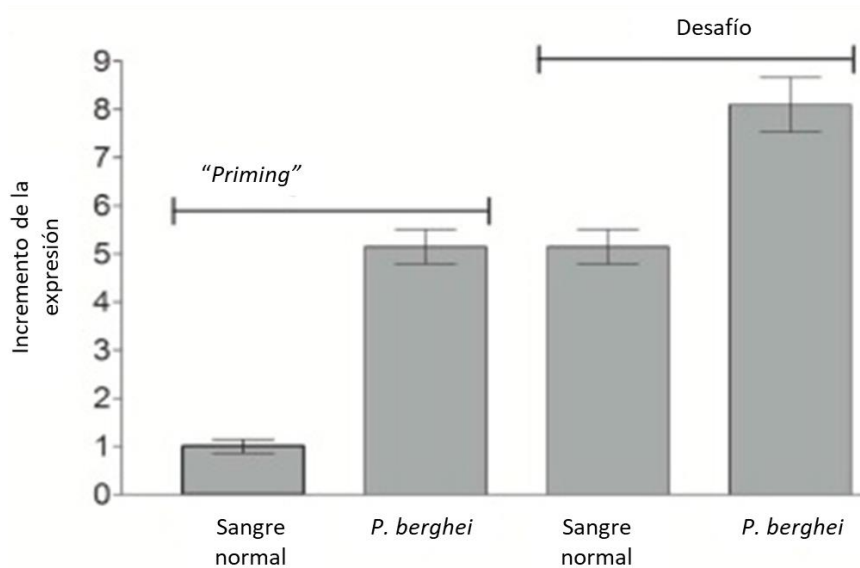


Figura 3. Expresión de *hnt* en el intestino medio de mosquito 72 horas después del desafío con *P. berghei* (modificado de Contreras-Garduño et al, 2015).

2.4. Regulación del ciclo celular

Las células que proliferan activamente entran a un ciclo de división compuesto por cuatro procesos coordinados: crecimiento celular, replicación del material genético, distribución de los cromosomas duplicados a las células hijas y por último completan el ciclo con la citocinesis. A esto se lo conoce como ciclo celular, en donde se conocen cuatro fases (G1, G2, S, M). El crecimiento celular suele ser un proceso continuo, es decir la síntesis de DNA se desarrolla en una sola fase del ciclo celular, en contraste, al complejo sistema de eventos para la distribución cromosómica a células hijas. Un ciclo celular típico de una célula eucariota se puede visualizar por medio del cultivo celular; el cual está dividido en dos partes básicas: interfase y mitosis. El crecimiento de las células ocurre a un ritmo constante durante la interfase, y la mayoría duplican su tamaño en la mitosis (Cooper, 2000).

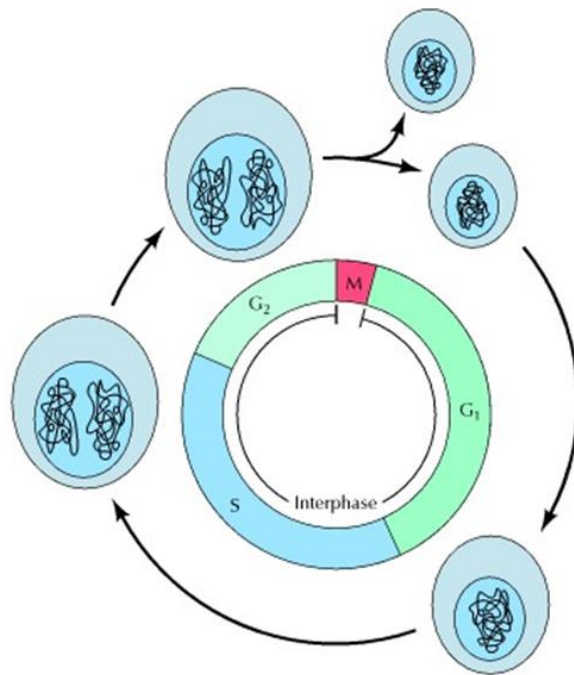


Figura 4. Fases del ciclo celular. El ciclo de división de la mayoría de las células eucariotas se divide en cuatro fases: M, G₁, S y G₂. La fase M o mitosis se presenta seguidamente de la citocinesis. La fase S, es donde toma lugar la replicación del material genético. El crecimiento celular se lleva a cabo durante la interfase, la cual abarca las fases: G₁, S y G₂ (Cooper, 2000).

Para explicar en breve cada una de las fases del ciclo celular, la fase M es donde se desarrolla el proceso de mitosis, seguido inmediatamente por la citocinesis. La fase G₁ es la que corresponde al intervalo entre la mitosis y el inicio de la síntesis de DNA. En esta fase G₁, la célula se encuentra metabólicamente activa y en constante crecimiento sin replicar su material genético. Las células animales en G₁ son diploides, es decir que contienen 2 copias de cada cromosoma, por lo que se denomina 2N. Luego, en la fase S es donde ocurre la replicación del material genético, llegando a proveer a las células un aumento en su contenido de DNA, cambiando de 2N a 4N. Finalmente en la fase G₂ (intervalo entre fase S y mitosis) continúa el crecimiento celular y se sintetizan las proteínas necesarias para el acceso a mitosis (Cooper, 2000). Véase figura 4.

Los cambios en las distintas fases del ciclo celular involucran mecanismos reguladores como la fosforilación de tirosina que se presenta en las cinasas dependientes de ciclina

(Cdks). Las Cdks controlan el inicio de la mitosis y la fase S. En la mitosis hay la presencia de ciclinas del tipo A y B que forman complejos con Cdk1, la cual es activada por enzimas fosfatasa de tipo Cdc25. En la fase S se presentan ciclinas de tipo E y A que forman complejos con CDK2. En eventos anteriores como la transición de G0 (fase de reposo del ciclo celular, en el que las células se mantienen metabólicamente activas, sin embargo no se proliferan (Cooper, 2000)) a G1 hay la presencia de ciclinas tipo D que se asocian con Cdks de tipo 4 y 6 (Edgar & Orr-Weaver, 2001).

Las CDKs controlan el ensamblaje del complejo pre-replicative (pre-RC). Las Cdks tienen doble función dependiendo las necesidades de la célula, pueden inhibir el ensamblaje del pre-RC o activar el origen de replicación, permitiendo el movimiento de la horquilla de replicación bidireccional. Este pre-RC que tiene como función marcar el origen y dar la señal para que se inicie la síntesis de DNA, es un grupo de proteínas compuesto por el complejo de reconocimiento del origen de seis subunidades (ORC), Cdt1 y Cdc6 que se ensamblan en los orígenes de replicación y tiene la finalidad de cargar en el DNA hexámeros de proteínas de mantenimiento de mini cromosomas (MCM, por sus siglas en inglés), las cuales son componentes centrales de la helicasa replicativa. Los componentes del pre-RC están regulados positivamente y negativamente por complejos CDK/ciclina. La unión de ciclina E con CDK2 induce el paso de la célula de G1 a S; los bajos niveles de CDK2 permite el ensamblaje de los complejos pre-RC (Duronio, 2012).

- **Transición G1/S.** En esta transición para que la célula entre a fase S se involucran complejos ciclina D/Cdk4/6 y ciclina E/Cdk2, seguido por el heterodímero ciclina A/Cdk2 a lo largo de la fase S. En mamíferos, el cambio de G1 a S está regulado además por la proteína de retinoblastoma (Rb) que provee un control negativo en el ciclo celular y en la progresión tumoral. Esta lleva a cabo su función por medio de la inhibición de factores de transcripción E2Fs. La activación del complejo ciclina E/Cdk2 es permitida por la fosfatasa Cdc25 removiendo grupos fosfatos inhibidores de Cdk2 e inactivando a la proteína Rb (Lagunas-Cruz et al., 2014).
- **Transición G2/M.** En esta transición, en la fase G2 las células se encuentran en crecimiento, sintetizando proteínas necesarias y RNA para continuar con el ciclo hacia la fase M. Este punto de control G2/M, la entrada de mitosis puede ser

detenida cuando la fosfatasa Cdc25 es retenida en el citoplasma impidiendo su acción sobre el complejo ciclina B/Cdk1. En mitosis, el complejo ciclina B/Cdk1 o MPF (promotor de la fase M) se activa por la cinasa Polo y se transloca al núcleo en prometáfase, mientras simultáneamente ocurre la desintegración de la membrana nuclear. La ciclina B media la citocinesis después de finalizar el proceso de la mitosis, terminando en la separación de las células hijas (Lagunas-Cruz et al., 2014).

Los mecanismos de regulación del ciclo celular canónico participan en las entradas y salidas de las fases de las variantes del ciclo celular convencional. Una de las variantes de importancia para el presente estudio es la endorreplicación que se explica a continuación.

2.5. Endorreplicación o endociclo

El proceso de endorreplicación también es llamado endociclo o endoreduplicación, el cual es una variante del ciclo celular canónico. Las células replican su material genético sucesivamente sin segregar sus cromosomas durante la mitosis. El aumento de DNA genómico está acompañado proporcionalmente con el aumento en el número de cromosomas en múltiplos de N (el número que corresponde a cromosomas haploides). Las células que contienen este aumento de DNA se les conoce como poliploides, ya que poseen varias copias de cada cromosoma. De forma que, los espermatozoides son 1N 1C (C: valores de cromatina indican el contenido de DNA como un múltiplo del genoma haploide normal), las células diploides en G1 y G2 del ciclo celular convencional contienen 2N, 2C y 2N, 4C, respectivamente, y una célula poliploide puede poseer 32N,32C (en el caso de las células productoras de escamas de la polilla *Ephestia*) o más (Edgar & Orr-Weaver, 2001; Edgar et al., 2014).

Dentro de las células que producen este fenómeno, se encuentran dos términos politeno y poliploide. Las células politénicas generalmente descienden de células diploides, sin embargo, los brazos de cromosomas homólogos se encuentran estrechamente emparejados, lo que indica que una célula politénica puede contener 1N, 64C; un ejemplo de politeno se observa en *Drosophila*, en los cromosomas gigantes de las células de las glándulas salivales que tienen alrededor de 2000C de genoma

euromático alineadas en matrices paralelas (Urata et al., 1995). Mientras que una célula poliploide se refiere a que su material genético se vuelve a replicar en cromosomas completos. Vease figura 5, los diferentes configuraciones cromosómicas que presentan distintos procesos de endorreplicación (Edgar & Orr-Weaver, 2001).

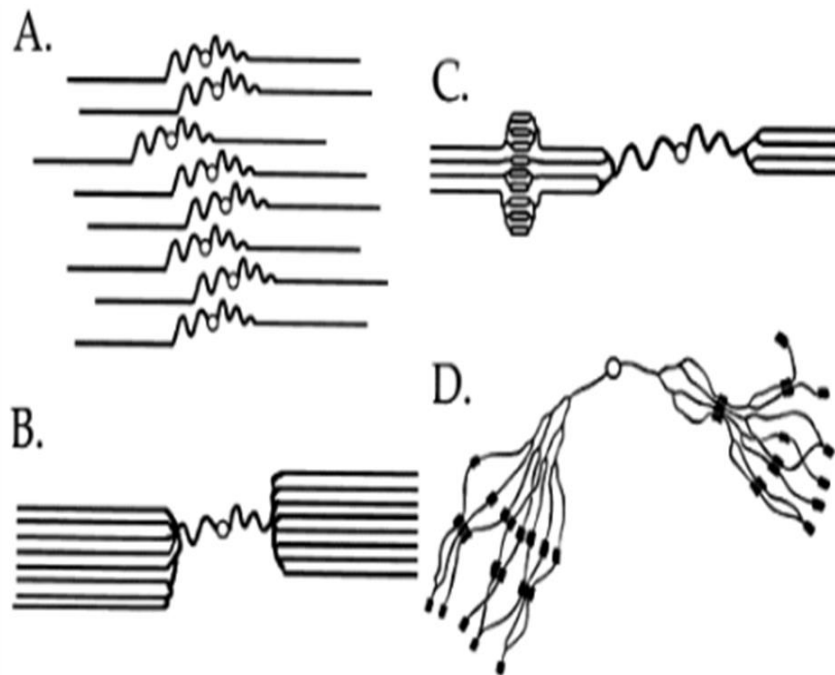


Figura 5. Configuraciones cromosómicas producidas por diferentes tipos de endociclos. (A) Se visualiza la separación de las cromátidas hermanas en una célula poliploide 8N. (B y C) Cromosomas politenos. (D) Estructura de cromosoma politeno en una célula nodriza de *D. Melanogaster* (modificado de Edgar y Orr-Weaver, 2001).

El proceso de endorreplicación se ha identificado en mamíferos, plantas e insectos. Las células megacariocitos (MKC) son un ejemplo de poliploidización regulada por el desarrollo en mamíferos. Estas tienen función precursora altamente especializadas que sirven para la producción y liberación de plaquetas en la circulación. Los megacariocitos se someten a múltiples replications de DNA sin divisiones celulares por medio del proceso de endomitosis (Italiano & Hartwig, 2013). Durante su diferenciación pueden llegar a ser células poliploides hasta 128N, el proceso de endomitosis es desencadenado por la secreción de trombopoyetina, la cual regula el aumento o disminución de ciclina D3. Se ha observado que un aumento de ciclina D3 impulsa la

ploidía en estas células (Edgar y Orr-Weaver, 2001). La endomitosis no es el resultado de la replicación en ausencia de mitosis, esta tiene que ver con un proceso que finaliza prematuramente. Es decir, las células megacariocíticas inician el ciclo, se someten a una fase G1 corta, una fase S normal, una fase G2 corta y por último a la endomitosis, donde los megacariocitos pasan de profase a la anafase A sin entrar a la anafase B o telofase ni a citocinesis. En ella, se presencia la ruptura de la envoltura nuclear, la aparición de cromosomas condensados y husos mitóticos esféricos anormales. (Edgar & Orr-Weaver, 2001; Italiano & Hartwig, 2013). En la figura 7, se puede observar la ruta que toma este proceso de endociclo para las células megacariocitas.

En estudios realizados en plantas, se ha presenciado la poliploidia en tricomas, células epidérmicas de las hojas, de la punta de la raíz y del hipocótilo de *Arabidopsis thaliana*. La endorreplicación en este grupo puede ser afectado por factores ambientales como la luz, y por su programa de diferenciación celular. Por otro lado, en la alfalfa se ha encontrado un ortólogo, denominado *ccs52*, de la familia de proteínas que se asocian a Cdh1/Fzr (activadores del complejo promotor de la anafase (APC)). Al gen *ccs52* se encontró expresado en células endorreplicadas. Por medio de RNA antisentido se pudo reducir el nivel de transcripción de *ccs52* permitiendo ver una ploidía reducida. De tal modo que se apreció que la proteólisis mediada por APC es clave para la ploidía. Además, se ha observado que en plantas (*Arabidopsis*, alfalfa, maíz) se conservan los mecanismos de regulación del ciclo celular de mamíferos, en especial la transición de G1 a S mediante la vía de Rb-Ciclina D (Edgar & Orr-Weaver, 2001).

En insectos, la poliploidía se observa en tejidos o células altamente metabólicas con metamorfosis completa e incompleta. Entre las más reportadas que presentan poliploidia se tienen en las células nodrizas, cuerpo graso, intestino medio, músculo, y túbulos de Malpighi. Un organismo bien estudiado es la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*) (Ren et al., 2020).

2.5.1. Endorrepliación en dípteros

Drosophila presenta diferentes aspectos de endociclo, dependiendo de la etapa y el tipo de células. Estas pueden evitar la fase S y la mitosis a diferentes extensiones. En los tejidos politénicos se puede hallar la heterocromatina (constituye un 30% del genoma) subreplicada, incluyendo la heterocromatina centromérica, intercalada y secuencias

teloméricas, así como regiones eucromáticas (genes de histonas). Los niveles de ciclina E pueden afectar a la replicación heterocromática, esto se ha visualizado en las células nodrizas del ovario, de donde se ha reportado información sobre la endorreplicación. En los cinco primeros estadios, los cromosomas son politénicos, su replicación genómica es completa y la heterocromatina es replicada al final de la fase S. Después de la fase S del ciclo 5, los cromosomas se condensan y se separan entre si, formando cromosomas poliploides (Edgar & Orr-Weaver, 2001; Ren et al., 2020). Véase figura 6, los aspectos que evitan los endociclos dependiendo el tipo de célula. Para *Drosophila* en (a) se muestra la ruta de los tejidos larvarios y células nodrizas ováricas post-ciclo 6, en (b) células nodrizas en estadio 1-4 y en (c) células nodrizas del ciclo 5.

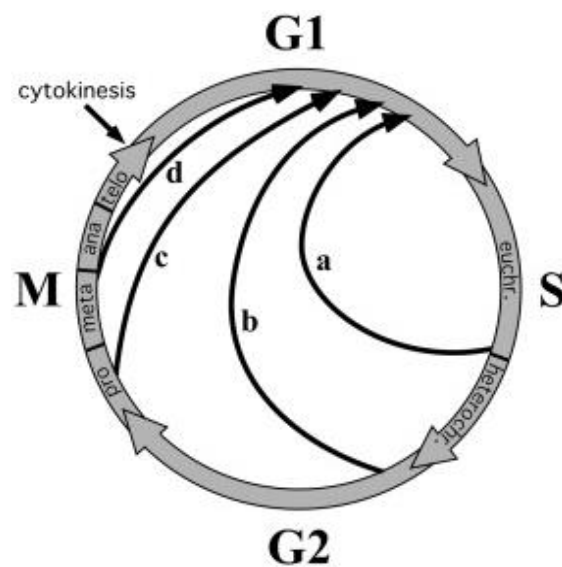


Figura 6. El proceso de endorreplicación evita aspectos de la fase S y mitosis a diferentes extensiones dependiendo el tipo de célula. a: Tejidos larvarios de *Drosophila*. b: Ciclo 1-4 de células nodrizas de *Drosophila*. c: Células nodrizas de *Drosophila* del ciclo 5. d: Endomitosis en megacariocitos de mamífero (modificado de Edgar & Orr-Weaver, 2001).

La vía de señalización Notch está involucrada en la diferenciación celular durante la morfogénesis y en la proliferación celular en *Drosophila* (Baonza & Garcia-Bellido, 2000). Véase figura 7. Esta vía se ha observado que tiene un papel como interruptor del proceso de endorreplicación en *Drosophila*. En las células del folículo, se expresa el ligando Delta, el cual permite un estado en que las células puedan enviar y recibir señales (D'Souza et

al., 2008). La vía de señalización Notch permite la regulación “*downstream*” de String (STG) y Dacapo (DAP) y una regulación “*upstream*” de Cdh1/FZR. STG es una fosfata Cdc25 que regula la transición G2/M y elimina los fosfatos inhibidor de Cdk1, favoreciendo la asociación con ciclina A y B para iniciar la mitosis (Ren et al., 2020). DAP es un inhibidor de cinasa dependiente de ciclina, por ende detiene la proliferación celular durante el desarrollo en *Drosophila* (Lane et al., 1996). La proteína relacionada con efervescencia de *Drosophila* (Fzr) y su homólogo de mamífero Cdh1, tienen la función de reguladores esenciales para la entrada a endorreplicación, ya que activan el complejo APC para iniciar la ubiquitinación. De ese modo, provoca la degradación de factores como la ciclina B y la ciclina A, reforzando el bloqueo a la mitosis. CycB/Cdk1 activa por fosforilación a STG, formando un ciclo de retroalimentación positiva. La fosforilación a Cdk1 está dada por la cinasa Wee1 en Tyr15 y por la cinasa del factor de transcripción de mielina (Myt1) en Thr14. Por otro lado, hay una retroalimentación negativa donde Wee1 es fosforilado e inactivado por CycB/Cdk1 (Qian et al., 2020).

Para el proceso de mitosis, el complejo CycA/CDK activa al complejo Myb/MuvB (MMB) que induce la transcripción de genes del ciclo celular necesarios para este proceso. La inducción de la endorreplicación se vio por la eliminación de AurB (un gen regulado por MMB) y de otras subunidades del complejo pasajero cromosómico (CPC), el cual es clave para la salida mitótica ordenada y la citocinesis (Kitagawa & Lee, 2015). La regulación “*downstream*” de DAP, inhibidor del complejo CycE/CDK, libera a ciclina E/cdk2, provocando el bloqueo de inicio de la fase S. En el caso de FZR, se regula negativamente por el factor de transcripción de homeodominio (Cut) (Qian et al., 2020). Cut tiene la propiedad de contener varios dominios de unión al DNA, tres regiones denominadas repeticiones de Cut y el homeodominio de Cut. Se han realizado estudios genéticos respecto a Cut que muestran una función importante en la especificidad del tipo celular (Coqueret et al., 1998). STG/Cdc25 y el factor de transcripción Cut son reprimidos por el factor de transcripción de dedos de zinc Hindsight (Hnt) (Qian et al., 2020).

Por otro lado, se incluye al factor de transcripción Tramtrack (Ttk), el cual regula a las células del folículo durante la ovogénesis. De tal modo, se permite la entrada y salida del proceso de endorreplicación específico de ese sitio. En linaje de las células de

Drosophila, este factor Ttk está regulado por los niveles bajos de ciclina E y se ha sugerido que probablemente participa en la salida del ciclo celular (Qian et al., 2020).

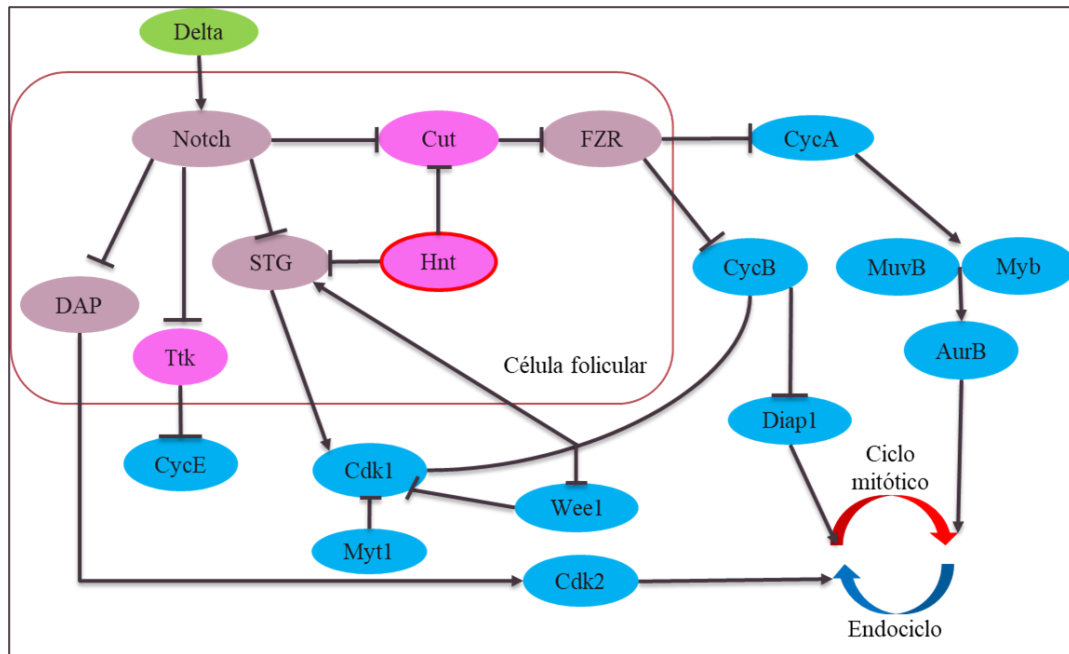


Figura 7. Participación de la vía de señalización Notch en una célula folicular de *D. melanogaster* como interruptor en el cambio de ciclo mitótico a endociclo. Delta envía y recibe señales. Notch regula corriente abajo a STG y DAP, así como corriente arriba a Cdh1/FZR. STG es una fosfatasa Cdc25 que tiene una función en la regulación en G2/M. DAP es un inhibidor CDK que detiene la replicación. FZR activa el complejo APC promoviendo el bloqueo de la mitosis. Cut regula negativamente a FZR. Hnt tiene la función de reprimir a STG y Cut. Ttk interviene en la entrada y salida de endorreplicación durante el proceso de ovogénesis, y se encuentra regulado por niveles bajos de ciclina E (modificado de Qian et al., 2020).

2.6. Gen Hindsight (*hnt*) en la endorreplicación en *Drosophila*

El gen *hnt* codifica una proteína dedo de zinc (ZNF) tipo C2H2 (Hnt), la cual desempeña varias funciones en el organismo de la mosca de la fruta, por ejemplo, en el apartado anterior se mencionó que es un factor de transcripción importante para la regulación en la vía de señalización Notch. Este dominio ZNF tipo C2H2 constituye el grupo que más

prevalece de motivos de unión al DNA en eucariotes superiores (Klug, 2010). La primera función que se identificó para las proteínas ZNF tipo C2H2 fue el reconocimiento de DNA. Luego, se investigó que también tienen interacción con RNAs y proteínas. En relación a la interacción proteica, un motivo ZNF es suficiente para mediar interacciones específicas entre proteínas, mientras que, para una unión específica con el DNA es necesario múltiples motivos C2H2 (Ming et al., 2013).

La proteína Hnt es una proteína conservada evolutivamente en muchas especies de invertebrados y vertebrados. Está presente en el núcleo de las células, posee 1894 aminoácidos que contiene 14 motivos C2H2 (figura 8). La mayor parte de ZNF se encuentran organizados en grupos espaciados, cada uno contiene dos o tres de los motivos C2H2 en tándem. Esta proteína tiene funciones importantes en el organismo de *Drosophila*, controla el desarrollo de varios tejidos durante su desarrollo incluida la amnioserosa extraembrionaria, el sistema nervioso periférico, el intestino medio, los endocitos y las tráqueas en la embriogénesis, los hemocitos, la glándula linfática en desarrollo, las células precursoras neurales en estadio de larva y pupa, los mioblastos en desarrollo, y las células foliculares del ovario (Ming et al., 2013). En las células foliculares como se mencionó, Hnt es importante debido que participa en la regulación “downstream” en la vía de señalización Notch. Esta proteína es regulada por el aumento de células del folículo en *Drosophila*. Es un regulador importante en la transición G2/M, evitando que las células entren a la fase de mitosis y puedan entrar a endociclo (Jia et al., 2014).

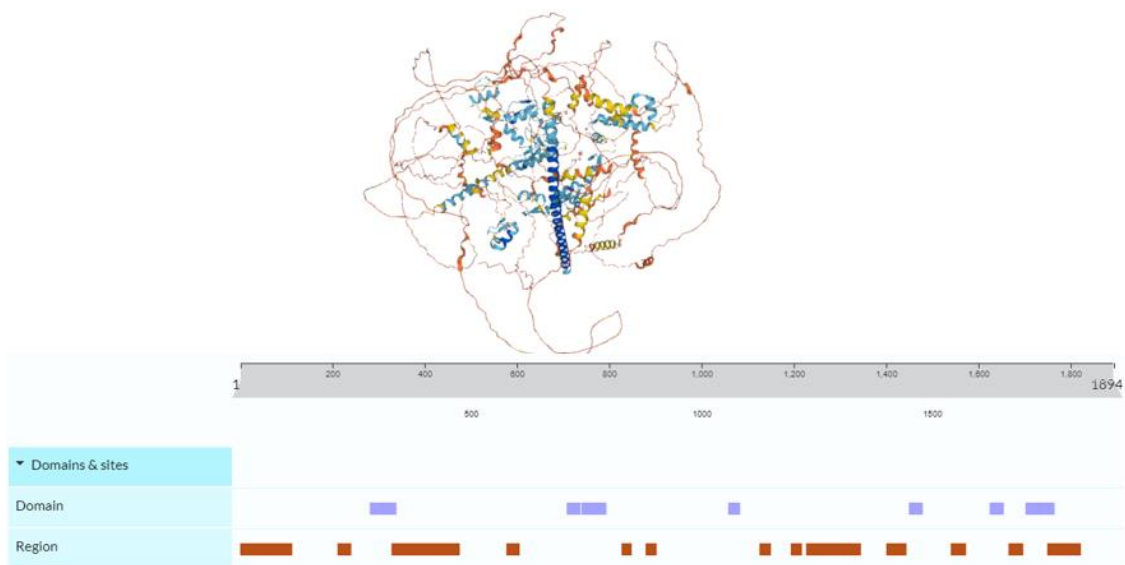


Figura 8. Estructura de Hnt predicha por el programa Alphafold y representación de la ubicación de los motivos C2H2 (en azul) dentro de los 1894 aminoácidos que posee esta proteína (obtenido de Uniprot, 2023).

El presente estudio se enfocará en el análisis de la interacción hospedero-patógeno. Donde se ha observado que en el mosquito *A. albimanus* durante la infección del parásito de la malaria, existe la coexpresión del gen *hnt*. El cual, está asociado a la vía Notch y además, es un factor clave en el cambio de ciclo mitótico a endorreplicación. Por lo que, se pretende encontrar por medio del silenciamiento *hnt* si el proceso de endociclo está asociado a la respuesta inmune en los mosquitos. Por tanto, se espera que el silenciamiento del gen *hnt* afecte a genes de inmunidad (gambicina, cecropina) que aumentan su nivel de expresión observados en el proceso del “*priming*” inmunológico.

Para el desarrollo del proyecto se aplicará la genética reversa como estrategia experimental. La genética reversa es una herramienta que permite estudiar la función de genes que se encuentran involucrados en procesos biológicos de interés, en los cuales aún no están caracterizados. A diferencia de la genética directa, la genética reversa se aplica para dilucidar la función de un gen de interés mediante herramientas moleculares, en la cual se toma como partida una secuencia concreta (Ahringer, 2006).

A nivel global, los genetistas han considerado al RNAi como una herramienta poderosa para aplicar la estrategia de genética reversa. El RNAi es un proceso natural dentro de las células, involucrado en la regulación post-transcripcional. Este proceso inhibe la expresión de un gen mediante RNA de doble cadena (RNAi) (Hardy et al., 2010). Esta estrategia experimental se eligió debido que el presente estudio tiene partida desde la secuencia del gen *hnt* de *A. albimanus*, el cual no se encuentra caracterizado funcionalmente en relación con el sistema inmunológico del mosquito. Por ello, se aplicará genética reversa con el fin de modular la expresión silvestre de *hnt* por medio de silenciamiento por RNAi, y de ese modo, conocer el papel que desarrolla *hnt* en la respuesta inmune innata del mosquito.

3. Hipótesis y objetivos

Se ha observado la activación de la endorreplicación y coexpresión del gen *hnt* posterior a un reto inmunológico. Si la respuesta inmune requiere la endorreplicación, entonces, la atenuación de la expresión de *hnt* afectará la expresión de genes de la respuesta inmune del mosquito.

3.1 Objetivo general

Establecer si el proceso de endorreplicación se requiere para la expresión de genes de respuesta inmune innata en *A. albimanus*, vector de *Plasmodium vivax*.

3.2 Objetivos específicos

- 3.2.1 Identificar el ortólogo del gen *hnt* en el genoma de *A. albimanus* y generar RNAi.
- 3.2.2 Bloquear el proceso de endorreplicación en *A. albimanus* mediante el silenciamiento del gen *hnt*.
- 3.2.3 Analizar el efecto de bloqueo del proceso de endorreplicación sobre la respuesta inmune del mosquito.

4 Metodología

4.1 Crianza de mosquitos *A. albimanus*

4.1.1 Eclosión de los huevos

Para la crianza de mosquitos se utilizaron huevos de *A. albimanus* cepa Tapachula, los cuales se colocaron en una bandeja de plástico con aproximadamente 1 litro de agua cubierta con malla para el desarrollo de las larvas. La eclosión de los huevos se dio en las condiciones controladas en su entorno (humedad $80 \pm 5\%$ y temperatura $26 \pm 2^\circ\text{C}$).

4.1.2 Mantenimiento de las larvas

Existen cuatro estadios de larva (L1 a L4) antes de llegar a pupa. En cada etapa fue necesario alimentarlas, limpiar las charolas y realizar cambio de agua (cada 2 a 3 días, sin maltratarlas) para evitar contaminación.

4.1.3 Colecta de pupas

El desarrollo de larva a pupa tarda aproximadamente entre 5 a 10 días. Una vez que se visualizaron las pupas en las bandejas se recolectaron en botes pequeños con un poco de agua (aproximadamente 20 ml), los cuales se colocaron dentro de las jaulas para que se transformen a mosquitos. Durante la etapa de pupa no se alimentaron.

4.1.4 Mantenimiento de mosquitos adultos

Cuando emergieron a mosquito (luego de 2 a 3 días en estadio de pupa) se les colocaron algodones remojados con una solución estéril de sacarosa al 10% para su alimentación. Los mosquitos adultos (machos y hembras) se mantuvieron en el insectario con condiciones ambientales controladas durante 4 a 5 días antes de volver a ser alimentados con sangre.

La cantidad de huevos que coloca una hembra son entre 50 a 200. La sangre es necesaria para el desarrollo de estos huevos. Por ello, para iniciar nuevamente el ciclo, se alimentaron a los mosquitos con 1 ml de sangre de conejo por medio de alimentadores de vidrio con una membrana artificial (parafilm). Las hembras depositaron sus huevos después de dos días de alimentación con sangre en papel filtro colocado en charolas con agua, introducidos en las jaulas. Los mosquitos que no se utilizaron en los experimentos se sacrificaron colocándoles en el congelador por varios minutos (Das et al., 2007 ; Williams & Pinto, 2012).

4.2 Búsqueda e identificación del gen *hnt* en *D. melanogaster* y *A. albimanus* mediante las bases de datos Flybase y Vectorbase

Para la identificación El gen de interés *hnt* se identificó en la base de datos FlyBase para *D. melanogaster*, y luego se halló su ortólogo para *A. albimanus*. Una vez realizada esta búsqueda, con el identificador (ID) del gen *hnt* de *Anopheles* se encontró en la base de datos VectorBase las características que presenta este gen.

4.3 Extracción de DNA genómico *A. albimanus*

La extracción de DNA genómico se realizó con el fin de obtener el DNA molde para la síntesis de RNAi *hnt*. La extracción se llevo a cabo siguiendo el protocolo de Shivani Gupta y Shabad Preet, 2012; con una ligera modificación en la muestra biológica, es decir, se utilizaron mosquitos adultos en vez de larvas para la extracción del DNA genómico:

- 4.3.1 Se anestesiaron a cinco mosquitos a 4°C durante 15 minutos, luego se trituraron en 100 µl de buffer de lisis (Tris-HCl 100 mM pH 8.0, 0.5% SDS, NaCl 50 mM, EDTA 100 mM).
- 4.3.2 El lisado se incubó por una hora a 55°C, y posteriormente se le aplicó 5 µl de RNAsa 10 mg/ml y se mantuvo a temperatura ambiente durante 20 minutos.
- 4.3.3 Se agregó al lisado un volumen igual de fenol:cloroformo:isoamilico (25:24:1) y se mezcló hasta formar una emulsión.
- 4.3.4 La emulsión se incubó durante diez minutos a 55°C, y luego se centrifugó diez minutos a 10 000 rpm.
- 4.3.5 La fase acuosa se recuperó en un tubo limpio, se agregó un volumen igual de cloroformo:isoamílico (24:1) y se mezcló.
- 4.3.6 A la mezcla se le centrifugó diez minutos a 10 000 rpm para eliminar el rastro de fenol.
- 4.3.7 La fase acuosa se recuperó y se precipitó del DNA con 2.0 volúmenes de NaCl 5 M y 2.5 volúmenes de etanol al 100% frío.
- 4.3.8 Después de incubar toda la noche, se centrifugó a 12 000 rpm durante 25 minutos para obtener la pastilla.

- 4.3.9 La pastilla se lavó con 500 µl de etanol al 70% y se centrifugó durante 10 minutos a 10 000 rpm.
- 4.3.10 Se recuperó y se dejó secar a la pastilla por 15 minutos a temperatura ambiente.
- 4.3.11 Finalmente, se resuspendió en 100 µl de buffer T-10 (Tris-HCl 10 mM, pH 8.5) y se almacenó a -20°C hasta su uso.

4.4 Obtención de RNAi de los genes: proteína verde fluorescente (GFP) y *hnt*

Para la producción de RNAi *in vitro* se requirió de plantillas o molde de DNA. Para la obtención del fragmento DNA molde de GFP y *hnt* se realizaron dos rondas de PCR estándar, la primera con cebadores sin promotor y la segunda con cebadores con promotor.

Para la producción de RNAi *in vitro* se requirió plantillas o secuencias molde de DNA. La obtención de ambos fragmentos DNA molde GFP y *hnt* se obtuvieron mediante amplificación por PCR a partir de un plásmido donado a V. Valverde por Bruce M. Christensen (Kato et al., 2006) y DNA genómico de mosquitos, respectivamente. Al DNA molde GFP y DNA se les agregaron las secuencias del promotor de la RNA polimerasa dependiente de DNA (DbRP) derivada del bacteriofago T7 y SP6 por medio de la amplificación con cebadores que poseen en su extremo 5' esta secuencia promotor. Finalmente, se realizó la transcripción *in vitro* utilizando la actividad catalítica de estas polimerasas de RNA (Promega) (Fire et al., 1998; Xu et al., 2019).

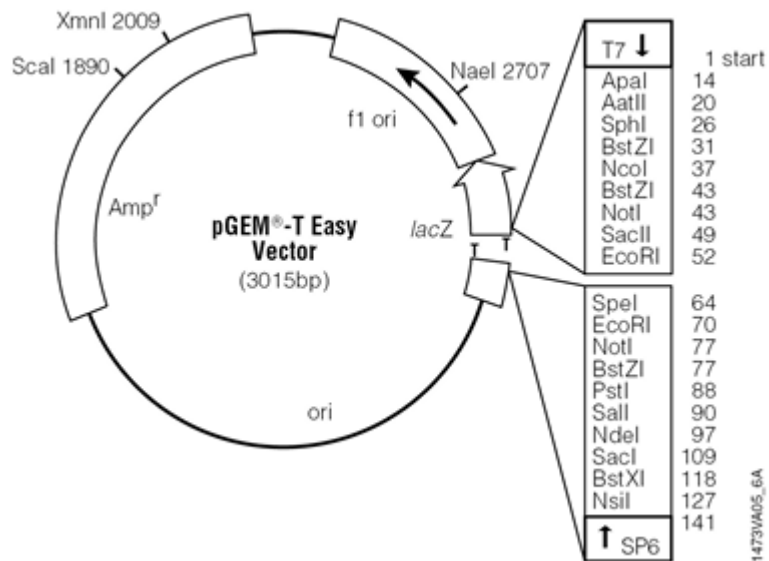


Figura 9. Mapa del plásmido pGEM-Teasy ((Promega, Madison, WI), que se utilizó para clonar la región de GFP (acceso de GenBank, U76561) (Kato et al., 2006).

4.4.1. Obtención de DNA molde GFP por plásmido

1. Se extrajo la secuencia molde de GFP a partir del plásmido pGEM-Teasy por medio de PCR punto final
 - 1.1. Se utilizaron cebadores sentido y antisentido previamente diseñados en el laboratorio (GFP_F y GFP_R) para amplificar la secuencia molde.
 - 1.2. Se amplificó la secuencia molde con los siguientes reactivos y condiciones de amplificación que se observan en la Tabla 1 y 2.
2. Se visualizó el producto de PCR por medio de una electroforesis en gel de agarosa 1.5% revelado con una solución de bromuro de etidio 5 mg/μl y TAE 10X.

Tabla 1. Concentraciones y cantidades para preparación de una reacción de 25 μ l para PCR para amplificar el DNA molde GFP

Buffer 5X Green Go Taq	5 μ l
MgCl ₂ 25 mM	2 μ l
dNTPs 10 mM	0.5 μ l
Oligonucleótidos sentido y antisentido 4 pmol/ μ l	1 μ l / cada cebador
Polimerasa Go Taq	0.25 μ l
Agua grado biología molecular	11.25 μ l
DNA (Stock 1ng/ μ l) pGEM-Teasy	4 μ l

Tabla 2. Condiciones PCR punto final para amplificar DNA molde GFP

Condiciones de amplificación PCR punto final	
Temperatura de Desnaturalización	94°C / 2 min
Temperatura de alineamiento	55°C / 15 seg
Temperatura de elongación	72°C / 30 seg
Número de ciclos	35

4.4.2. Obtención de DNA molde *hnt* por DNA genómico

1. Se obtuvo la secuencia molde de *hnt* a partir del DNA genómico de *A. albimanus* (AALB003334) de la base Vectorbase.
 - 1.1. Se utilizaron cebadores sentido y antisentido previamente diseñados en el laboratorio (Oligo 5280 y 8909) para amplificar la secuencia molde.
 - 1.2. Se amplificó la secuencia molde con los siguientes reactivos y condiciones de amplificación que se observan en la Tabla 3 y 4.
2. Se visualizó el producto de PCR por medio de una electroforesis en gel de agarosa 1.5% revelado con una solución de bromuro de etidio 5 mg/ μ l y TAE 10X.

Tabla 3. Concentraciones y cantidades para preparación de una reacción de 25 μ l para PCR para amplificar DNA molde *hnt*.

Buffer 5X Green Go Taq	5 μ l
MgCl ₂ 25 mM	2 μ l
dNTPs 10 mM	0.5 μ l
Oligonucleótidos sentido y antisentido 8 pmol/ μ l	0.5 μ l / cada cebador
Polimerasa Go Taq	0.25 μ l
Agua grado biología molecular	15.25 μ l
DNA genómico mosquito (2ng/ μ l)	1 μ l

Tabla 4. Condiciones PCR punto final para amplificar DNA molde GFP.

Condiciones de amplificación PCR punto final	
Temperatura de Desnaturalización	94°C / 2 min
Temperatura de alineamiento	60°C / 15 seg
Temperatura de elongación	72°C / 30 seg
Número de ciclos	35

4.4.3. Adición de la secuencia promotor T7 al extremo 5' de los cebadores sentido y antisentido

La secuencia del promotor de la DbRP derivada del bacteriofago T7 se añadió a las cadenas sentido y antisentido del DNA molde GFP en la segunda ronda de amplificación por PCR punto final como se observa en la figura 10. La secuencia del promotor se encuentra en el extremo 5' de los cebadores que se utilizaron para la obtención de las plantillas de DNA. Una vez que se obtuvo la secuencia molde, se añadió la secuencia promotor por medio de la técnica de PCR para su posterior transcripción *in vitro*.

4.4.3.1. El producto de la primera ronda de PCR para obtención del DNA molde de GFP se utilizó para la reacción de PCR con las mismas cantidades y

concentración de la Tabla 1. En esta ronda se realizaron dos reacciones con los mismos cebadores de la primera ronda de PCR con los cebadores que contienen la secuencia del promotor T7 como se indica en la tabla 5 y en la figura 10.

- 4.4.3.2. Las condiciones de amplificación por PCR que se programaron en el termociclador fueron las mismas de la Tabla 2, con la diferencia que se utilizaron dos temperaturas de alineamiento a diferentes ciclos (10 + 25 ciclos a 55°C y 60°C, respectivamente).
- 4.4.3.4. El producto se visualizó por medio de una electroforesis en gel de agarosa 1.5% revelado con una solución de bromuro de etidio 5 mg/μl y TAE 10X.

Tabla 5. Oligonucleótidos y producto PCR de la primera ronda de amplificación descrita en la sección 4.4.1 utilizados en las dos reacciones de PCR que sirven para añadir la secuencia T7 a la secuencia molde DNA de GFP.

Oligonucleótidos	Cantidad de DNA a amplificar
GFP_pT7F + GFP_R	1 μl de producto de PCR 0.4 pGEM-Teasy
GFP_pT7R + GFP_F	1 μl de producto de PCR 0.4 pGEM-Teasy

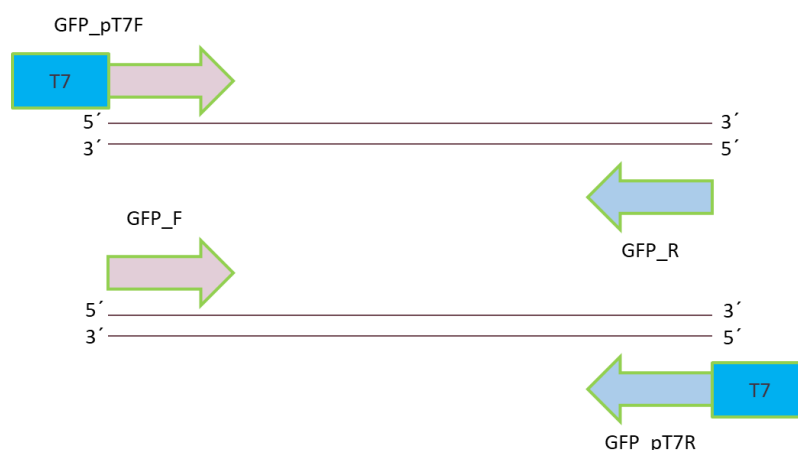


Figura 10. Adición de la secuencia promotor T7 a las cadenas sentido y antisentido.

La visualización en gel de agarosa 1.5% dio como resultado una sola banda para la secuencia de antisentido con el promotor T7 y bandas inespecíficas para la secuencia de sentido con el promotor T7. La reacción de PCR de la secuencia de sentido con el promotor T7 se repitió con un cambio en los ciclos de amplificación (6 + 24) con las mismas temperaturas de alineamiento programadas con anterioridad para cada ronda. Una vez estandarizadas, las reacciones de PCR para la obtención de DNA molde con la secuencia promotor T7 en las cadenas de DNA sentido y antisentido se escalaron a 250 μ l y se utilizaron para la purificación.

4.4.4. Purificación de los productos de PCR de la secuencia molde GFP

La purificación para el molde de GFP con el promotor en su extremo 5' de la cadena antisentido se realizó directamente por columna Zymo-Spin aplicando el método de purificación y concentración de DNA de alta calidad de ZYMO RESEARCH. El mismo método de purificación se utilizó para el DNA GFP que contenía el promotor en su cadena sentido; con un paso extra debido que se extrajo el fragmento a partir del gel de agarosa, ya que se visualizó una banda inespecífica de mayor tamaño que la banda de interés.

De manera similar se adicionaron las secuencias del promotor T7 en las cadenas sentido y antisentido de las secuencia molde de *hnt*. Así mismo, se purificó de manera directa por columna Zymo-Spin para proceder a la transcripción *in vitro*.

4.4.5. Transcripción *in vitro* de las dobles cadenas de RNA de GFP y *hnt*

La síntesis de dsRNA del gen control (GFP) y gen de interés (*hnt*) se realizó siguiendo el protocolo T7 RiboMAXTM Express RNAi System de Promega, con modificaciones de acuerdo con estandarizaciones establecidas en el laboratorio. El procedimiento inició con muestras del gen de interés que contienen la secuencia promotor T7 en sus cadenas sentido y antisentido en sus extremos 5'.

1. Se realizó la transcripción *in vitro* por 6 horas para las cuatro muestras (sentido y antisentido). Se sometieron a un tratamiento de DNasa por 30 min.
2. Después a un tratamiento de purificación con acetato de amonio y precipitación con etanol. Posteriormente, as muestras de RNA se cuantificaron.

- Una vez cuantificadas las muestras se hibridaron en relación 1:1 por 5 minutos a temperatura de ebullición.
- El RNAi de GFP y *hnt* se resuspendieron en agua grado biología molecular (en total fueron cuatro muestras, dos para *hnt* y dos para GFP para la hibridación de RNAi).
- Finalmente se realizaron alicuotas y se guardaron a -80°C.

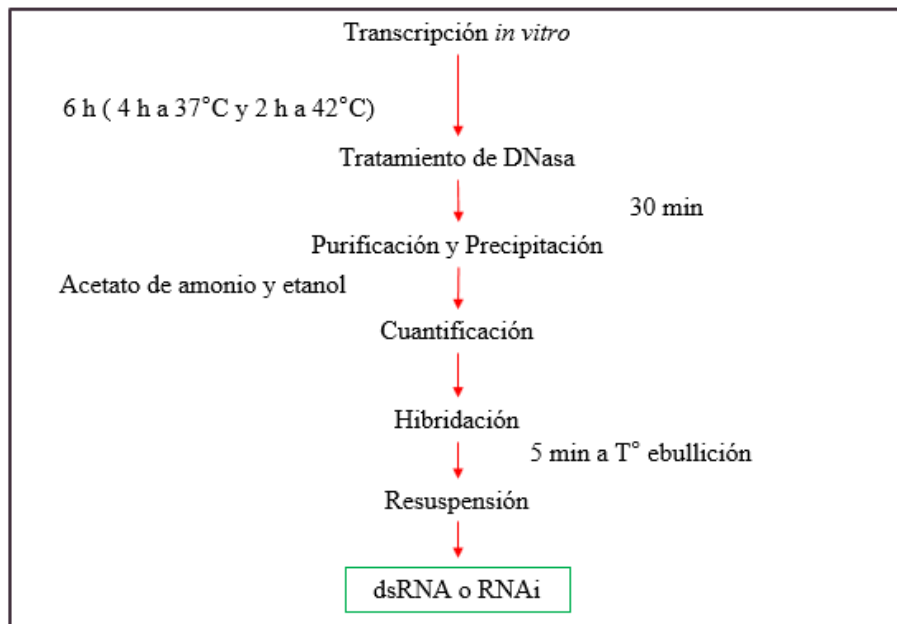


Figura11. Esquema general para la síntesis de RNA de doble cadena (dsRNA o RNAi)

4.5. Microinyección de RNAi de GFP y *hnt* a mosquitos para silenciamiento génico

- Se escogieron solamente mosquitos lo suficientemente robustos para soportar el proceso de microinyección.
- Se microinyectaron 300 ng de RNAi (control y *hnt*) en el tórax de mosquitos divididos en grupos de 5 mediante un sistema de microinyección montado en el laboratorio (Figura 11 y 12), y se diseccionaron sus intestinos a las 24 horas posteriores a la microinyección.
- Se repitió el proceso de perfundir a los mosquitos con 500 ng de RNAi aumentando el tiempo de disección de intestinos a 72 horas, con la finalidad de aumentar el porcentaje de silenciamiento.

4. Finalmente, se microinyección 500 ng a los mosquitos y después de 24 horas del procedimiento, se diseccionaron a los mosquitos para obtener los 5 intestinos por grupo. Estos se conservaron en 50 μ l de RNA later a -80°C hasta su uso.

Las cantidades de RNAi y mosquitos utilizados para el proceso de silenciamiento para se observa a continuación:

Tabla 6. Cantidades de RNAi y mosquitos utilizados para el proceso de microinyección. Se muestran las condiciones que se aplicaron para determinar el porcentaje óptimo de silenciamiento de *hnt* para analizar su efecto sobre la respuesta inmune innata de los mosquitos.

RNAi	Cantidad RNAi	Cantidad de mosquitos	Tiempo transcurrido
RNAi GFP y <i>hnt</i>	300 ng	10	24 h
RNAi GFP y <i>hnt</i>	500 ng	10	24 h
RNAi GFP y <i>hnt</i>	500 ng	10	72 h

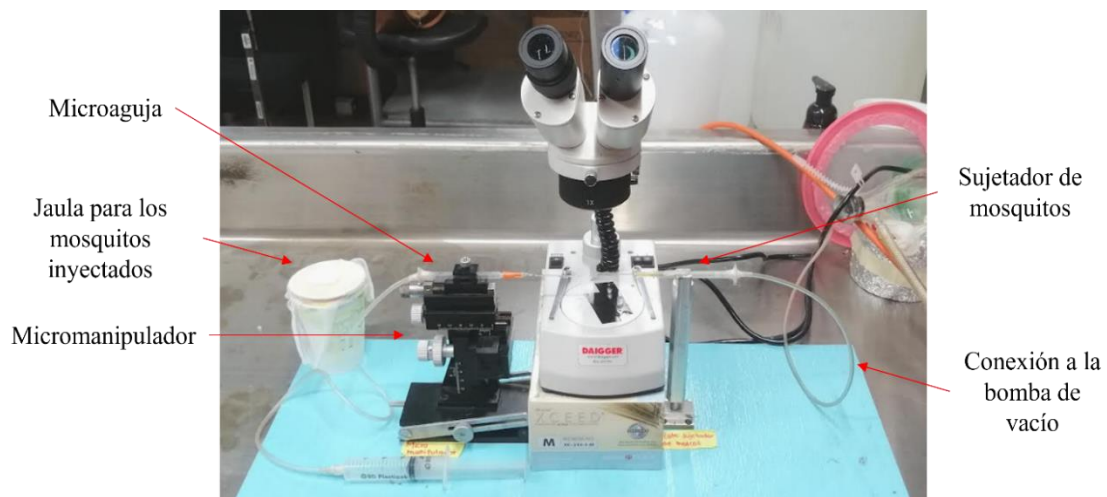


Figura 12. Sistema de microinyección. Las partes que componen a este sistema son: la microaguja para microinyectar, el sujetador de mosquitos conectado a una bomba de vacío, el micromanipulador para mover la microaguja y la jaula para los mosquitos microinyectados.



Figura 13. Proceso de perfusión o microinyección en el tórax de mosquito *A. albimanus*.

4.6. Extracción de RNA total, cuantificación y síntesis de cDNA

Se obtuvo RNA total de los 5 intestinos de mosquitos microinyectados con RNAi control y *hnt* mediante el siguiente protocolo por fenol-cloroformo:

1. Se centrifuga la muestra de intestinos que se preservaron en RNA later a 5000 rpm durante 5 minutos a una temperatura de 4°C.
2. Se retira el sobrenadante y se agregan 150 µl de trizol.
3. Los intestinos se maceraron con un pistilo, luego se agregaron 600 µl y 200 µl de trizol y cloroformo, respectivamente. Esto se mezcló por inmersión y se incubó por 5 minutos.
4. Las muestras se centrifugaron a 14 000 rpm durante 15 minutos a 4°C.
5. La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo y se agregaron 400 µl de isopropanol. Se dejó precipitar toda la noche a -80°C.
6. Se centrifugó la muestra a 14 000 rpm durante 15 minutos a 4°C, y se descartó el sobrenadante.
7. La pastilla se lavó en 750 µl de etanol al 80% mediante inmersión.
8. Se centrifugó a 14 000 rpm durante 5 minutos a 4°C.
9. La pastilla se deja secar a temperatura ambiente durante 5 a 10 minutos, se resuspende en agua libre de RNAsas y se cuantifica para luego proceder a la síntesis de cDNA. El RNA se cuantificó por medio del espectrofotómetro NanoDrop™ Lite de Thermo Scientific™.

A partir del RNA total se sintetizó cDNA para llevar a cabo la verificación del silenciamiento en la expresión de *hnt* mediante qPCR. Para la síntesis de cDNA se requirió 1 µg de RNA total de intestinos. El cDNA se obtuvo a partir de la reacción de 20 µl que se muestra en la tabla 7.

Tabla 7. Reactivos y cantidades para la reacción de síntesis de cDNA

Go Screenshot Reaction Buffer oligo dt	4 µl
GoScript Enzyme	2 µl
RNA total (1 µg/µl)	1 µl
Agua libre de RNAsas	13 µl
Total volumen de reacción	20 µl

4.7. Cuantificación relativa por PCR en tiempo real

La cuantificación relativa por qPCR se realizó para observar la expresión relativa de los genes de interés para este estudio que fueron: *hnt*, gambicina, cecropina y atacina.

El silenciamiento de *hnt* se verificó mediante retrotranscriptasa reversa qPCR (RT-qPCR). Se obtuvo el cDNA a partir del RNA total de intestinos de mosquitos microinyectados que sobrevivieron 24 horas (mosquitos silenciados). Para visualizar la expresión de los genes se utilizó el sistema de detección de QIAGEN mediante PCR en tiempo real. Para la realización de la qPCR se necesitaron cebadores dirigidos para la amplificación de *hnt* a partir del genoma AALB003334, diseñados previamente en el laboratorio de la Dra. Verónica Valverde en el Instituto Nacional de Salud Pública (Contreras-Garduño, et al., 2015). Así como cebadores para el control interno S7, que es utilizado como gen de referencia para qPCR. Este codifica para una proteína ribosómica RPS7 que es un componente de la subunidad 40S en células eucariotas (Na et al., 2021). El gen S7 se ha

documentado como un gen idóneo para normalizar datos de la expresión relativa de genes de *Anopheles* (Liew et al., 2017; Claudio-Piedras et al., 2020; Condé et al., 2021). En el termociclador Rotor Gene Q de QIAGEN se colocaron las muestras que fueron los grupos silenciados y no silenciados por duplicados técnicos con sus respectivos controles internos S7 y un control externo con agua grado biología molecular (tabla 8).

Los oligonucleótidos S7 para la normalización de la cuantificación relativa de la expresión de genes están dirigidos al gen para la proteína ribosomal S7 (Beltran-Juárez A., Tesis de Maestría en preparación; Beltrán y Valverde, manuscrito en preparación). Para la detección de la expresión relativa del gen *hnt* de *A. albimanus* se utilizaron cebadores dirigidos al gen AALB003334 (Contreras-Garduño, et al., 2015).

En las preparaciones de las reacciones para qPCR de 10 µl se utilizaron lo siguiente: *TB Green*TM Advantage® qPCR Premix (2X) para detección de la señal de amplificación del gen *hnt*, oligonucleótidos de sentido y antisentido a una concentración de 2.0 pM y cDNA en dilución 1/10 y agua grado biología molecular. Las condiciones de amplificación fueron

Tabla 8. Orden de las muestras colocadas en el termociclador Rotor Gene Q. Se visualizan los dos grupos de muestras de cDNA obtenidas a partir del intestino medio de mosquitos silenciados (microinyectados con RNAi de *hnt*) y no silenciados (microinyectados con RNAi de GFP), con sus respectivos controles internos y externos.

	Silenciados	Oligos	No silenciados	Oligos
<i>A</i>	<i>dshnt</i>	<i>hnt</i>	dsGFP	<i>hnt</i>
<i>B</i>	<i>dshnt</i>	<i>hnt</i>	dsGFP	<i>hnt</i>
<i>C</i>	Agua	<i>hnt</i>	Agua	<i>hnt</i>
<i>D</i>	<i>dshnt</i>	S7	dsGFP	S7
<i>E</i>	<i>dshnt</i>	S7	dsGFP	S7
<i>F</i>	Agua	S7	Agua	S7

Tabla 9. Condiciones de programa de qPCR para *hnt*, *S7*, gambicina, cecropina y atacina.

Gen	Oligonucleótidos sentido y antisentido	Temperatura/tiempo			
		1 ciclo	40 ciclos		
		Inicial	Desnaturalización	Alineamiento	Elongación
<i>hnt</i>	Aal_Hnt_2F Aal_Hnt_2R	94°C/30s	94°C/30seg	60°C/30seg	72°C/30seg
<i>S7</i>	<i>S7_F</i> <i>S7_R</i>	94°C/30s	94°C/30seg	60°C/30seg	72°C/30seg
Gambicina	AalbGamF2 AalbGamR2	94°C/2min	94°C/30seg	57°C/30seg	72°C/30seg
Cecropina	AalCec1 F AalCec1 R	94°C/2min	94°C/30seg	57°C/30seg	72°C/30seg
Atacina	AalbAttF2 AalbAttR2	94°C/2min	94°C/30seg	57°C/30seg	72°C/30seg

4.7.1. Cálculos de normalización por medio del método delta delta Ct

A continuación, se muestra el cálculo para la obtención del porcentaje de “Atenuación” a partir de los Ct adquiridos de la amplificación de las muestras de cDNA de mosquitos silenciados y no silenciados:

- Una vez obtenidos los datos de Ct de las muestras de mosquitos silenciados y no silenciados se realizó una normalización de los datos con los datos del gen de interés y el gen normalizador *S7* (tabla 10 y 11).

Tabla 10. Datos de Ct de la amplificación de *hnt* a partir de muestra de cDNA de mosquitos silenciados.

	Oligo	Ct	Ct mean	Sq std.Dev
dsHNT	<i>Hnt</i>	30.58	30.47	0.16
dsHNT	<i>Hnt</i>	30.35		
AGUA	<i>hnt</i>	NA		
dsHNT	<i>S7</i>	19.34	19.56	0.31
dsHNT	<i>S7</i>	19.78		
AGUA	<i>S7</i>	35.13	35.13	

Tabla 11. Datos de Ct de la amplificación de *hnt* a partir de muestra de cDNA de mosquitos no silenciados.

	Oligo	Ct	Ct mean	Sq std.Dev
dsGFP	<i>Hnt</i>	26.2	25.97	0.31
dsGFP	<i>Hnt</i>	25.75		
AGUA	<i>Hnt</i>	NA		
dsGFP	S7	19.39	19.58	0.27
dsGFP	S7	19.77		
AGUA	S7	NA		

2. El delta Ct de las muestras de los mosquitos silenciados y no silenciados se obtiene con la siguiente formula:

$$\Delta Ct = Ct(\text{gen } hnt) - Ct(\text{gen } S7)$$

3. Después, con este método se compararon las diferencias entre las muestras de los mosquitos silenciados y no silenciados

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{Silenciado}) - \Delta Ct(\text{No silenciado})$$

4. El cálculo de la variación de la expresión génica entre las dos muestras comparadas se realizó mediante la siguiente fórmula: $2^{-\Delta\Delta Ct}$, donde 2 es la eficiencia, que se fija en el 100 %.

5. Finalmente, para calcular el porcentaje de “Atenuación” se aplicó la siguiente formula:

$$\% \text{ KD} = (1 - 2^{-\Delta\Delta Ct}) \times 100$$

4.8. Reto inmunológico en mosquitos con silenciamiento

Para realizar el reto inmunológico en mosquitos silenciados se realizó el siguiente procedimiento:

1. Se microinyectaron un volumen de 0.5 μl que contuvieron 500 ng RNAi *hnt* y control (GFP) en el tórax de 5 mosquitos por grupo (dos grupos en total).
2. Luego de 24 horas, se aplicó una segunda perfusión a mosquitos silenciados y control. Se les microinyectaron 0.5 μl de bacterias *Micrococcus luteus* (muertas por calor a una concentración de 5×10^7 ufc/ μl) en el tórax de los mosquitos

3. Tres horas después, se anestesiaron en frío por 10 minutos para proceder con la disección del intestino, túbulos de Malpighi, ovarios, tórax, cuerpo graso y cabeza. Los órganos extraídos se resuspendieron en 50 µl de RNA later y se almacenaron a -80°C.

El reto inmunológico se realizó con la finalidad de ver el efecto de la atenuación del gen *hnt* en la expresión relativa de genes inmunidad como gambicina y cecropina mediante qPCR:

Gambicina es un péptido antimicrobiano que se ha reportado que puede matar bacterias gram positivas y gram negativas. Este péptido se ha observado que se encuentra inducido en las etapas temprana y tardía de la infección por malaria natural. La infección por bacterias y por *Plasmodium* spp activan las vías de defensa como Toll e Imd NF-κB, los cuales provocan que factores de transcripción se transloquen al núcleo y haya la liberación de PAM (Vizioli et al., 2001; Clayton et al., 2014).

Las cecropinas pertenecen al grupo de PAM principales que actúan contra bacterias, hongos y protozoos en el sistema inmune innato de mosquitos. Estas poseen actividad lítica y atacan a bacterias gram positivas y gram negativas. Además, que se encuentran activadas en el organismo del mosquito, así como sucede en el caso de gambicina, durante la activación de las vías Toll e Imd (Clayton et al., 2014; Santos et al., 2022).

5. Resultados

5.1. Identificación del ortólogo del gen *hnt* en el genoma de *A. albimanus*

5.1.1. Búsqueda in silico del gen *hnt* en el genoma de *D. melanogaster*

En la base de datos *Flybase* para la mosca de la fruta, se encuentra el gen *hnt* como Dmel/peb con ID de referencia FBgn0003053, junto a una descripción de sus funciones. Este gen está relacionado a diferentes funciones moleculares, procesos biológicos y componentes celulares. Es un factor de transcripción de unión al DNA debido a sus dominios dedos de Zinc, específico de la RNA polimerasa II (RNAPol II); y tiene actividad de unión a DNA en la región reguladora en *cis* de la RNAPol II. También, *Flybase* aglomera información acerca de su localización genómica como se puede apreciar en la tabla 12 y en el figura 15.

Tabla 12. Búsqueda en *Flybase* y *Vector base*. Datos del mapa genético del gen *hnt* de *D. melanogaster* y *A. albimanus*.

Organismo	Nombre	Tipo	Posición	Longitud	Exones	Transcritos
<i>D. Melanogaster</i> FBgn0003053	pebbled o hnt	Gen	X:4617564. .4627206	9643 pb	5	2
		mRNA	X:4617564 ...4627206 X:4617564. .4626104	8541 pb		
<i>An. albimanus</i> AALB003334	pebbled o hnt	Gen	X:1047348 6..1048185 5	8369 pb	5	1
		mRNA	X:1047348 6..1048185 5	7485 pb		

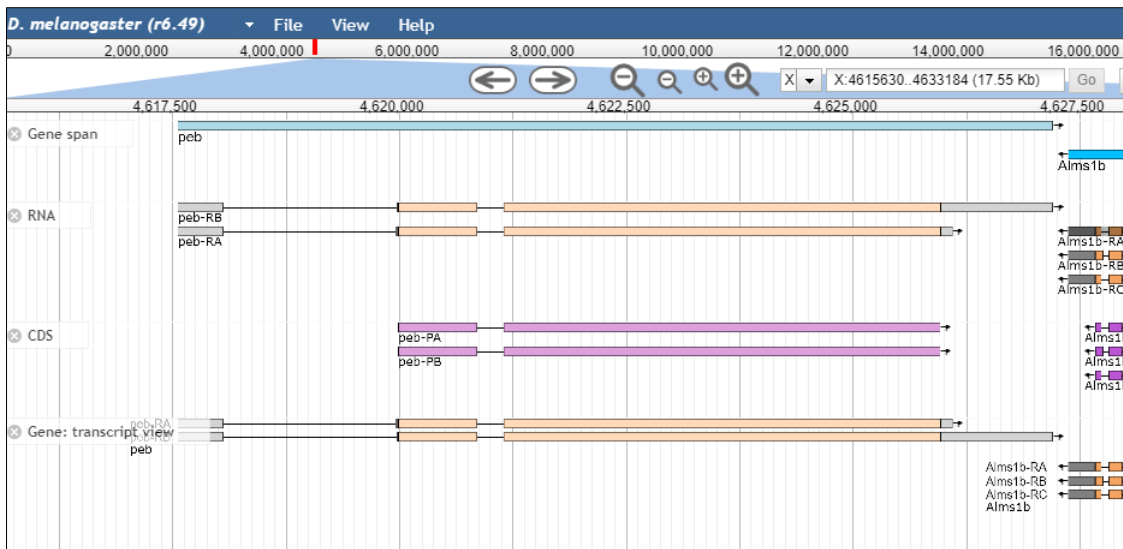


Figura 15. Mapa genómico de *D. melanogaster*. Se visualizan las características mostradas en la tabla 12, regiones del gen *hnt* (también conocido como *peb* o *pebbled*) como las secuencias codificantes, los dos RNA mensajeros, sus dos secuencias codificantes (CDS) y sus transcritos (Obtenido de Flybase).

5.1.2. Gen ortólogo de *hnt* en *A. albimanus* y *A. gambiae*

Una vez que se identificó el gen *hnt* en el genoma de *D. melanogaster*, se localizaron sus genes ortólogos en *A. gambiae* y *A. albimanus* en la base de datos *Vectorbase*. Con las secuencias proteicas descargadas de *Vectorbase* se realizó un alineamiento de proteínas mediante el Software *CLC Main Workbench 8*, en el que aprecia la similitud de *Hnt* entre los organismos mencionados (figura 16). Además, que se encontró reportado en la base de datos que este gen se encuentra conservado en el núcleo de las células de dichas especies.

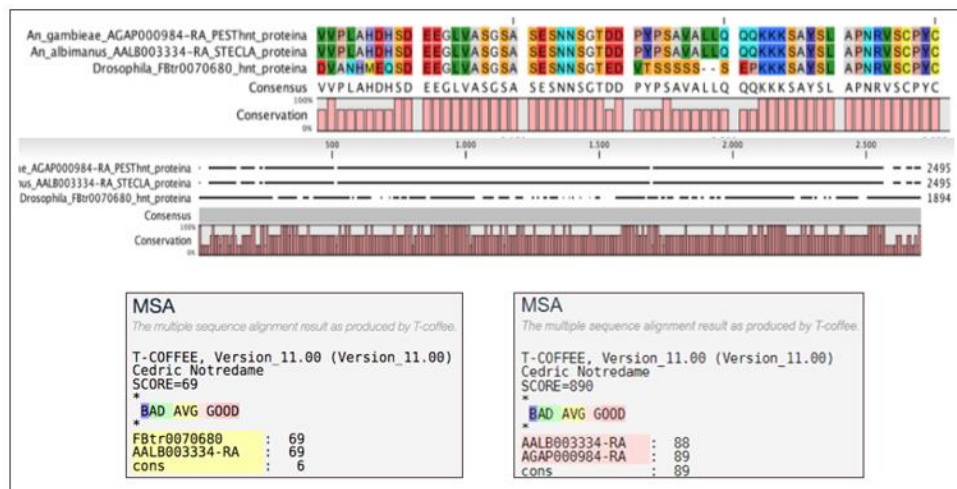


Figura 16. Alineamiento de proteínas HNT entre *D. melanogaster*, *A. gambiae* y *A. albimanus* mediante Software CLC Main Workbench 8. Se indica que las secuencias tienen regiones conservadas, y el análisis por servidor de alineamiento múltiple de T-COFFEE muestra un porcentaje de identidad de 69% entre *D. melanogaster* (FBtr0070680) y *A. albimanus* (AALB003334-RA), y 89% entre *A. albimanus* (AALB003334-RA) y *A. gambiae* (AGAP000984-RA), lo cual implica que estas proteínas son homólogas entre las tres especies. Se realizó una PCR in silico utilizando Software CLC Main Workbench 8 que mostró que los oligos para la amplificación del fragmento del gen *hnt* (figura 15) para el molde de DNA solo reconocen al gen AALB003334 (código Vectorbase). y no se unen a ningún otro locus.



Figura 17. Representación de la región del gen AALB003334, del cual se obtuvo la secuencia de DNA *hnt* para la síntesis de RNAi (Toscano y Valverde manuscrito en preparación).

5.2. Síntesis de RNAi

Para la síntesis de RNAi se obtuvieron fragmentos de DNA molde para *hnt* y GFP. Para *hnt* se extrajo DNA genómico de intestino de mosquitos adultos de 3 a 5 días de edad, y en el caso del DNA molde de GFP, se obtuvo la secuencia de interés a partir del plásmido pGEM-Teasy por PCR. Posteriormente, se añadieron los oligonucleótidos a las cadenas sentido y antisentido que contienen la secuencia promotor de la RNA polimerasa del fago T7 en sus extremos 5' de los moldes de DNA para *hnt* y GFP (Figura 15). Estas secuencias fueron usadas para sintetizar 90ug y 80ug de RNAi de GFP y *hnt*, respectivamente, con la intención de llevar a cabo el proceso de microinyección a mosquitos.

Cabe aclarar que los DNA molde se prepararon de manera separada para obtener dos secuencias promotor en las cadenas sentido y antisentido del DNA de doble cadena. De manera similar se obtuvo para los DNA molde para *hnt* (figuras 18 y 19).

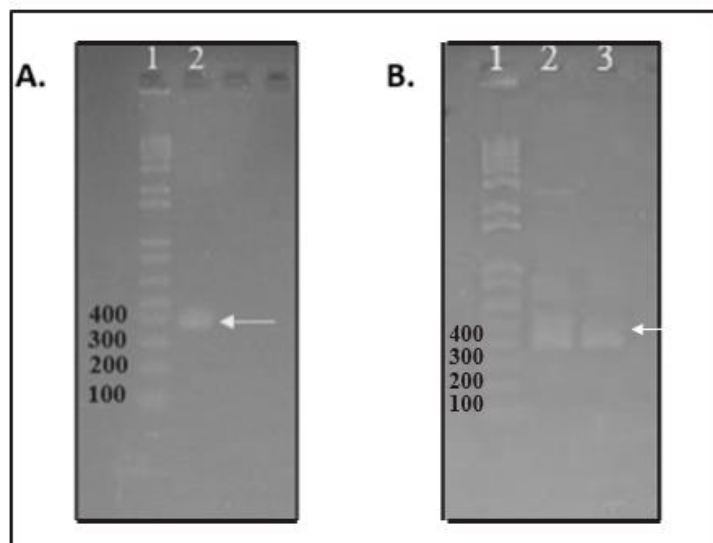


Figura 18. Productos de PCR de la primera y segunda ronda de amplificación por PCR para la obtención del DNA molde GFP. Los fragmentos obtenidos se visualizaron en geles de agarosa 1.5%. A). 1. 10 μ L de marcador molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher). 2. 8 μ L del producto de PCR que contiene el fragmento de DNA molde de GFP. B). 1. 10 μ L de marcador molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher). 2. 8 μ L de producto de PCR de DNA molde GFP con el promotor T7 amplificado en su extremo

5' de la cadena sentido. 3. 8 μ l de producto de PCR de DNA molde GFP con el promotor T7 amplificado en su extremo 5' de la cadena antisentido.

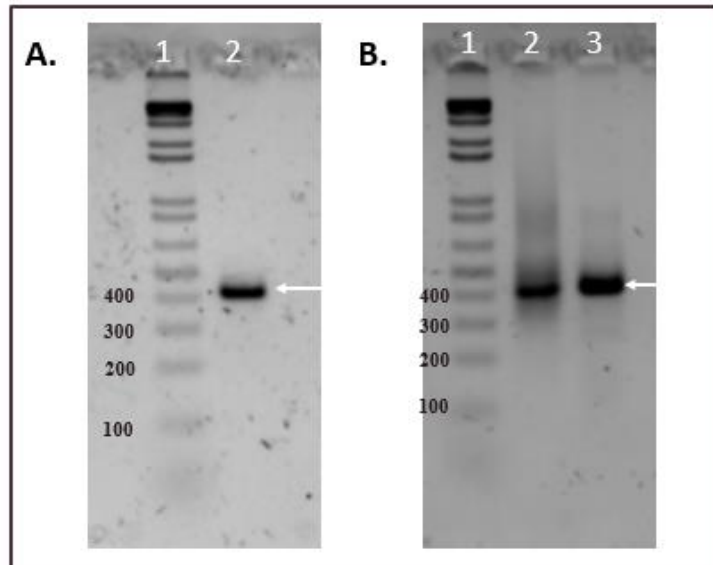


Figura 19. Productos de PCR de la primera y segunda ronda de amplificación por PCR para la obtención del DNA molde *hnt*. Los fragmentos obtenidos se visualizaron en geles de agarosa 1.5%. A). 1. 10 μ L de marcador molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher). 2. 8 μ l del producto de PCR que contiene el fragmento de DNA molde de *hnt*. B). 1. 10 μ l de marcador molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher). 2. 8 μ l de producto de PCR de DNA molde *hnt* con el promotor T7 amplificado en su extremo 5' de la cadena sentido. 3. 8 μ l de producto de PCR de DNA molde *hnt* con el promotor T7 amplificado en su extremo 5' de la cadena antisentido.

5.3. Microinyección de mosquitos con RNAi

En la tabla 13, se pudo apreciar los grupos experimentales que se utilizaron para el proceso de microinyección del RNAi, de los cuales se obtuvieron distintos porcentajes de silenciamiento como se observa en el apartado de análisis génico. El porcentaje de silenciamiento fue del 55% y 0% para grupos de mosquitos inyectados 300 ng y 500 ng con un tiempo transcurrido de 24 y 72 horas (se recuperó la expresión del gen comparado con el control), respectivamente. El porcentaje de atenuación de *hnt* fue mejor en un tiempo transcurrido de 24 horas con la introducción de 500 ng de RNAi. Por ello, en total para el grupo con mejor porcentaje de silenciamiento hubo 20 mosquitos inyectados (cuatro grupos de cinco mosquitos cada uno inyectados con 500 ng RNAi: control y *hnt*) para el silenciamiento génico y el reto inmunológico (Tabla 13). Los diez primeros mosquitos se utilizaron para obtener el silenciamiento de *hnt* con su respectivo control, en el que se observó su efecto a las 24 horas postratamiento. Los otros diez mosquitos se les aplicó una segunda inyección con bacterias muertas para realizar el reto inmunológico.

Cabe resaltar que a los mosquitos con 300 ng y 500 ng de RNAi introducidos en su organismo no se aplicó el reto inmunológico en un tiempo transcurrido postratamiento de 24 horas y 72 horas, respectivamente. Entonces, se decidió hacer los experimentos siguientes con 500 ng que dio el mejor resultado de silenciamiento a las 24 horas.

Tabla 13. Cantidad total de mosquitos utilizados para el procedimiento de silenciamiento y reto inmunológico.

RNAi	Número de mosquitos inyectados	
	Silenciamiento	Reto inmunológico
RNAi GFP (control)	5	5
RNAi <i>hnt</i> (gen blanco)	5	5

Luego de 24 horas después de la microinyección se obtuvieron los intestinos de todos los grupos de mosquitos sobrevivientes. Sin embargo, en el caso de los mosquitos con reto inmunológico se diseccionaron los intestinos después de tres horas de la

microinyección con bacterias muertas. De donde, se extrajo el RNA total (1.0 µg a 3.0 µg a partir de tres a cinco intestinos) para la posterior síntesis de cDNA a partir de 1.0 µg de RNA como se explicó en el apartado de metodología.

5.4. Análisis de la expresión de genes

Se visualizó la expresión relativa de cuatro genes de interés (*hnt*, *S7*, gambicina, y cecropina). La expresión del gen *hnt* se analizó para verificar el silenciamiento y el porcentaje de “*atenuación*”. Además, que para analizar el efecto de bloqueo del proceso de endorreplicación sobre la respuesta inmune del mosquito se retaron con bacterias *Micrococcus luteus* y se obtuvieron sus intestinos para la extracción de RNA y síntesis de cDNA. Luego, se observó la expresión relativa de genes de inmunidad como gambicina y cecropina por medio de RT-qPCR en el grupo de mosquitos silenciados y no silenciados.

5.4.1. Análisis de la expresión relativa del gen *hnt* a partir del intestino de mosquitos silenciados.

Para la obtención de la expresión relativa del gen *hnt* por qPCR se realizaron diluciones de 1/10 para los cDNA obtenidos de las dos condiciones experimentales: RNA de intestinos de mosquitos silenciados sin y con reto inmunológico, y sus respectivos controles.

De acuerdo al manual de Applied biosystem®, los datos obtenidos por la detección del ciclo umbral (Ct) mostraron una buena precisión de los ensayos de qPCR, debido a que cada muestra con su respectiva replica tuvo un valor de desviación estándar menor igual a 0.3. Este valor según el manual se encuentra en los factores que afectan a la precisión de la qPCR para la realización de la cuantificación relativa de la expresión génica.

Se realizaron análisis de cuantificación relativa de los genes *hnt*, *S7*, gambicina, y cecropina, a partir de intestinos de los mosquitos inyectados con RNAi GFP y *hnt* que se muestran en la tabla 14. Por medio de estos, se verificó la expresión y el silenciamiento del gen *hnt* en intestinos extraídos de mosquitos previamente inyectados con RNAi. El silenciamiento de *hnt* fue necesario verificarlo para continuar con el análisis del efecto de su baja expresión en la respuesta inmune innata de los mosquitos.

En los resultados de las expresiones relativas de las condiciones mostradas en la tabla 13, se resalta que el segundo grupo obtuvo el más alto porcentaje de silenciamiento que fue del 96% de acuerdo con los datos obtenidos del ensayo de qPCR normalizado con el gen ribosomal S7; los valores de la expresión relativa se calcularon utilizando el método delta delta Ct (Tabla 14 y Figura 18). Por lo tanto, el RNAi introducido al organismo del mosquito provocó la disminución del más del 90% la expresión de *hnt*, por lo que se verificó el éxito del tratamiento con RNAi.

Tabla 14. Porcentaje de silenciamiento obtenido a las 24 horas y 72 horas con diferentes cantidades de RNAi.

RNAi	Tiempo transcurrido	Porcentaje de silenciamiento
300 ng	24 h	55%
500 ng	24 h	96%
500 ng	72 h	0%

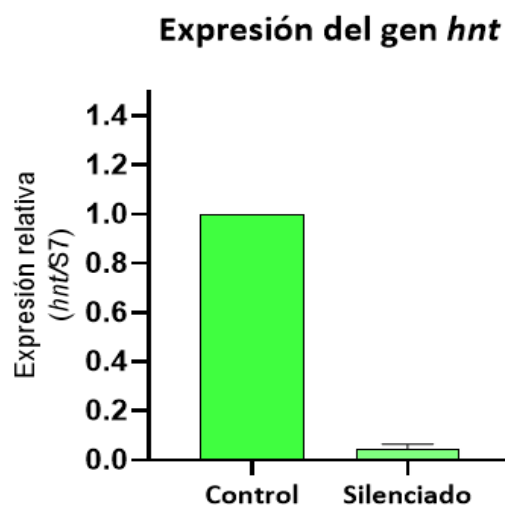


Figura 20. Visualización del nivel de silenciamiento génico del gen *hnt* del intestino de mosquitos *A. albimanus*. Expresión relativa para mosquitos inyectados con 500 ng RNAi GFP (control) y RNAi *hnt* con valores de 1 y 0.04, respectivamente. Los datos del grupo silenciado presentan una desviación estándar de 0.02.

5.4.2. Efecto del silenciamiento de *hnt* sobre la expresión de genes de inmunidad

En la figura 20 y tabla del anexo 4, el grupo control representa a intestinos de mosquitos que fueron inyectados con RNAi GFP y tratados con un reto inmunológico. La expresión del gen gambicina se observó 34 veces más a comparación del grupo silenciado. El grupo silenciado consistió en intestinos de mosquitos silenciados con RNAi *hnt* con reto inmunológico con *M. luteus*. El grupo silenciado mostró un valor 0.06 en su expresión relativa. Estos valores muestran que existe un efecto en la expresión relativa del gen de inmunidad gambicina cuando al gen *hnt* se le atenúa. Los datos de Ct fueron normalizados con el gen ribosomal S7 y la expresión relativa se calculó mediante el método delta delta Ct comparando grupos no silenciados y silenciados sin y con reto inmunológico (datos mostrados en la sección de Anexos).

El resultado de la expresión de gambicina señala que existe un efecto negativo de *hnt* sobre este gen de inmunidad cuando se reta a los mosquitos con bacterias *M. luteus*.

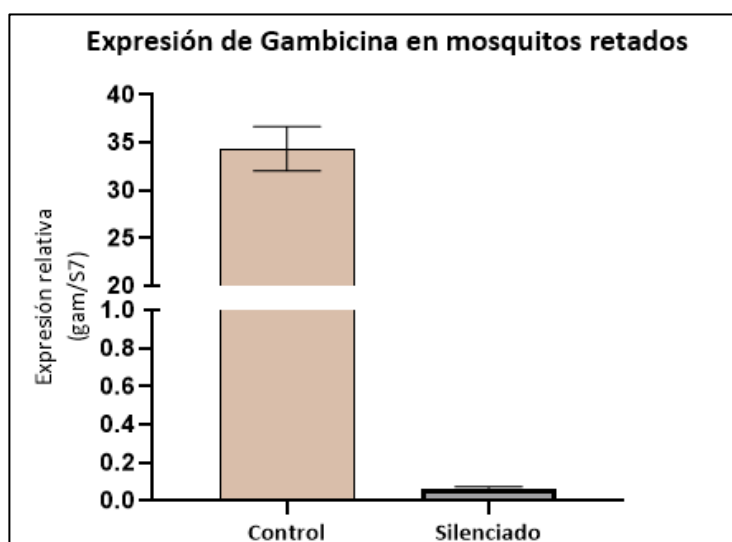


Figura 21. Expresión relativa del gen de inmunidad gambicina. El gen gambicina muestra una expresión de 34 y 0.06 con valores de desviación estándar de 2.3 y 0.014 para control y silenciado, respectivamente.

Para cecropina se puede observar el mismo patrón de efecto cuando está atenuada la expresión relativa del gen *hnt*, donde, los intestinos de mosquitos silenciados con reto inmunológico con *M. luteus* mostraron una baja expresión a comparación del grupo control de mosquitos no silenciados con reto (figura 21 y tabla anexo 4). Así mismo, los datos de Ct de la qPCR fueron normalizados con el gen de control interno S7, y su expresión relativa fue calculada con el método de delta delta Ct.

Hay un incremento más de 11 veces más en el grupo de mosquitos no silenciados a comparación del grupo de silenciados. Por lo tanto, este resultado señala que al igual que gambicina, el silenciamiento en la expresión relativa de *hnt* tiene un efecto negativo sobre la expresión del gen de inmunidad cecropina.

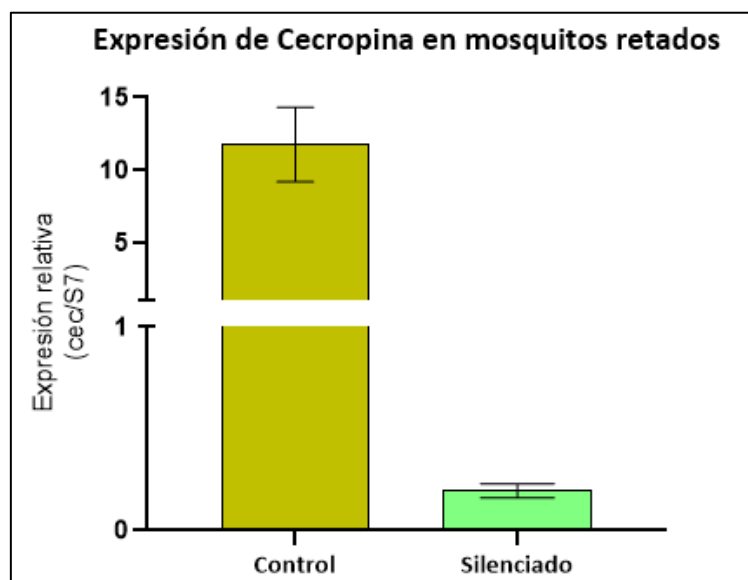


Figura 22. Expresión relativa del gen de inmunidad cecropina. El gen cecropina muestra una expresión de 11.63 y 0.19 para control y silenciado, respectivamente; con valor de desviación estándar de 2.5 para control y 0.035 para silenciado.

6. Discusión

Identificar el gen ortólogo de *hnt* de *Drosophila melanogaster* en el genoma de *A. albimanus* fue el paso inicial para la validación de cebadores y la obtención del RNAi. Por definición, los genes al ser ortólogos cumplen funciones idénticas en diferentes organismos, sin embargo no están implícitas: la conservación de la secuencia, la estructura y el contexto genómico (Fang et al., 2010). Los genes ortólogos se han utilizado para transferir la información de las funciones de genes reportados y caracterizados en organismos modelos a genes no caracterizados en genomas relativamente recién secuenciados. Aunque, hay casos en que no necesariamente se conserva la función del gen (Gabaldón y Koonin, 2013). El conocimiento de la secuencia ortóloga de *hnt* en *A. albimanus* de *D. melanogaster* permite un acercamiento de cómo podría actuar este gen en un organismo u otro. El alineamiento de un gen con su ortólogo ayuda al diseño de cebadores y por ende, aumentar el éxito de la amplificación de la secuencia de la región de interés (Yoon & Leitner, 2015). Además, es posible asumir en qué órganos u tejidos se expresa si se conoce en donde está expresando *hnt* en *D. melanogaster* y la posible función que cumple en *A. albimanus* (Kim et al., 2020).

Para la obtención de RNAi se necesitó una secuencia molde de DNA para el gen *hnt* de *A. albimanus*, en la cual se agregaron en ambos extremos 5' de las cadenas sentido y antisentido. Es importante tomar en cuenta que la secuencia molde a amplificar debe ser específica para los cebadores, por ende, estos estuvieron alineados con la secuencia (Anil Kumar y Chordia, 2015). Además, que la secuencia plantilla no debe poseer una homología completa con otros genes dentro del genoma de *A. albimanus*. De este modo el RNAi es específico para el gen a silenciar. La plantilla molde DNA que se obtuvo fue de 396 pb, el cual se encuentra en el tamaño óptimo de acuerdo al rango del protocolo T7 RiboMAX™ Express RNAi System de Promega de aproximadamente 200 a 2000 pb. El tamaño del fragmento molde depende del protocolo de síntesis de RNAi, generalmente se apunta a fragmentos de 300 a 600 pb. El rango de tamaño óptimo observado en distintos protocolos es de 100 a 1000 pb, determinado por la eficiencia de la reacción de síntesis de RNA (Kulkarni et al., 2006; Catteruccia & Levashina, 2009; Lamacchia et al., 2012).

La síntesis de RNAi se realizó con la finalidad de bloquear el proceso de endorreplicación en el intestino de *A. albimanus* por medio del silenciamiento de *hnt*. La endorreplicación como se mencionó es una variante al proceso del ciclo celular canónico, en el que el material genético se replica sin entrar a mitosis (Edgar & Orr-Weaver, 2001; Edgar et al., 2014). La hipótesis del presente proyecto indica que el endociclo está involucrado con la respuesta inmune innata en mosquitos *A. albimanus*. Debido que, se ha reportado el cambio en la cantidad de DNA dentro del organismo del insecto cuando se expone a diferentes patógenos (Herrera-Ortiz et al., 2011; Contreras-Garduño et al., 2015). La cantidad de DNA se ve aumentada debido a la liberación de proteínas efectoras, en las cuales se incluyen a los PAM. Los péptidos antimicrobianos como atacina, cecropina y gambicina se han reportado que su expresión se encuentra aumentada en el intestino medio de *A. albimanus* durante la infección por *Plasmodium berghei* (Herrera-Ortiz et al., 2011).

Por otro lado, los PAMs se han utilizado para estudiar la cinética bifásica que se visualizó en la inducción del “*priming*” inmunológico mediante RT-PCR, donde aumentaron su expresión ante una segunda exposición con el mismo parásito a comparación del primer reto inmunológico. Además, que se encontró al gen *hnt* coexpresado durante la infección con el parásito (Contreras-Garduño et al., 2015). Estos resultados demostrados en investigaciones previas al presente estudio, dieron lugar que se planteen nuevos objetivos que ayuden a entender la inmunidad del mosquito del género *Anopheles*. El aumento de la expresión relativa de los PAMS ante un reto inmunológico, ayudó que se tenga una estimación basal a lo que ocurre cuando el mosquito se enfrenta a un patógeno. Como se explicará más adelante la sobre expresión de estos genes de inmunidad fueron el control para corroborar que el gen *hnt* interviene en la transcripción de estos, ya que se observó que su disminución provocó que gambicina y cecropina no aumenten su expresión relativa ante la exposición de bacterias.

El silenciamiento de *hnt* interfiere con la endorreplicación porque este gen es un factor de transcripción clave para este proceso (Sun & Deng, 2007). El gen *hnt* codifica para la proteína Hnt, la cual posee funciones importantes en el organismo del mosquito. La función de interés para este estudio es su participación en la regulación en la vía de señalización Notch, ya que es un regulador relevante en la transición de la fase G2 a

mitosis para que las células puedan entrar a endociclo (Jia et al., 2014). La disminución del mRNA de *hnt* probablemente redujo la funcionalidad de la proteína Hnt. Aunque no se realizó el análisis de la concentración de proteína por western blot, debido a la inexistencia de anticuerpos para Hnt de *A. albimanu*. Se asume que el silenciamiento del gen afectó posiblemente a la función proteica, ya que se observó el efecto sobre los genes de inmunidad del sistema innato del mosquito cuando se retan con bacterias.

El RNAi es un proceso biológico que degrada el RNA mensajero debido a la presencia de RNAi. Este proceso cumple funciones importantes dentro del organismo huésped como por ejemplo en la defensa contra virus de RNA, así como, en la regulación génica transcripcional y postranscripcional. La tecnología del RNAi se ha utilizado para inducir el silenciamiento génico de un gen blanco con la finalidad de explicar su funcionalidad (Han, 2018; Xu et al., 2019). El mecanismo del RNAi actúa cuando el RNAi ingresa a una célula y efectúa su propósito de degradación del mRNA postranscripcionalmente. El RNAi es reconocido por una RNasa llamada Dicer que divide al RNAi en fragmentos cortos, que a su vez se unen a un complejo conocido como RISC. Luego, solo la hebra antisentido unido a RISC ingresa al núcleo para ensamblarse en el mRNA complementario para degradarlo (Balakrishna Pillai et al., 2017a).

Esta tecnología se ha aplicado para el control de enfermedades transmitidas por mosquitos, sin embargo, aún continúa en desarrollo para alcanzar su eficacia en campo para control de vectores. En este contexto, se ha utilizado el RNAi en productos génicos que están involucrados en procesos biológicos claves para la supervivencia, fertilidad, comportamiento y estado del mosquito (Airs & Bartholomay, 2017). El RNAi *in vitro* es una de las técnicas de preferencia para caracterizar las funciones de nuevos genes. Las caracterizaciones de las interacciones de *A. gambiae-Plasmodium falciparum* se han realizado por medio de la técnica de genética reversa basada en RNAi. A partir de la primera vez que se demostró el silenciamiento génico con RNAi en el 2001 en líneas celulares de *A. gambiae*, se han ido desarrollando una serie de estudios que involucran esta tecnología. La microinyección de RNAi en el tórax de los mosquitos adultos es muy eficaz dado que la mayoría poseen un éxito de silenciamiento superior al 90% (Balakrishna Pillai et al., 2017a). En este caso, se realizó el proceso de silenciamiento

del gen *hnt* en *A. albimanus*, el cual fue exitoso presentando un porcentaje de atenuación de 96% en intestinos extraídos 24 horas después de introducir el RNAi.

Una vez corroborado el éxito del silenciamiento se procedió a analizar si la atenuación del gen *hnt* tiene un efecto en la respuesta inmune innata del mosquito. En efecto, se pudo ver en el apartado de resultados que, a comparación del control, la expresión relativa de los genes de inmunidad como gambicina y cecropina presentaron una baja expresión. Los péptidos antimicrobianos son liberados cuando se activan las vías de inmunidad en presencia de patógenos que ingresan al sistema del mosquito como bacterias, parásitos, hongos o virus. Los PAMs como gambicina y cecropina se han reportado que se liberan cuando se activan las vías de inmunidad Toll e Imd por la infección de bacterias gram positivas o negativas, y *Plasmodium* spp (Vizioli et al., 2001; Clayton et al., 2014; Santos et al., 2022). La expresión de gambicina en mosquitos retados fue 30 veces superior cuando está presente *hnt* a comparación de la condición cuando este gen está atenuado. Este escenario se asemeja con cecropina, en donde su expresión fue 11.63 veces mayor cuando está presente *hnt* comparado con 0.19 de expresión cuando este gen está silenciado. Hasta el momento no se ha reportado que la endorreplicación está involucrada en la respuesta inmune humoral en *A. albimanus*, respecto a los péptidos antimicrobianos. Sin embargo, los resultados obtenidos en el presente estudio apuntan que *hnt* tiene un efecto sobre estos genes de inmunidad que se liberan como una respuesta de la inmunidad humoral del mosquito. Es clave resaltar que se aplicó el reto inmunológico con bacterias gram positivas, sin embargo, se puede estimar que en el sistema del mosquito se activan las mismas vías de inmunidad que en contra de *Plasmodium* spp (Vizioli et al., 2001; Clayton et al., 2014; Santos et al., 2022), ya que no existe una vía específica que ataque al parásito.

El efecto observado en los genes de PAMs se atribuye a una consecuencia de interrupción del proceso de endociclo debido a la atenuación de *hnt*, donde este gen es un factor esencial para su encendido (Sun & Deng, 2007). Se asume un que hay un mayor número de copias para transcribir los genes de PAMs cuando *hnt* se encuentra en condiciones nativas y es estimulado con bacterias, mientras que cuando se atenua *hnt*, no se inicia el endociclo, por ende hay menor número de copias disponibles para la transcripción, por lo que la expresión relativa será mayor en el primer caso, y menor

cuando se efectua el silenciamiento de *hnt*. Sin embargo, existe la posibilidad que *hnt* tenga una función directa en los genes PAMs, debido que es un factor de transcripción. Estos factores son proteínas que tienen la capacidad de unirse específicamente en las secuencias promotores y/o potenciadores de los genes y por ende, regulan la cantidad de RNA mensajero producidos por aquellos genes (Sweeney & McClean, 2023). Una manera que se lograría conocer si *hnt* posee esta capacidad en los genes de los péptidos antimicrobianos sería mediante un análisis bioinformático del tejido de interés, en este caso intestino, para conocer si interviene en las secuencias reguladoras de los PAMs. La manera de actuar de Hnt es como un represor transcripcional, es decir reduce la función de proteínas como Stg y Cut para promover la entrada a endociclo (Sun & Den, 2007). Por lo que, cabe la posibilidad que a su vez actúe como un activador transcripcional y por ende, aumente la expresión de los genes que codifican los PAMs en los mosquitos “silvestres” cuando se enfrentan a algún patógeno.

7. Conclusiones

El gen *hnt* se expresa en el intestino de los mosquitos *A. Albimanus*. En el presente estudio se verificó que la expresión relativa de *hnt* de intestinos a las 24 horas post inyección con RNAi disminuye un 96%. La atenuación de *hnt* permitió asociar su función en el endociclo con una modulación del sistema inmune innato del mosquito, ya que los resultados indican que es requerido un nivel de expresión “silvestre” de este gen para que los genes que codifican a péptidos antimicrobianos se expresen a su nivel nativo ante un reto inmunológico. Además, estos resultados demuestran que *hnt* no solo se coexpresa durante la respuesta inmune innata del mosquito, sino que participa en la misma, por lo que se puede constituir a *hnt* como un mediador de la expresión de genes codificantes de PAMs. La función de *hnt* como regulador esencial para el encendido y apagado del endociclo permite concluir de manera indirecta que este proceso de endociclo está involucrado en la respuesta inmune innata del mosquito.

8. Perspectivas

Se planteó un modelo experimental para estudiar la funcionalidad del gen *hnt* y su asociación con el sistema inmune innato en mosquitos *A. albimanus*. Para llevar a cabo este modelo se requirió realizar una serie de experimentos para observar el patrón de expresión de *hnt* en mosquitos alimentados con una mezcla de sangre artificial con presencia y ausencia de bacterias muertas para estimular al sistema inmune innato del mosquito. En el anexo, se puede observar las condiciones de esta serie de experimentos. Esta manera de retar a los mosquitos se asemeja a la forma natural que los mosquitos están expuestos a patógenos. De ese modo, se puede conseguir información desde otra perspectiva acerca de la funcionalidad del gen *hnt* y relación con la respuesta inmune innata. Así mismo, el modelo puede ser de utilidad para explorar otros genes involucrados en el sistema inmunológico del mosquito y este fenómeno de la replicación con ausencia de mitosis que se ha observado en mosquitos retados por segunda ocasión con un mismo patógeno. Este planteamiento y estrategia metodológica aún falta por desarrollar, sin embargo, es interesante ver que los resultados preliminares de esta serie de experimentos proveen información que señala la existencia de variación en la expresión relativa del gen *hnt*, al menos en una condición (ver anexo), por el medio de adquisición de bacterias simulando el proceso natural de alimentación con sangre. La continuación de la exploración de las funciones del gen *hnt* y otros genes asociados a la inmunidad del mosquito se llevará a cabo en un diferente estudio que abarque el conocimiento desarrollado en el presente proyecto.

9. Referencias bibliográficas

- Ahringer, J. (2006). Reverse genetics. *WormBook*.
<https://doi.org/10.1895/WORMBOOK.1.47.1>
- Airs, P. M., & Bartholomay, L. C. (2017). RNA Interference for Mosquito and Mosquito-Borne Disease Control. *Insects*, 8(1). <https://doi.org/10.3390/INSECTS8010004>
- Balakrishna Pillai, A., Nagarajan, U., Mitra, A., Krishnan, U., Rajendran, S., Hoti, S. L., & Mishra, R. K. (2017a). RNA interference in mosquito: understanding immune responses, double-stranded RNA delivery systems and potential applications in vector control. *Insect Molecular Biology*, 26(2), 127–139.
<https://doi.org/10.1111/imb.12282>
- Balakrishna Pillai, A., Nagarajan, U., Mitra, A., Krishnan, U., Rajendran, S., Hoti, S. L., & Mishra, R. K. (2017b). RNA interference in mosquito: understanding immune responses, double-stranded RNA delivery systems and potential applications in vector control. *Insect Molecular Biology*, 26(2), 127–139.
<https://doi.org/10.1111/IMB.12282>
- Baonza, A., & Garcia-Bellido, A. (2000). Notch signaling directly controls cell proliferation in the *Drosophila* wing disc. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(6), 2609–2614. <https://doi.org/10.1073/PNAS.040576497>
- Beerntsen, B., James, A., & Christensen, B. (2000). Genetics of mosquito vector competence. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 64(1), 115–137. <https://doi.org/10.1128/MMBR.64.1.115-137.2000>
- Belachew, E. B. (2018). Immune Response and Evasion Mechanisms of *Plasmodium falciparum* Parasites. *Journal of Immunology Research*, 2018.
<https://doi.org/10.1155/2018/6529681>
- Beltrán-Aguilar, A., Ibáñez-Bernal, S., Mendoza-Palmero, F., Sandoval-Ruiz, C. A., & Hernández-Xoliot, R. A. (2011). Taxonomía y distribución de los anofelinos en el estado de Veracruz, México (Diptera: Culicidae, Anophelinae). *Acta Zoológica Mexicana (N.S.)*, 27(3), 601–755. <https://doi.org/10.21829/azm.2011.273778>

- Bertha, G., & Robledo, V. (2008). La respuesta inmune. *Rev Fac Med UNAM*, 51(3).
www.medigraphic.com
- Buck, E., & Finnigan, N. A. (2023). Malaria. *StatPearls*.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551711/>
- Catteruccia, F., & Leвшina, E. A. (2009). RNAi in the malaria vector, *Anopheles gambiae*. *Methods in Molecular Biology*, 555, 63–75.
https://doi.org/10.1007/978-1-60327-295-7_5/FIGURES/5_1_148839_1_EN
- Claudio-Piedras, F., Recio-Tótoro, B., Condé, R., Hernández-Tablas, J. M., Hurtado-Sil, G., & Lanz-Mendoza, H. (2020). DNA Methylation in *Anopheles albimanus* Modulates the Midgut Immune Response Against *Plasmodium berghei*. *Frontiers in Immunology*, 10, 3025. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2019.03025/FULL>
- Clayton, A. M., Dong, Y., & Dimopoulos, G. (2014a). The *Anopheles* Innate Immune System in the Defense against Malaria Infection. *Journal of Innate Immunity*, 6(2), 169. <https://doi.org/10.1159/000353602>
- Clayton, A. M., Dong, Y., & Dimopoulos, G. (2014b). The *Anopheles* Innate Immune System in the Defense against Malaria Infection. *Journal of Innate Immunity*, 6(2), 169. <https://doi.org/10.1159/000353602>
- CNIDSP, C. de I. para D. en S. P. (2023). “*Por un mundo libre de Paludismo.*”
<https://www.insp.mx/avisos/por-un-mundo-libre-de-paludismo>
- Condé, R., Hernandez-Torres, E., Claudio-Piedras, F., Recio-Tótoro, B., Maya-Maldonado, K., Cardoso-Jaime, V., & Lanz-Mendoza, H. (2021). Heat Shock Causes Lower *Plasmodium* Infection Rates in *Anopheles albimanus*. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.584660/FULL>
- Contreras-Garduño, J., Rodríguez, M. C., Hernández-Martínez, S., Martínez-Barnetche, J., Alvarado-Delgado, A., Izquierdo, J., Herrera-Ortiz, A., Moreno-García, M., Velazquez-Meza, M. E., Valverde, V., Argotte-Ramos, R., Rodríguez, M. H., & Lanz-Mendoza, H. (2015). *Plasmodium berghei* induced priming in *Anopheles albimanus* independently of bacterial co-infection. *Developmental & Comparative Immunology*, 52(2), 172–181. <https://doi.org/10.1016/J.DCI.2015.05.004>

- Cooper, G. M. (2000). *The Eukaryotic Cell Cycle*.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9876/>
- Coqueret, O., Bérubé, G., & Nepveu, A. (1998). The mammalian Cut homeodomain protein functions as a cell-cycle-dependent transcriptional repressor which downmodulates p21(WAF1/CIP1/SDI1) in S phase. *EMBO Journal*, *17*(16), 4680–4694. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.16.4680>
- Cruz Hernandez-Hernandez, F. de la. (2019). Cell Cycle Dynamics and Endoreplication In the Mosquito Midgut. *American Journal of Biomedical Science & Research*, *5*(1), 43–46. <https://doi.org/10.34297/AJBSR.2019.05.000871>
- D'Souza, B., Miyamoto, A., & Weinmaster, G. (2008). The many facets of Notch ligands. *Oncogene 2008 27:38*, *27*(38), 5148–5167. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.229>
- Das, S., Garver, L., & Dimopoulos, G. (2007). Protocol for Mosquito Rearing (*A. gambiae*). *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, *5*.
<https://doi.org/10.3791/221>
- Duronio, R. J. (2012). Developing S-phase control. *Genes & Development*, *26*(8), 746.
<https://doi.org/10.1101/GAD.191171.112>
- Edgar, B. A., & Orr-Weaver, T. L. (2001). Endoreplication Cell Cycles: More for Less. *Cell*, *105*(3), 297–306. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00334-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00334-8)
- Edgar, B. A., Zielke, N., & Gutierrez, C. (2014). Endocycles: a recurrent evolutionary innovation for post-mitotic cell growth. *Nature Reviews Molecular Cell Biology 2014 15:3*, *15*(3), 197–210. <https://doi.org/10.1038/nrm3756>
- Fang, G., Bhardwaj, N., Robilotto, R., & Gerstein, M. B. (2010). Getting Started in Gene Orthology and Functional Analysis. *PLoS Computational Biology*, *6*(3).
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PCBI.1000703>
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., & Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature 1998 391:6669*, *391*(6669), 806–811.
<https://doi.org/10.1038/35888>

- González López, L. (2021). *Aún se registran casos en México*. Boletín UNAM-DGCS-357. https://www.dgcs.unam.mx/boletin/bdboletin/2021_357.html
- Han, H. (2018). RNA Interference to Knock Down Gene Expression. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1706, 293. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7471-9_16
- Herrera-Ortiz, A., Martínez-Barnette, J., Smit, N., Rodriguez, M. H., & Lanz-Mendoza, H. (2011). The effect of nitric oxide and hydrogen peroxide in the activation of the systemic immune response of *Anopheles albimanus* infected with *Plasmodium berghei*. *Developmental & Comparative Immunology*, 35(1), 44–50. <https://doi.org/10.1016/J.DCI.2010.08.004>
- Hugo, R. L. E., & Birrell, G. W. (2018). Proteomics of *Anopheles* Vectors of Malaria. *Trends in Parasitology*, 34(11), 961–981. <https://doi.org/10.1016/J.PT.2018.08.009>
- Italiano, J. E., & Hartwig, J. H. (2013). Megakaryocyte Development and Platelet Formation. *Platelets*, 27–49. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387837-3.00002-X>
- Jia, D., Tamori, Y., Pyrowolakis, G., & Deng, W. M. (2014). Regulation of broad by the Notch pathway affects timing of follicle cell development. *Developmental Biology*, 392(1), 52. <https://doi.org/10.1016/J.YDBIO.2014.04.024>
- Karanja, J., & Kiboi, N. (2016). Current Milestones towards Development of a Fully Deployable Anti-Malaria Vaccine-Future Hope for Malaria-Free World: A Review. *Journal of Vaccines & Vaccination*, 7(4). <https://doi.org/10.4172/2157-7560.1000332>
- Kato, N., Mueller, C. R., Fuchs, J. F., Wessely, V., Lan, Q., & Christensen, B. M. (2006). Regulatory mechanisms of chitin biosynthesis and roles of chitin in peritrophic matrix formation in the midgut of adult *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 36(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2005.09.003>
- Kim, M., Du, O. Y., Whitney, R. J., Wilk, R., Hu, J., Krause, H. M., Kavalier, J., & Reed, B. H. (2020). A Functional Analysis of the *Drosophila* Gene *hindsight*: Evidence for

- Positive Regulation of EGFR Signaling. *G3: Genes/Genomes/Genetics*, 10(1), 117.
<https://doi.org/10.1534/G3.119.400829>
- Kitagawa, M., & Lee, S. H. (2015). The chromosomal passenger complex (CPC) as a key orchestrator of orderly mitotic exit and cytokinesis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 0, 14. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2015.00014>
- Klug, A. (2010). The discovery of zinc fingers and their development for practical applications in gene regulation and genome manipulation. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 43(1), 1–21. <https://doi.org/10.1017/S0033583510000089>
- Kulkarni, M. M., Booker, M., Silver, S. J., Friedman, A., Hong, P., Perrimon, N., & Mathey-Prevot, B. (2006). Evidence of off-target effects associated with long dsRNAs in *Drosophila melanogaster* cell-based assays. *Nat Methods*, 3(10), 833–838. <https://doi.org/10.1038/nmeth935>
- Kumar, Anil, & Chordia, N. (2015). In silico PCR primer designing and validation. *Methods in Molecular Biology*, 1275, 143–151. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2365-6_10/TABLES/1
- Kumar, Ankit, Srivastava, P., Sirisena, P. D. N. N., Dubey, S. K., Kumar, R., Shrinet, J., & Sunil, S. (2018a). Mosquito Innate Immunity. *Insects*, 9(3), 1000097. <https://doi.org/10.3390/INSECTS9030095>
- Kumar, Ankit, Srivastava, P., Sirisena, P. D. N. N., Dubey, S. K., Kumar, R., Shrinet, J., & Sunil, S. (2018b). Mosquito Innate Immunity. *Insects*, 9(3). <https://doi.org/10.3390/INSECTS9030095>
- Lagunas-Cruz, M. del C., Valle-Mendiola, A., & Soto-Cruz, I. (2014). Ciclo celular: Mecanismos de regulación. *Laboratorio de Oncología Molecular. Unidad de Investigación*, 2(Emplear técnicas cada vez más adecuadas para esta determinación es una necesidad clara, donde se espera obtener resultados de una manera rápida, eficiente, cuantitativa, objetiva y a bajos costos.), 98–107.
- Lamacchia, M., Clayton, J. R., Wang-Sattler, R., Steinmetz, L. M., Levashina, E. A., & Blandin, S. A. (2012). Silencing of Genes and Alleles by RNAi in *Anopheles gambiae*. *Methods in Molecular Biology*, 923, 161–176.

https://doi.org/10.1007/978-1-62703-026-7_11

- Lane, M. E., Sauer, K., Wallace, K., Jan, Y. N., Lehner, C. F., & Vaessin, H. (1996). Dacapo, a cyclin-dependent kinase inhibitor, stops cell proliferation during *Drosophila* development. *Cell*, *87*(7), 1225–1235. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81818-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81818-8)
- Lee, W. S., Webster, J. A., Madzokere, E. T., Stephenson, E. B., & Herrero, L. J. (2019). Mosquito antiviral defense mechanisms: A delicate balance between innate immunity and persistent viral infection. *Parasites and Vectors*, *12*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3433-8>
- Liew, J. W. K., Fong, M. Y., & Lau, Y. L. (2017). Quantitative real-time PCR analysis of *Anopheles dirus* TEP1 and NOS during *Plasmodium berghei* infection, using three reference genes. *PeerJ*, *2017*(7). <https://doi.org/10.7717/PEERJ.3577/SUPP-4>
- Martins, G. F., Serrão, J. E. S., Ramalho-Ortigão, J. M., & Pimenta, P. F. P. (2011). A comparative study of fat body morphology in five mosquito species. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, *106*(6), 742–747. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762011000600015>
- Melero, R. (2016). *Anopheles - Fundación iO*. <https://fundacionio.com/salud-io/one-health/entomologia-para-todos/anopheles/>
- Ming, L., Wilk, R., Reed, B. H., & Lipshitz, H. D. (2013). *Drosophila* Hindsight and mammalian RREB-1 are evolutionarily conserved DNA-binding transcriptional attenuators. *Differentiation*, *86*(4–5), 159–170. <https://doi.org/10.1016/J.DIFF.2013.12.001>
- Mukherjee, D., Das, S., Begum, F., Mal, S., & Ray, U. (2019). The Mosquito Immune System and the Life of Dengue Virus: What We Know and Do Not Know. *Pathogens*, *8*(2). <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS8020077>
- Na, W., Wang, Y., Gong, P., Zhang, X., Zhang, K., Zhang, H., Wang, N., & Li, H. (2021). Screening of Reference Genes for RT-qPCR in Chicken Adipose Tissue and Adipocytes. *Frontiers in Physiology*, *12*. <https://doi.org/10.3389/FPHYS.2021.676864/FULL>

- OPS. (2020). *Paludismo - OPS/OMS*. Organización Panamericana de La Salud.
<https://www.paho.org/es/temas/paludismo>
- Pham, L. N., Dionne, M. S., Shirasu-Hiza, M., & Schneider, D. S. (2007). A Specific Primed Immune Response in *Drosophila* Is Dependent on Phagocytes. *PLoS Pathogens*, 3(3). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.0030026>
- Qian, W., Li, Z., Song, W., Zhao, T., Wang, W., Peng, J., Wei, L., Xia, Q., & Cheng, D. (2020). A novel transcriptional cascade is involved in Fzr-mediated endoreplication. *Nucleic Acids Research*, 48(8), 4214–4229.
<https://doi.org/10.1093/NAR/GKAA158>
- Ren, D., Song, J., Ni, M., Kang, L., & Guo, W. (2020). Regulatory Mechanisms of Cell Polyploidy in Insects. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 361.
<https://doi.org/10.3389/FCELL.2020.00361/BIBTEX>
- Rodrigues, J., Brayner, F. A., Alves, L. C., Dixit, R., & Barillas-Mury, C. (2010). Hemocyte Differentiation Mediates Innate Immune Memory in *Anopheles gambiae* Mosquitoes. *Science (New York, N.Y.)*, 329(5997), 1353.
<https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1190689>
- Santos, E. de A., dos Santos, A. C. F., da Silva, F. S., Queiroz, A. L. N., Pires, L. L. da C., Casseb, S. M. M., Holanda, G. M., Sucupira, I. M. C., Cruz, A. C. R., Santos, E. J. M. dos, & Póvoa, M. M. (2022). Phylogeny of *Anopheles darlingi* (Diptera:Culicidae) based on the antimicrobial peptide genes cecropin and defensin. *Acta Tropica*, 227, 106285. <https://doi.org/10.1016/J.ACTATROPICA.2021.106285>
- Shaw, W. R., & Catteruccia, F. (2019). Vector biology meets disease control: using basic research to fight vector-borne diseases. *Nature Microbiology*, 4(1), 20–34.
<https://doi.org/10.1038/S41564-018-0214-7>
- Spencer, L. M., Gómez, A., & Collovini, E. (2016). Mechanisms of invasion from sporozoite and merozoite of *Plasmodium*. *Bionatura*, 1(2), 89–94.
<https://doi.org/10.21931/RB/2016.01.02.9>
- Subdirección de Vigilancia y Control en Salud Pública. (2011). *GUÍA PROTOCOLO PARA LA VIGILANCIA EN SALUD PÚBLICA DE MALARIA*. <https://doi.org/PRO->

R02.003.0000-021

Sun, J., & Deng, W. M. (2007). Hindsight Mediates the Role of Notch in Suppressing Hedgehog Signaling and Cell Proliferation. *Developmental Cell*, 12(3), 431–442.

<https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2007.02.003>

ThermoFisher. (2021). *BrdU (5-Bromo-2'-Deoxyuridine)*.

https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/B23151?ef_id=CjwKCAiAp8iMBhAqEiwAJb94z9A2qR9Q65HP1uVCTOJMxs8YjC6fKAMMV1T0WPPFVW7d_O5VIsi0yBoCNx0QAvD_BwE:G:s&s_kwid=AL!3652!3!447292198766!!g!!&cid=bid_pca_iva_r01_co_cp1359_pjt0000_bid00000_0se_gaw_dy_

Urata, Y., Parmelee, S. J., Agard, D. A., Sedat, J. W., & Sedat, J. W. (1995). A Three-Dimensional Structural Dissection of *Drosophila* Polytene Chromosomes.

Vizioli, J., Bulet, P., Hoffmann, J. A., Kafatos, F. C., Müller, H. M., & Dimopoulos, G.

(2001). Gambicin: A novel immune responsive antimicrobial peptide from the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(22), 12630–12635.

<https://doi.org/10.1073/PNAS.221466798/ASSET/266D89D0-BC72-4B25-965D-AA0471F05793/ASSETS/GRAPHIC/PQ2214667006.JPEG>

WHO. (2020). *Malaria*. World Health Organization. https://www.who.int/health-topics/malaria#tab=tab_1

Williams, J., & Pinto, J. (2012). Training Manual on Malaria Entomology For Entomology and Vector Control Technicians. *Integrated Vector Management of Malaria and Other Infectious Diseases Task Order 2, March 2012*, 1–85.

Xu, W., Jiang, X., & Huang, L. (2019a). RNA Interference Technology. *Comprehensive Biotechnology*, 560. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64046-8.00282-2>

Xu, W., Jiang, X., & Huang, L. (2019b). RNA Interference Technology. *Comprehensive Biotechnology*, 560. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64046-8.00282-2>

Yoon, H., & Leitner, T. (2015). PrimerDesign-M: a multiple-alignment based multiple-primer design tool for walking across variable genomes. *Bioinformatics*, 31(9),

1472. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTU832>

10. Anexos

(En este apartado se presenta el modelo experimental que se estudia al gen *hnt* y su relación con la respuesta inmune innata, retando a mosquitos mediante alimentación con sangre artificial con y sin bacterias. También, se observan las expresiones relativas de los genes involucrados en este estudio. Finalmente, el cálculo de cómo se procesaron resultados obtenidos de las qRT-PCR por medio del método delta delta Ct).

Modelo experimental para la expresión de *hnt* en diferentes condiciones

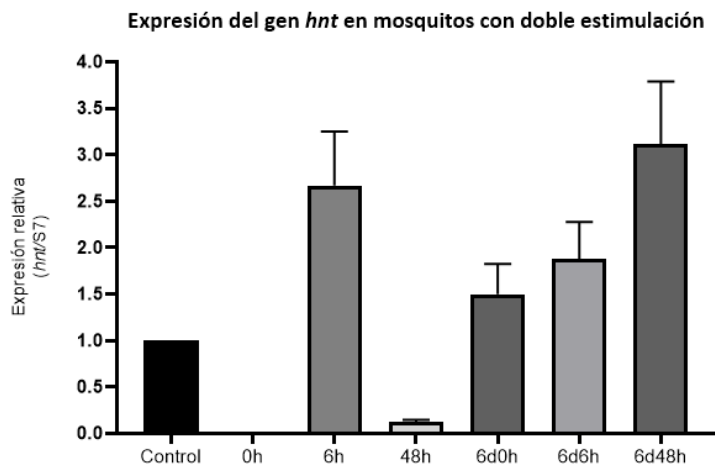
Dentro del contexto de analizar el efecto que tiene el endociclo celular sobre la respuesta innata del mosquito. Se requirió realizar una serie de experimentos para observar el patrón de expresión de *hnt* en mosquitos alimentados con una mezcla de sangre artificial con presencia y ausencia de bacterias muertas para estimular al sistema inmune innato del mosquito; de esa manera obtener la expresión basal del gen *hnt*. Se pueden observar las condiciones de esta serie de experimentos en el anexo 1.

Para la preparación de sangre artificial se utilizaron: BSA (Bovine Serum Albumin Fraction V 300mg/ml), ATP (200 mM), NaHCO₃ (0.4 M) y agua grado biología molecular. La concentración de bacterias (*M. luteus*) fue de 1×10^9 ufc por mililitro de sangre.

Estos experimentos consistieron en cuatro diferentes condiciones donde se alimentaron a los mosquitos en dos ocasiones separadas por 6 días de diferencia. En la primera alimentación se recolectaron a 10 mosquitos para las 0, 6, y 48 horas; con la finalidad de obtener sus intestinos. De la misma manera después de 6 días se alimentaron y se diseccionaron a los mosquitos en tiempos similares. De las muestras obtenidas se extrajo RNA para su posterior síntesis de cDNA y análisis por PCR en tiempo real (anexo 2).

Anexo 1. Avance de experimentos para observar el patrón de la expresión de *hnt* en mosquitos alimentados con sangre artificial con y sin bacterias. Las casillas marcadas en verde son los avances que se han obtenido, y las casillas marcadas con una “X” indican resultados que faltan obtener.

Experimentos	1ra Alimentación	Obtención de intestinos después de la 1ra alimentación (0, 6, 48 horas)	2da Alimentación después de 6 días	Obtención de intestinos después de la 2da alimentación (0, 6, 48 horas)	Extracción de RNA	Síntesis de cDNA	Análisis de la expresión mediante qPCR
1	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✗
2	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✗
3	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✗
4	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓



- Gambicina

GAMBICINA: dsRNA GFP con reto y sin reto inmunológico												
GFP con reto		Oligo	Ct	Ct mean	Sq std.Dev	GFP sin reto		Oligo	Ct	Ct mean	Sq std.Dev	
	dsGFP	Gam	18,37	18.41	0.05		dsGFP	Gam	26,23	26.01	0.31	
	dsGFP	Gam	18,44				dsGFP	Gam	25,79			
	AGUA	Gam					AGUA	Gam				
	dsGFP	S7	17,05	17.08	0.05		dsGFP	S7		19.39	19.58	0.27
	dsGFP	S7	17,12				dsGFP	S7		19.77		
	AGUA	S7	NA			AGUA	S7	NA				
silenciado			Ct	D. St				Ct	D. St			
	S7		17.08	0.05		S7		19.58	0.27			
	dsHNT		18.41	0.05		dsHNT		26.01	0.31			
			delta Ct	D. St				delta Ct	D. St			
	dsHNT		1.33	0.07		dsHNT		6.43	0.411			
			delta delta	D. St	ddCT + D. S	ddCT - D. St		delta delta	D. St	ddCT + D. S	ddCT - D. St	
		-5.1	0.07	-5.03	-5.17		0	0.411	0.411	-0.411		
GFP 24h con reto	Relativa	34										
más D. St	Relativa	32.7										
menor D. S	Relativa	36.0										
GFP 24h sin reto	Relativa	1										
ddCT + D. S	Relativa	0.75										
ddCT - D. S	Relativa	1.33										

GAMBICINA Silenciados: dsRNA hnt con reto y sin reto inmunológico											
silenciado con reto		Oligo	Ct	Ct mean	Sq std.Dev	Silenciado sin reto		Oligo	Ct	Ct mean	Sq std.Dev
	dsHNT	Gam	26,74	26.73	0.01		dsHNT	Gam	20,44	20.35	0.13
	dsHNT	Gam	26,73				dsHNT	Gam	20,26		
	AGUA	Gam					AGUA	Gam	N/A	0	0
	dsHNT	S7	21.96	21.78	0.25		dsHNT	S7	19.34	19.56	0.31
	dsHNT	S7	21.61				dsHNT	S7		19.78	
	AGUA	S7	NA			AGUA	S7	35.13	35.13		
silenciado			Ct	D. St				Ct	D. St		
	S7		21.78	0.25		S7		19.56	0.31		
	dsHNT		26.73	0.01		dsHNT		20.35	0.13		
			delta Ct	D. St				delta Ct	D. St		
	dsHNT		4.95	0.25		dsHNT		0.79	0.34		
			delta delta	D. St	ddCT + D. S	ddCT - D. St		delta delta	D. St	ddCT + D. S	ddCT - D. St
		4.16	0.25	4.41	3.91		0	0.34	0.33	-0.33	
Silenciado 24h con reto	Relativa	0.06									
más D. St	Relativa	0.05									
menor D. S	Relativa	0.07									
Silenciado 24h sin reto	Relativa	1.00									
ddCT +	Relativa	0.80									
ddCT - D. S	Relativa	1.26									

- Cecropina

CECROPINA: NO SILENCIADOS (INYECTADOS CON 500ng dsRNA GFP) con y sin reto M luteus													
Cecropina													
GFP con reto		Oligo	Ct	Ct mean	Sq std.Dev	GFP sin reto		Oligo	Ct	Ct mean	Sq std.Dev		
	dsGFP	Cec		21.02	21		0.03	dsGFP	Cec		27.25	27.24	0.01
dsGFP	Cec		20.98			dsGFP	Cec		27.23				
AGUA	Cec					AGUA	Cec						
dsGFP	S7		17.05	17.08	0.05	dsGFP	S7		19.39	19.58	0.27		
dsGFP	S7		17.12			dsGFP	S7		19.77				
AGUA	S7		NA			AGUA	S7		NA				
			Ct	D. St					Ct	D. St			
			S7	17.08	0.05				S7	19.58	0.27		
			cec	21	0.03				cec	27.04	0.01		
			delta Ct	D. St					delta Ct	D. St			
				3.92	0.06					7.46	0.411		
			delta delta	D. St	ddCT + D. St	ddCT - D. St			delta delta	D. St	ddCT + D. St	ddCT - D. St	
				-3.54	0.224	-3	-3.764			0	0.411	0.411	-0.411
GFP 24h con reto	Relativa		11.63										
más D. St	Relativa		9.96										
menor D. St	Relativa		13.59										
GFP 24h sin reto	Relativa		1										
ddCT + D. St	Relativa		0.75										
ddCT - D. St	Relativa		1.33										

CECROPINA: SILENCIADOS (INYECTADOS CON 500ng dsRNA hnt) con y sin reto M luteus													
Cecropina													
Silenciado con reto		Oligo	Ct	Ct mean	Sq std.Dev	Silenciado sin reto		Oligo	Ct	Ct mean	Sq std.Dev		
	dsGFP	Cec		23.91	24.03		0.17	dsGFP	Cec		24.07	24.15	0.11
dsGFP	Cec		24.15			dsGFP	Cec		24.23				
AGUA	Cec					AGUA	Cec						
dsGFP	S7		17.05	17.08	0.05	dsGFP	S7		19.39	19.58	0.27		
dsGFP	S7		17.12			dsGFP	S7		19.77				
AGUA	S7		NA			AGUA	S7		NA				
			Ct	D. St					Ct	D. St			
			S7	17.08	0.05				S7	19.58	0.27		
			cec	24.03	0.17				cec	24.15	0.31		
			delta Ct	D. St					delta Ct	D. St			
				6.95	0.18					4.57	0.411		
			delta delta	D. St	ddCT + D. St	ddCT - D. St			delta delta	D. St	ddCT + D. St	ddCT - D. St	
				2.38	0.18	2.2	2.56			0	0.411	0.411	-0.411
Silenciado 24h con reto	Relativa		0.19										
más D. St	Relativa		0.22										
menor D. St	Relativa		0.17										
Silenciado 24h sin reto	Relativa		1										
ddCT + D. St	Relativa		0.75										
ddCT - D. St	Relativa		1.33										