

00377



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

IDENTIFICACIÓN DE ANTAGONISTAS  
(ANTI TROMBINA) DE LA HEMOSTASIA  
EN GLÁNDULAS SALIVALES DE *Aedes aegypti*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

P R E S E N T A

JORGE ARMANDO CIME CASTILLO

DIRECTORA DE TESIS, Dra. BLANCA HAYDE RUIZ ORDAZ

MÉXICO, D.F.

NOVIEMBRE, 2005



m. 352182



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.

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 7 de noviembre del 2005, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del alumno(a) **CIME CASTILLO JORGE ARMANDO**, con número de cuenta 94167779 con la tesis titulada: "Identificación de antagonistas (antitrombina) de la hemostasia en glándulas salivales de *Aedes aegypti*", bajo la dirección del(a) Dra. Blanca Haydé Ruiz Ordaz .

Presidente:	Dr. Cuauhtémoc Juan Humberto Lanz Mendoza
Vocal:	Dr. Raúl Abdón Izaguirre Ávila
Secretario:	Dra. Blanca Haydé Ruiz Ordaz
Suplente:	Dr. Horacio Reyes Vivas
Suplente:	Dr. Fidel de la Cruz Hernández Hernández

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Ciudad Universitaria D.F., a 24 de noviembre del 2005



Dr. Juan Núñez Farfán  
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

Este trabajo fue realizado con el apoyo de una beca de maestría del CONACYT con número de becario 18249 y con el apoyo de una beca complementaria de la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP UNAM).

El comité tutorial estuvo integrado por:

Dra Blanca Haydé Ruiz Ordaz

Dr Raúl Abdón Izaguirre Ávila

Dr. Fidel de la Cruz Hernández Hernández

## **Agradecimientos**

A la Dra. Veronica Monrroy, por su ayuda técnica.

Al Biólogo Carlos Cabello por la ayuda en la realización de geles unidimensionales.

AL Dr. Ciro Montero, por la asesoría en la disección de los mosquitos.

A la QFB Evelin Cortinna Ruiz, por la asesoría en la realización de las pruebas de hemostasia

Al departamento de toma muestras sanguíneas del hospital de cardiología Ignacio Chávez

Al Dr. Humberto Lanz por su colaboración con las pruebas de espectroscopia así como al laboratorio de proteómica del CISEI INSP

Al Dr. Horacio Reyes por su ayuda con las pruebas de cromatografía líquida y por la revisión del manuscrito de esta tesis.

Al comité tutorial por los valiosos comentarios que enriquecieron este trabajo.

A mi esposa por su amor, comprensión, apoyo, amistad y  
por los días más felices de mi vida

## CONTENIDO

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCION	5
Estructura de las glándulas salivales	12
HIPÓTESIS y OBJETIVOS	15
METODOLOGIA	16
RESULTADOS	
Agregación plaquetaria	26
Velocidad de polimerización de fibrina	32
Ensayo cromogénico	34
TP,TTPA y TT	37
Separación de proteínas mediante electroforesis en del de acrilamida Gel SDS-PAGE	40
Purificación de posibles antagonistas de la trombina	41
Ensayo de espectroscopia de masas	45
DISCUSION	53
CONCLUSIONES	65
REFERENCIAS	67
APENDICES	74

## RESUMEN

*Aedes aegypti* es el principal vector del virus del dengue, lo que hace de él un objeto de estudio relevante. Durante su búsqueda por sangre, los mosquitos salivan dentro de la piel de sus hospederos mientras estos últimos reaccionan induciendo una respuesta para controlar la pérdida de sangre o el daño al tejido por medio de la coagulación sanguínea, la agregación plaquetaria y la vasoconstricción. La coagulación sanguínea involucra múltiples enzimas, cofactores y superficies celulares para la formación del coágulo insoluble, una de estas enzimas de la coagulación, considerada la más importante, es la trombina. La saliva de los mosquitos durante años se considero inactiva, utilizada únicamente para lubricar las partes bucales del insecto. Este concepto ha cambiado con la demostración de que la saliva de los artrópodos hematófagos, incluyendo los mosquitos, esta compuesta de potentes productos farmacológicamente activos que alteran el sistema hemostático, inmune e inflamatorio del huésped. Se ha observado que algunos mosquitos hematófagos presentan sustancias biológicamente activas que inhiben a la trombina. En este trabajo se identificó un antagonista (anti-trombina) de la hemostasia presente en las glándulas salivales del mosquito *Aedes aegypti*, esta molécula pertenece a una familia de proteínas (D7) presentes en gran abundancia en las glándulas salivales de los mosquitos, pero hasta la fecha se desconocía su función exacta. Las glándulas salivales de las hembras del mosquito *Aedes aegypti* fueron disectadas, con las cuales se hizo un homogenado proteínico (HGS) y se utilizó en procedimientos en donde interviene la trombina; un ensayo de agregación plaquetaria, tiempos de trombina, sobre su función con el fibrinógeno, en su actividad amidolítica sobre un sustrato cromogénico específico de trombina, así como en su actividad anticoagulante. El HGS se fragmento por medio de cromatografía de alta resolución (HPLC). Se observó que a 3.2 equivalentes de pares de glándulas salivales (PGS) del mosquito *Aedes aegypti* se presenta una inhibición de la agregación plaquetaria, con 9.72

(PGS) hay un retraso en la formación de la malla de fibrina y con 32.4 (PGS) en el tiempo de coagulación (como se vio por medio del Tiempo de Trombina), de igual forma el HGS interactuó con su sustrato cromogénico. Los péptidos de la fracción con actividad anti-trombina se obtuvieron por espectroscopia de masas (MALDI-ToF) y se correlacionaron con una proteína D7. En este estudio se describe por primera vez la función de una proteína perteneciente a esta familia. Considerando que esta proteína es de las más abundantes en las glándulas salivales de *Aedes aegypti*, se pudiera considerar su utilización como fármaco en contra de problemas tromboticos.

Esta proteína se suma a las proteínas con función conocida de *Aedes aegypti* contribuyendo con el proteoma de las glándulas salivales.

## ABSTRACT

*Aedes aegypti* is the main vector of the dengue virus, because of that, they are an excellent object of study. During their search for blood, the mosquitoes salivate within the skin of their host while these last react inducing an answer to control lost of blood or the damage to the weave by means of the blood clotting, the platelet aggregation and vasoconstriction. The coagulation involves multiple enzymes, cofactors and cellular surfaces by the formation of an insoluble clot, one of these enzymes of the coagulation, considered the most important, it is the thrombin.

The mosquitoes' saliva during years was considered itself inactive, used only to lubricate the mouthparts of the insect. This concept has changed with the demonstration of which the saliva of the hematophagous arthropods, including the mosquitoes, is composed of powerful pharmacological active products that alter the hemostatic, immune and inflammatory system of host. It has been observed that some hematophagous mosquitoes display biological active substances that inhibit the thrombin.

In this work an antagonist (anti-thrombin) of hemostasis present in the salivary glands of the *Aedes aegypti* mosquito was identified, this molecule belongs to a protein family (D7) present in great abundance in the salivary glands of the mosquitoes, but until now its exact function was not known. The salivary glands of the females of *Aedes aegypti* were dissected, with them a protein homogenate (HGS) was made and it was used in procedures in where the thrombin takes part, like a test of platelet aggregation, times of thrombin, on its function with the fibrinogen, and its amidolytic activity on a chromogenic substrate specific for thrombin, as well as in its anticoagulation activity. The HGS was fragmented using a high performance chromatography (HPLC). It was

observed that 3,2 pairs of salivary glands (PGS) of *Aedes aegypti* mosquito induce an inhibition of the platelet aggregation; with 9,72 (PGS) there is a delay in the formation of the mesh of fibrin and with 32,4 (PGS) in the time of coagulation (as it were seen by the Time of Thrombin), similarly the HGS interacted with their chromogenic substrate. The peptides of the fraction with anti-thrombin activity were obtained by masses spectroscopy (MALDI-ToF) and they were correlated with a D7 protein. In this study the function of a protein belongs this family is described for the first time. Considering that this protein is the most abundant in the salivary glands of *Aedes aegypti*, its use like drug against thrombotics problems could be considered. This protein adds to proteins with well-known function of *Aedes aegypti* contributing with proteome of the salivary glands.

## INTRODUCCIÓN

*Aedes aegypti* (Linneo, 1762) es el principal vector tanto del virus del dengue como de la fiebre amarilla, lo que hace de él un objeto de estudio relevante. Sus facultades de adaptación al ambiente humano le han permitido colonizar prácticamente todos los países tropicales. *Aedes aegypti* se esparció de África al hemisferio oeste en el siglo XVII, a la base del Mediterráneo en el siglo XVIII, en el siglo XIX invadió Asia tropical y a las Islas del Pacífico a finales de este siglo y principios del XX. La especie fue erradicada en el continente americano en los años 1950s y 1960s durante una campaña de la organización panamericana de la salud (OPS) para eliminar la fiebre amarilla. Sin embargo, en los siguientes 20 años se reinfestaron la mayoría de los países en donde se había controlado (Gubler, 1998). Actualmente *Aedes aegypti* es considerada una especie cosmopolita, presente en las regiones del globo terrestre entre las isoterms de 20°C y más recientemente con distribución circuntropical y subtropical, con expansión a regiones más frías en las épocas más calurosas del año. En términos generales, se le ha encontrado en áreas geográficas con una temperatura media anual mayor a los 16.9°C (Ibáñez y Gómez 1995).

Es sabido que las hembras adultas de estos mosquitos necesitan sangre para depositar sus huevecillos. Una dieta de sangre humana le confiere al mosquito un beneficio en la síntesis de reservas de energía y en ciertas aptitudes, como el incremento en la longevidad de la hembra y la producción del número de crías (Harrington *et al*, 2001). Durante su búsqueda por sangre, los mosquitos salivan dentro de la piel de sus hospederos, mientras estos últimos reaccionan induciendo una respuesta para controlar la pérdida de sangre o el daño al tejido, la saliva inyectada neutraliza algunas de estas defensas y permite la alimentación exitosa del vector (Ribeiro, 2000).

La saliva de los mosquitos durante años se consideró inactiva, utilizada únicamente para lubricar las partes bucales del insecto. Este concepto ha cambiado con la demostración de que la saliva de los artrópodos hematófagos, incluyendo los mosquitos, está compuesta de potentes productos farmacológicamente activos que alteran el sistema hemostático, inmune e inflamatorio del huésped (Valenzuela, 2002). Después de penetrar la piel, los mosquitos introducen sus estiletes hacia atrás y adelante antes de localizar un vaso sanguíneo y empezar a alimentarse (Ribeiro *et al*, 1984). Al causar un daño en la piel y lacerar la dermis, se induce una respuesta primaria a la pérdida de sangre y al daño producido por el piquete del mosquito ocasionando la activación del sistema hemostático, cuya función primaria es contrarrestar la pérdida de sangre.

La vasoconstricción, la agregación plaquetaria y la coagulación sanguínea constituyen las bases de los procesos hemostáticos de defensa del hospedero; este sistema se considera altamente redundante. La vasoconstricción reduce el flujo sanguíneo en el sitio del daño y consecuentemente reduce la oportunidad para que los mosquitos obtengan sangre, el fenómeno de la vasoconstricción ha sido solucionado con una variedad de estrategias. *Aedes aegypti* inyecta pequeños péptidos llamados sialokininas dentro de sus hospederos, estas moléculas actúan directamente en el endotelio, produciendo óxido nítrico el cual actúa en células del músculo liso causando vaso relajación (Ribeiro, 1992; Champagne *et al*, 1994; Beerntsen, 1999).

Por otra parte, la agregación plaquetaria está involucrada en la primera línea de defensa en contra de la pérdida de sangre. Cuando las plaquetas se activan cambian la composición de sus membranas (presentando grupos cargados negativamente) y liberan un potente vasoconstrictor que disminuye el flujo sanguíneo (tromboxano A<sub>2</sub>), así como agonistas adicionales de la agregación plaquetaria (ADP, colágeno y trombina). Las concentraciones de ADP al exterior de las células son más bajas en varios órdenes de magnitud que en el

citoplasma; después del daño al tejido se liberan grandes cantidades de ADP causando la activación de las plaquetas (Michelson, 2003; Lawrence, 2003).

La saliva de *Aedes aegypti* y otros artrópodos contienen una enzima llamada apyrasa, la cual hidroliza ADP a AMP y ortofosfatos, por lo que inhiben la agregación plaquetaria dependiente de ADP. La apyrasa de *Aedes aegypti* pertenece a la familia de nucleotidasas 5' y es dependiente de calcio o magnesio y tiene un peso molecular aproximado de 68 KDa. (Ribeiro *et al* 1984), la expresión del gen que codifica para esta enzima (*Apy*) se encuentra limitado a las células de los lóbulos medios y a la región distal del lóbulo lateral y únicamente está presente en las glándulas salivales de las hembras adultas (Smartt *et al*, 1995). Finalmente, las plaquetas también están involucradas en la formación de complejos proteínicos útiles para la cascada de coagulación sanguínea.

Durante la coagulación sanguínea se requiere que los componentes de las diferentes reacciones se lleven a cabo de una manera localizada, amplificada y modulada. La cascada de coagulación es un proceso que involucra múltiples enzimas, cofactores y superficies celulares para la formación del coágulo insoluble, una de estas enzimas, considerada la más importante de la coagulación, es la trombina. (Mann 2003; Mann *et al* 2003). Esta molécula puede ser generada por dos vías de la coagulación denominadas extrínseca e intrínseca; la vía extrínseca se genera al existir un daño al endotelio vascular exponiéndose una proteína de membrana denominada factor tisular (FT), esta proteína sirve como cofactor del factor VII (FVII) que a su vez activa al FV el cual formará la trombina a partir de la activación del FX a factor X activado (Fxa), y la formación del complejo "protrombinasa", el cual puede ser formado sobre una célula o en la superficie de la membrana de fosfolípidos; la activación del cofactor V a Fva se lleva a cabo en un inicio por el Fxa (Monroe *et al*, 1996), ensamblándose en la superficie membranal. Tanto el Fva como el Fxa pueden unirse y activar a la protrombina en la membrana celular para formar trombina. Sin embargo, sólo una pequeña cantidad de trombina es generada



Proteína C (PC) cuya función en este complejo proteico (trombina-TM-PC) inhibe la activación del FV y FVIII.

Una vez formada la trombina participa en la fibrino-formación provocando una proteólisis de fibrinógeno para formar monómeros de fibrina liberando los fibrinopéptidos A y B (FPA y FPB). Entre otras funciones de la trombina también se encuentra la activación de las plaquetas por la interacción de esta molécula con receptores específicos presentes en la superficie de las plaquetas conocidos como PARs (receptores activados por proteasas); la trombina corta un ligando específico de este receptor, favoreciendo la interacción de esta porción cortada con el propio receptor el cual está acoplado a proteínas G, estas proteínas inducen una cascada de señalización que concluye con la activación de las plaquetas (Martínez *et al*, 2001).

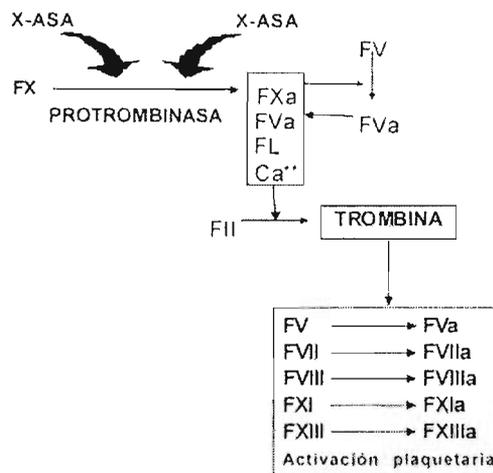


Fig. 2 Una vez activada, la trombina activa a los cofactores V y VIII al factor VII, XI, XII, así como a las plaquetas (tomado de Hemofilia, 2001).

Como se mencionó anteriormente, la trombina juega un papel central en la coagulación sanguínea. Sin embargo, su función primaria es cortar el fibrinógeno generando fibrina, favoreciendo la formación del coágulo. Las diversas funciones biológicas de la trombina se llevan a cabo en el complejo terciario, comprendido por diferentes dominios especializados en

interacciones específicas de esta proteína. La estructura del cristal de la trombina humana revela que las regiones prominentes, características de esta molécula son una triada catalítica; una hendidura (el sitio activo) y dos superficies extendidas que están principalmente compuestas de residuos cargados positivamente conocidos como exosítio 1 (TABEL) y exosítio 2 (TABE2) (Bode *et al*, 1992). El exosítio 1 es requerido por la trombina para unirse al fibrinógeno, al cofactor II de heparina, a la trombomodulina y a la hirudina. Esta última es un inhibidor natural proveniente de la sanguijuela *Hirudus medicinalis*, la cual al unírsele actúa bloqueando las funciones de la trombina (Francischetti *et al*, 1999). El exosítio 2 está localizado cerca del carboxiterminal de la cadena hélice  $\beta$ , está involucrado en la inhibición modulada de la heparina, las serpinas antitrombinas y la proteinasa nexin I. (Di Cera, 2003). Con base en la importancia biológica de la trombina tanto en la cascada de coagulación así como en los eventos trombóticos, se sugiere que la regulación de estas actividades por inhibidores desempeñe un papel importante.

Presiones evolutivas han seleccionado un número de moléculas biológicamente activas presentes en organismos hematófagos que inhiben a la trombina. Actualmente, los inhibidores de la trombina han sido aislados de invertebrados tales como sanguijuelas y de vertebrados como en el veneno de serpiente, entre otros (Arocas *et al*, 1996). Mientras que algunos de estos inhibidores bloquean el sitio catalítico de la trombina, otros son exclusivamente ligandos del exosítio anión de unión de la trombina. Así mismo, otros son inhibidores duales de unión a ambos dominios (Stone y Tapparelli 1995 en Francischetti *et al*, 1999).

Interesantemente los mosquitos anophelinos tienen una anti-trombina salival. Los mecanismos de inhibición de la trombina por esta antitrombina denominada anophelina (un péptido de 6.5 KDa aislado de *Anopheles albimanus*), indican que es un inhibidor de tipo competitivo el cual se une a ambos sitios catalíticos y al TABEL de la trombina (Francischetti *et al*, 1999). En el mosquito *Aedes aegypti* hasta el momento no se ha identificado una proteína

que presente esta actividad, sin embargo tiene un inhibidor directo del FXa, que es una proteína de 47.8 KDa similar a la superfamilia de las serpinas, la cual comprende inhibidores de proteasas (Stark y James, 1998).

Valenzuela y col. en el 2002 realizaron una descripción del conjunto de mRNA y proteínas expresadas en las glándulas salivales de *Aedes aegypti* contribuyendo al proteoma de este mosquito. Reportaron la secuencia de 456 clonas, basados en productos de amplificación (PCR) de las glándulas salivales, en donde se describen 227 nuevas secuencias parciales, incluyendo la secuencia de 31 proteínas. No se ha asignado función biológica a la mayoría de estas secuencias, indicando que estas proteínas salivales pueden representar nuevas moléculas que actúan en la digestión de azúcares, actividad antibacterial o en la hemostasia. De estas 250 secuencias parciales, 118 están asociadas con probables funciones “housekeeping”, 38 probablemente están asociadas con un producto secretado y 82 se refieren a productos de función desconocida. Entre las 38 secuencias probablemente asociadas a proteínas secretadas se reveló la presencia de 4 grupos de cDNA relacionados a proteínas de la familia antígeno-5 (no descritos previamente en *Aedes aegypti*) 4 grupos relacionados a las proteínas D7 (3 de las cuales son nuevos miembros) 2 grupos asociados con el anticoagulante salival dirigido en contra del factor Xa (uno de los cuales es un nuevo miembro), 2 grupos relacionados al alérgeno salival de 30 KDa (de los cuales uno es nuevo) 2 grupos con la marca de lectina tipo C y relacionados al receptor de manosa en los macrófagos (no descritos previamente en *Aedes aegypti*) y 2 más que tienen un dominio de fibrinógeno y relacionado a las angiopoyetinas de vertebrados. En adición a 2 grupos asociados con la apyrasa salival previamente descrita, se encontraron otros seis grupos adicionales, cada uno asociado con una diferente enzima: PAF-acetyl hidrolasa, una enzima que destruye el componente PAF de la agregación plaquetaria, esfingomielina fosfodiesterasa, carboxylesterasa, dos enzimas previamente descritas (Valenzuela, 2002), relacionadas a la alimentación de azúcar y purina hidrolasa.

## **Estructura de las Glándulas salivales**

A partir de la estructura de las glándulas salivales se sabe que los mosquitos secretan saliva más abundante y frecuentemente de lo que aparentan, regulando su descarga por una combinación de nervios y mecanismos endocrinos. La saliva tiene muchos constituyentes los cuales sirven para un número de funciones no totalmente establecidas. Estas sustancias presumiblemente incrementan la adecuación del artrópodo por incrementar la velocidad a la cual la sangre es embebida y por disminuir la posibilidad de ser eliminados por los hospederos durante la alimentación (Ribeiro, 1987; Ribeiro 1995), Así mismo, la saliva de los mosquitos es de amplio interés debido a que esta contiene alérgenos los cuales son probablemente responsables de reacciones de hipersensibilidad a los piquetes del mosquito y principalmente porque algunos parásitos (como los causantes de la malaria) y arbovirus (como el Dengue), utilizan la saliva del vector como un vehículo para la transmisión a sus hospederos vertebrados definitivos, de esta manera pueden servir como objetivos para vacunas en contra de estas enfermedades (Valenzuela et al 2001).

Cada mosquito presenta un par de glándulas salivales en el tórax justo arriba del primer par de patas y flanqueando el esófago, cada una de las glándulas consiste de tres lóbulos, dos laterales y uno medio, la longitud de los lóbulos laterales es de aproximadamente 900  $\mu\text{m}$  y el del lóbulo medio de 360  $\mu\text{m}$ , su amplitud es de 70 a 80  $\mu\text{m}$  (Clements, 1992). Cada lóbulo está formado por una capa de células endoteliales dispuesta alrededor de un conducto central y unido externamente por una lamina basal. Estas células guardan los productos secretados en sus vesículas apicales. La saliva posteriormente es secretada dentro del conducto y liberada a la parte de la boca con la ayuda de una “bomba” salival. Los lóbulos laterales están formados de tres regiones distintas, proximal, intermedia y distal, mientras que el lóbulo medio está formado de una región corta (cuello) y una región distal (Figura 3).

Se sabe que las células del lóbulo distal están asociadas con la secreción de enzimas relacionadas a la alimentación de azúcares, mientras que las células del lóbulo posterior están asociadas con la secreción de moléculas relevantes durante la alimentación sanguínea (Valenzuela, 2005). Las glándulas salivales de los machos son más pequeñas que las de las hembras, todas las células de las glándulas de los machos son similares a aquellas de la región proximal del lóbulo lateral de las hembras, y carecen de proteínas con actividad involucrada en la alimentación sanguínea, debido a sus hábitos alimenticios no relacionados con la hematofagia. La composición proteínica de las glándulas salivales no es muy compleja. Usualmente son vistas menos de 20 bandas principales de proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida sodium dodecil sulfato (SDS-PAGE), pudiendo obtener las secuencias de estas a través de secuenciación aminoterminal (Valenzuela 2002)

Tres de las diez secuencias amino terminales obtenidas en estudios previos están relacionadas con proteínas previamente descritas; apyrasa, el alérgeno salival de 30 KDa y la proteína D7, entre las otras siete secuencias se encontraron dos proteínas relacionadas a D7 y nombradas D7B y D7C, la familia de proteínas D7 no tiene función conocida, esta pertenece a la superfamilia de proteínas de unión a odorantes y puede funcionar por unirse a mediadores de la hemostasia de los vertebrados para ayudar a la alimentación sanguínea o como inhibidores de la unión del fibrinógeno a las plaquetas (Valenzuela *et al* 2002). Así mismo, se encontraron dos péptidos de bajo peso molecular nombrados AE01 y AE02, una proteína adicional relacionada al alérgeno salival, sin función conocida. Una secuencia con similitudes a angiopoietin las cuales están involucradas en la regulación del crecimiento del tejido vascular en mamíferos y finalmente una secuencia que se relaciona a la familia de proteínas antígeno-5 cuya función se desconoce (Valenzuela 2002).

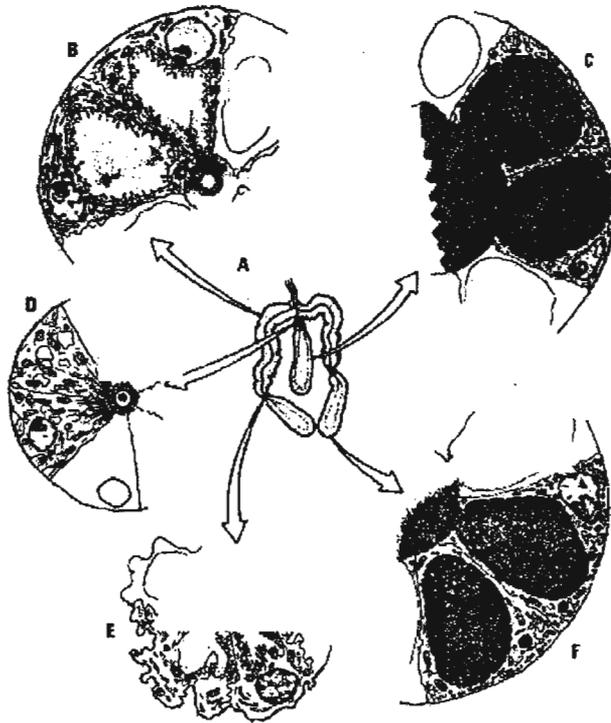


Fig. 3. Estructura de las glándulas salivales de un mosquito. Se muestran las tres principales regiones de los lóbulos laterales y medio (A), así como su composición celular (B-F). Tomado de Clements 1992.

Tres proteasas serinicas secretadas probablemente están asociadas con la activación de la cascada de polifenol oxidasa, responsable de las reacciones inmunes de los artrópodos. Pero no se excluye pensar que estas proteasas pueden estar jugando otros papeles, tales como la activación de vías anti-hemostáticas como la proteína C o plasmina. Las nuevas serpinas descritas podrían tener un efecto anticoagulante en adición al ya reportado para el Fxa.

Con base en estos antecedentes nosotros nos proponemos identificar posibles antagonista hemostáticos dirigidos en contra de la trombina en las glándulas salivales del mosquito vector de virus del dengue *Aedes aegypti*.

## Hipótesis

El mosquito *Aedes aegypti* es capaz de modificar la respuesta hemostática del huésped, mediante antagonistas (anti-trombina) presentes en las glándulas salivales.

## Objetivo

Identificar posibles antagonistas (anti-trombina) de la hemostasia en las glándulas salivales del mosquito *Aedes aegypti*.

### Objetivos particulares:

- Disectar glándulas salivales de las hembras del mosquito *Aedes aegypti*
- Extracción y cuantificación de proteínas totales de las glándulas salivales provenientes de *Aedes aegypti*.
- Evaluación de la actividad biológica de posibles antagonistas de la trombina presentes en el homogenado total de las glándulas salivales de *Aedes aegypti*, mediante los ensayos de agregación plaquetaria, velocidad de polimerización de fibrina, ensayo cromogénico, tiempo de trombina y tiempo de tromboplastin parcial activado.
- Purificación de los posibles inhibidores de la trombina por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).
- Obtención de la (s) secuencia (s) de la (s) proteína (s) involucrada (s) en la inhibición del funcionamiento de la trombina.

## **METODOLOGÍA**

### **Cultivo de mosquitos**

Los mosquitos de la especie *Aedes aegypti* fueron cultivados en el insectario del Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas (CISEI) del Instituto Nacional de Salud Pública (INSP). Los individuos adultos (hembras) después de la copula (de 3 a 5 días después de emerger), fueron alimentados con sangre de ratón, posteriormente se les ofrecen oviponideros, se obtienen los huevecillos y se depositan en charolas con agua corriente para continuar el ciclo de vida a través de sus cuatro estadios larvales, las pupas son colocadas en matraces de los cuales posteriormente se obtendrán los moscos adultos, los cuales por lo menos de cuatro días post emerger son utilizados para la obtención de las glándulas salivales.

### **Obtención de glándulas salivales.**

Las glándulas salivales de las hembras del mosquito *Aedes aegypti* de por lo menos 3 días después de emerger de la pupa se disectaron en grupos de 20 pares en 20  $\mu$ l de Buffer salino fosfato (10 mM de fosfato de sodio a pH 7.0 con 150 mM NaCl) y se guardaron a  $-75^{\circ}$  C hasta su uso. Estas glándulas se utilizaron para la purificación del antagonista hemostático (anti-trombina) salival mediante HPLC.

Como se mencionó, las glándulas salivales se localizan en la parte superior del primer par de patas en los mosquitos adultos, la disección de estas se logra con ayuda de micro agujas, colocando una en la parte anterior del tórax y la segunda en la posición de la cabeza del mosquito, se realiza un pequeño tirón de ambas partes y las glándulas salivales ven en el portaobjetos en donde se realizó la disección. 20 pares de estas glándulas son colocadas en tubos eppendorf y a partir de estas se obtiene el homogenado de las glándulas salivales (HGS).

### **Homogenado de las glándulas salivales (HGS).**

Cada una de las alicuotas que contienen los 20 pares de glándulas salivales de *Aedes aegypti* se sometieron a un tratamiento de congelación y descongelación en cinco ocasiones con nitrógeno líquido, posteriormente las alicuotas se centrifugaron a 10,000g x 10 minutos y el sobrenadante se utilizó para pruebas posteriores (evaluación de la actividad de trombina), de un HGS total de mil pares de glándulas salivales se obtuvieron 28 fracciones de proteínas por medio de HPLC.

### **Evaluación de la actividad de la Trombina.**

La actividad de la trombina se evaluó mediante dos ensayos. Un ensayo cromogénico y un ensayo de polimerización del fibrinógeno; el primero se midió de dos formas: 1) mediante el corte del sustrato cromogénico (benzoyl-Phe-Val-Arg-pNA de Calbiochem) el cual se midió por espectrofotometría a 450 nm en un lector termomax. Mezclando 50  $\mu$ l de trombina (a una concentración de 0.5 UI) con 10  $\mu$ l de 10 mM Hepes, pH 7.4 + 150 mM NaCl para el control, y 10  $\mu$ l de HGS (equivalente a 6.48 pares de glándulas salivales (PGS); para ver la concentración de proteína y volumen convertido a equivalencias de pares de glándulas, dirigirse al apéndice A) en el mismo buffer para el experimental. Las mezclas se incubaron por cinco minutos a 37 °C. Posteriormente se añadieron 100  $\mu$ L de sustrato cromogénico (0.5mg/mL) a la mezcla y se leyó a 405 nm con temperatura controlada a 37 °C. 2) La actividad de trombina se midió (como en Cadroy *et al* 1997) utilizando monocapas de cultivo primario de HUVEC ( $1.0-1.5 \times 10^5$  células/pozo) en cajas de cultivo de 24 pozos. En el ensayo control las células fueron lavadas tres veces con buffer A [150mM de NaCl, 2.5 mM de CaCl<sub>2</sub>, 5mg/ml de albumina serica bovina(BSA), 20mM detrás-HCL, pH 7.4] y después incubadas por 2 horas a 37 °C en 100  $\mu$ l del mismo buffer mas 5 U/ml de trombina humana, 150 nmol/l de proteína C humana y 10 $\mu$ l de 5mmol de CaCl<sub>2</sub>. Transcurrido este periodo de incubación, se tomaron 50  $\mu$ l del sobrenadante y

se añadieron 450  $\mu$ l del sustrato cromogénico de proteína C activada (S2266, 2 mmol/L, Chromogenix) y 10 $\mu$ l de 25 U/ml de hirudina, Sigma, E.U); para los ensayos con HGS se sustituyó la concentración de hirudina por 6.48 PGS de extracto salival de *Aedes aegypti*. Finalmente, la reacción fue detenida a los de 30 minutos añadiendo 200  $\mu$ l de ácido acético al 50% (vol/vol) y la actividad amidolítica de la proteína C generada fue leída a 405 nm con un espectrofotómetro de luz ultravioleta (uv160u).

La actividad de la trombina sobre el fibrinógeno se midió mediante un ensayo de velocidad de polimerización de fibrina (VPF) con ayuda de un espectofotómetro de luz ultravioleta (uv160u). El ensayo se inicio agregando 200  $\mu$ l de trombina (5 UI ajustada a un tiempo de polimerización de 18 segundos) y 5, 10 y 20  $\mu$ l de 10 mM de buffer Hepes, pH 7.0 como control e igual cantidad con el HGS incubándolo previamente en un lapso de cinco minutos, estos compuestos se añadieron a una solución 1:9 de plasma pobre en plaquetas de donadores sanos de edades entre 20 y 40 años; para cada uno de los donadores se tomo el tiempo de inducción de la malla de fibrina y se registraron como los tiempos controles, cada uno de éstos tiempos se comparó a las velocidades de polimerización en presencia del HGS. Las medidas de la VPF se determinaron cada 10 seg. Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado, tanto en los controles como en los experimentales sus valores fueron promediados. Para la obtención de las pendientes se determinó el ln del tiempo y de cada una de las lecturas de los valores obtenidos se ajustó la mejor línea recta por medio de mínimos cuadrados. Los valores y gráficas se obtuvieron por medio del software estadística 6.0.

#### **Ensayo de agregación de plaquetas.**

La evaluación de la agregación plaquetaria del HGS total y de cada una de las fracciones colectadas por medio del HPLC se llevaron a cabo utilizando un ensayo de agregometría. Brevemente: se tomaron muestras sanguíneas de donadores sanos por personal

del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, en donde se llevo a cabo este ensayo. Cada una de las muestras sanguíneas se centrifugaron durante 2 minutos 15 segundos a una velocidad de 3,000 rpm extrayendo de este modo el plasma rico en plaquetas, estas últimas se cuantificaron en un contador de células (Beckman coulter), obteniendo un promedio entre 400,000 y 600,000 plaquetas, las cuales fueron diluidas en plasma pobre en plaquetas obtenido de una segunda centrifugación de la muestra sanguínea por 15 minutos a la misma velocidad.

El ensayo de agregación plaquetaria tiene un principio turbidimétrico (figura 3) y mide el paso de luz en una concentración final de 250,000 plaquetas, tomadas a partir de una mezcla de plasma rico en plaquetas diluida en plasma pobre en plaquetas, de esta mezcla se tomaron 800µl y se repartieron en dos celdas, las cuales se colocaron en un agregometro el cual midió la incidencia de luz en ambas muestras y las comparó con su respectivo control (plasma pobre en plaquetas). Para la obtención de los parámetros adecuados de agregación plaquetaria se evaluaron diferentes dosis de trombina (Dade Bhering) en un intervalo de 0.2 a 0.5 unidades de esta proteína. La agregación plaquetaria se inició por la adición de 30µL de trombina (0.3 UI), y se observó en un agregometro (Chrono-Log Corporation). El HGS se añadió a concentraciones de 4 y 5 µg del extracto total de proteínas de las glándulas salivales y de 20 µL para cada una de las fracciones del HPLC, todas las dosis se incubaron previo a la adición de trombina durante un periodo de cinco minutos. Los porcentajes de agregación se obtuvieron con ayuda del software Aggro/link versión 1.0. En el caso de las fracciones del HGS los porcentajes control de agregación plaquetarias se tomaron como un 100 % y con base a cada uno de ellos se hizo la comparación con los ensayos experimentales.

En los ensayos de agregación plaquetaria dependiente de colágena añadimos 2 µg de está y 5 µl de buffer de disección para los controles positivos. Para la agregación dependiente de ADP se colocaron 4 µM de este agonista con buffer de disección. Ambos ensayos sirvieron como punto de comparación con respecto a los ensayos experimentales los cuales consistieron

de un periodo de incubación de 5 minutos de 5 y 10  $\mu\text{g}$  del extracto de glándulas salivales. En los controles de agregación plaquetaria negativos no se utilizó agonista alguno, dejando transcurrir el tiempo (14 minutos para cada uno de los ensayos) pertinente y observando el porcentaje de agregación plaquetaria.

Para los ensayos de inhibición de la agregación plaquetaria positivos se utilizó una solución madre de 1000 UI/ml de heparina, la cual se diluyó hasta la concentración de 1 UI/ml, la agregación plaquetaria se inició al incubar esta concentración de heparina durante 5 minutos antes de la adición de 0.3 UI de trombina.

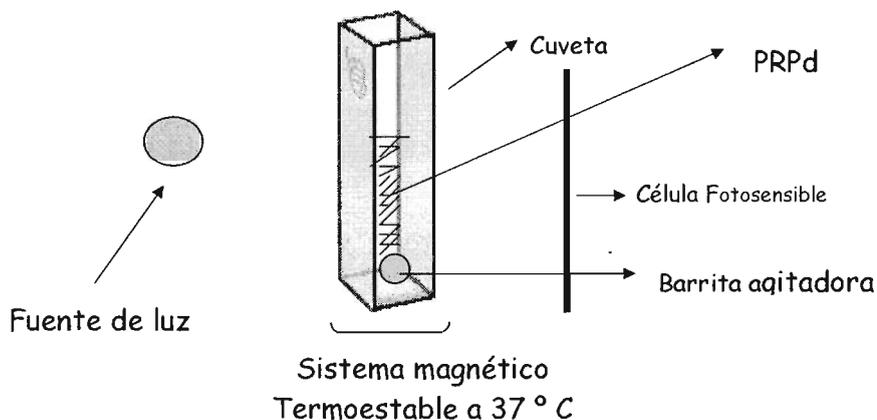


Fig 3. Diagrama del método turbidimétrico en el cual se basa el ensayo de agregación plaquetaria. Se ilustra una fuente de luz y un sistema termoestable que junto con un imán (barrita agitadora) asemejan el flujo sanguíneo.

### **Evaluación del tiempo de protrombina (TP), tiempo de tromboplastin parcial activado (TTPA) y tiempo de trombina (TT).**

En los ensayos de TP, TTPA y TT en los controles se utilizaron 80 $\mu\text{l}$  de plasma pobre en plaquetas con buffer de disección (fosfato salino pH 7.0) para los tres ensayos y 100 $\mu\text{l}$  de plasma pobre en plaquetas incubado durante 5 minutos con 10 y 15  $\mu\text{l}$  del HGS. En el tiempo de protrombina la mezcla se activó al adicionar 160 $\mu\text{l}$  de reactivo Thromborel S incubado a

37°C (los reactivos utilizados en los tres ensayos provienen de Dade Behring), el tiempo de coagulación se determinó utilizando un coagulometro mecánico (Amelung KC4 micro). En el TTPA la mezcla del plasma pobre y el HGS (así como para sus controles), se activaron con 80µl de Pathrombin SL a temperatura ambiente mas 80µl de cloruro de calcio a 0.025 mol/l a 37°C, el resultado de la coagulación se midió de igual forma que en el TP.

Finalmente para el TT se utilizaron 160µl de Trombina, diluida en 1400µl de solución salina para un tiempo control de ~21 seg. ("test reagents thrombin" de Dade Bhering), el reactivo se añadió a 37°C como el activador del proceso de coagulación y el tiempo de coagulación se tomó como en el TP y TTPA. Los experimentos anteriores se hicieron por cuadruplicado; para probar las diferencias entre los ensayos controles y los experimentales se determinaron las pruebas de: t de student, U de Mann-Whitney, y Kolmogorov-Smirnov mediante el paquete Statistica ver 6.0.

## **SDS-PAGE**

La identificación de proteínas totales del homogenado de glándulas salivales se llevo a cabo en un gel unidimensional por medio del método de Laemmli, desnaturalizando las proteínas en un buffer que contiene SDS y agente reductor (2- mercaptoetnenol), para la determinación de los pesos moleculares de las muestras se incorporo un marcador de peso molecular con un rango de 6.5 hasta 200 KDa. (Bio Rad), el mismo procedimiento se llevo a cabo para las fracciones resultantes del HPLC comparándolas con un marcador de peso molecular que va desde los 2.5 hasta los 45 KDa. (Rainbow, Amersham).

## **Tinción con plata**

La detección de las distintas bandas obtenidas a partir de un gel SDS-PAGE, se realizó a través de la tinción con plata (12Mm de nitrato de plata) de la siguiente manera:

Se colocó el gel 20 minutos en una solución de etanol al 50% y ácido acético al 2% , posteriormente se hicieron 3 lavados de 10 minutos en solución 2 (etanol al 10%, ácido acético al 5%), pasado este tiempo se dejó 5 minutos en solución 3 (dicromato de potasio 0.0034 N y ácido nítrico 0.0032 N) la cual se retiró mediante 4 lavados rápidos en agua bi destilada, y posteriormente se dejó 30 minutos en la solución de plata los primeros cinco minutos a la luz y los siguientes 25 cubiertos de está, pasado este tiempo se realizaron dos lavados rápidos en revelador, 0.28 M de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.0185% de formaldehído al 37%, y se dejó en esta solución con agitación suave hasta obtener la intensidad adecuada de las bandas. Para detener la reacción, se retiró el revelador y se colocó el gel en ácido acético al 10 %, posteriormente se lavó en agua bi-destilada y se mantuvo en ácido acético al 1% hasta su secado.

### **Cuantificación de proteínas**

La determinación de la concentración total de proteínas se llevó a cabo utilizando tanto el método de Bradford como el kit micro BCA -el cual contiene ácido bicicoaninico como el agente de detección para Cu el cual se forma cuando es reducido por las proteínas en un ambiente alcalino- (Pierce Micro BCA protein assay kit 23235), la coloración de las muestra se obtiene al incubar el homogenado total de las glándulas salivales a 37 °C durante 30 minutos, posteriormente se determinaron las lecturas a una longitud de onda de 562nm y se extrapolaron en una curva estandar de BSA (albumina serica bovina) concentrada a 2.0 µg/µl.

Las lecturas se midieron a 562 nm en un espectofotometro Ultrospec 1100 pro en cuvetas uvonic 6q y a 570 nm en una placa 96 well en un lector multiskan ascent (Thermo Labsystems), las gráficas de cuantificación se obtuvieron a partir del software interno del equipo.

### **Purificación de los posibles antagonistas.**

A partir del homogenado de las glándulas salivales se llevo a cabo la purificación de los posibles inhibidores de la trombina (anti-trombina). Las proteínas homogenadas de las glándulas salivales de *A. aegypti* se separaron mediante filtrado molecular en columnas de HPLC.

La purificación de las proteínas involucradas en la inhibición de la agregación plaquetaria así como en los ensayos cromogénicos se llevó a cabo a partir del homogenado de glándulas salivales de 1000 hembras de *Aedes aegypti* de acuerdo a Valenzuela y colaboradores (1999), con ligeras modificaciones. Brevemente; las proteínas homogenadas de las glándulas salivales de *A. aegypti* se separaron por medio de un ensayo de HPLC en una columna Protein Pak 60 (7.8 x 300 mm) con una medida de exclusión de 1000 a 20,000 Da. (Waters). Los protocolos cromatográficos se llevaron a cabo con ayuda de una bomba Perkin-Elmer serie 2000 detectándose a una longitud de onda de 280 nm. La velocidad de flujo utilizada fue de 1ml/min. Las fracciones se colectaron a intervalos de 0.5min obteniendo un total de 28. Estas muestras fueron las que nuevamente se utilizaron en los ensayos de agregación plaquetaria, velocidad de polimerización de fibrina y en el ensayo cromogénico anteriormente descritos.

### **Concentración de la muestra**

Las muestras obtenida a partir del HPLC (fracción 5 y 4) se concentraron y desalaron con filtros de centrifugación microcon (millipore) con una membrana de celulosa cuyo corte de paso es de 3000 KDa, el reservorio de la muestra se obtuvo en viales de policarbonato. El volumen agregado a concentrar fue de 500  $\mu$ l. Las muestras concentradas por este método posteriormente se liofilizaron, hasta un volumen de 6 $\mu$ l, en un Savant (AS 160 speed vac) durante 15 minutos, la alícuota obtenida de esta manera se analizó mediante MALDI-ToF.

## Caracterización proteica

La obtención de la secuencia proteica se obtuvo a través del método de espectroscopía de masas asistido por láser (MALDI-ToF), este ensayo se llevó a cabo en el laboratorio de proteómica del Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas (CISEI) del Instituto Nacional de Salud Pública (INSP). La fracción 5 obtenida a partir del HPLC y su fracción aledaña (Fracción 4) fueron sometida a una matriz orgánica (de ácido  $\alpha$ -ciano-4 hidroxicinámico (CHCA) el cual mejora la sensibilidad de péptidos de <10KDa) para su cristalización. Las dos fracciones del HPLC fueron sometidas a una digestión con tripsina antes de someterlas al MALDI-ToF. Previo a introducir la muestra se paso una mezcla de calibración con las siguientes proteínas:

Proteína	Peso monoisotópico
Arg <sup>-1</sup> -Bradiquinina	904.4681
Angiotensin	1296.6853
Glu- Fibrinopéptido	1570.6774
Neurotensin	1672.9175

Los resultados obtenidos de las masas de iones péptidicos de las fracciones 4 y 5 se visualizaron en un cromatograma de espectro de masas obtenido a partir del software interno del MALDI-ToF. El espectro de masas obtenido se comparó a la base de datos de Mascot ([http://www.matrixscience.com/search\\_form\\_select.html](http://www.matrixscience.com/search_form_select.html)) la cual se apoya en datos provenientes de espectroscopía de masas para identificar proteínas de una base de datos de secuencias primarias.

### **Alineamiento de secuencias**

Las secuencias pépticas obtenidas en la búsqueda en Mascot, se alinearon mediante un “BLAST” local a las secuencias obtenidas del “Sialome” (proteínas obtenidas de las glándulas salivales por medio de una biblioteca de cDNA) de *Aedes aegypti*. El alineamiento local de las proteínas se llevo a cabo con el algoritmo de Smith-Waterman (Pearson, 1999) disponible en “Biology Workbench” (<http://workbench.sdsc.edu/>), con una penalidad de “gap” de -12, una penalidad de extensión de -2 y con un valor máximo de espera de 10.

Las secuencias alineadas de esta forma se compararon con una base de datos locales de moléculas de antitrombinas por medio del programa ClustalX 1.8. La composición de aminoácidos y el perfil de hidrofobicidad Kyte & Doolittle tanto de la secuencia D7B (proteína de *Aedes aegypti*) como de una serina proteasa antitrombina, se llevaron a cabo en el programa Bioedit.

## RESULTADOS

### Agregación plaquetaria

Después de evaluar las diferentes dosis de trombina, se determinó que la concentración óptima para ser utilizada posteriormente en todos los ensayos de agregación plaquetaria es entre 0.3 y 0.4 UI de trombina (Fig. 4), por lo que decidimos trabajar con una dosis de 0.3 UI de trombina para todos los posteriores ensayos. Las condiciones experimentales fueron las mismas en cada uno de los ensayos (ver métodos). También se evaluó el porcentaje de agregación plaquetaria al no colocar un agonista, (la gráfica se puede ver en el apéndice B), corroborando que no existe porcentaje de agregación plaquetaria en ausencia del activador.

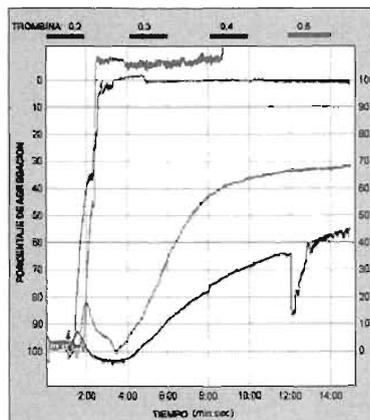


Fig 4 Gráfica en la que se muestran 4 diferentes patrones de agregación plaquetaria a diferentes dosis de agonista (trombina), el momento en el que se agrega la concentración de trombina se indicaa con una flecha, el porcentaje de agregación se delimita a la derecha de la gráfica.

Azul 0.2, Verde 0.3, Negro 0.4 y Rojo 0.5 UI de trombina respectivamente.

Los ensayos posteriores se llevaron a cabo en presencia de un control positivo de agregación plaquetaria, con 4 y 5  $\mu$ l de buffer fosfato salino y sin el homogenado de glándulas salivales (HGS), a las concentraciones de trombina antes mencionadas (Fig. 5), a partir de estos controles de agregación se hicieron los ensayos comparativos utilizando diferentes dosis ( 4 y 5  $\mu$ l ) del HGS (Figuras 6, 7 y 8).

Name Control,  
 ID 24/10/03 Date 01/04/00 Hosp.

Channel	1	2
Instrument	Opt	Opt
Reagent	trombina	.3
Stirrer	1000	1000
Gain		
Amplitude		
Slope	0	0

Comments  
 5  $\mu$ l de Buffer sin HGS con .3  $\mu$ l de Trombina

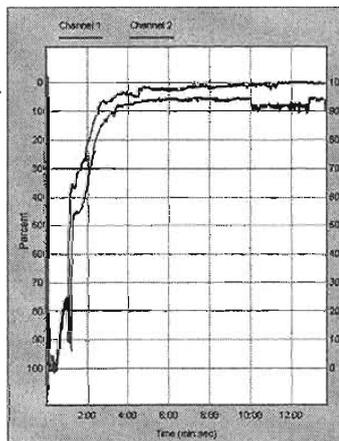


Fig 5. Control del ensayo de agregación plaquetaria. En ambos canales se utilizaron 30 $\mu$ l de trombina y 5  $\mu$ l de buffer salino sin HGS

En los ensayos control tanto en ausencia del buffer de disección (fosfato salino) como con 5  $\mu$ l del mismo, la agregación plaquetaria es prácticamente entre el 90 y 100 % en ambos canales con las condiciones mencionadas en el pie de la figura 5. En esta gráfica observamos que el buffer en el cual se disectaron y concentraron las muestras de glándulas salivales no interviene en el proceso de desgranulación de las plaquetas y por lo tanto en su efecto de agregación. En la figura 6 se muestra un ensayo de agregación plaquetaria, incubado previamente durante 5 minutos con 4  $\mu$ l del extracto total de las glándulas salivales. Encontramos que existe una inhibición de la agregación plaquetaria hasta en un 60% con respecto al control positivo, el único parámetro diferente en ambos experimentos fue la adición del HGS en el grupo experimental. Al observar una disminución en el porcentaje de agregación plaquetaria se probó una dosis mayor del mismo.

Name exp1 rep.  
 ID 27/10/03 Date 01/04/88 Hosp.

Channel	1	2
Instrument	Opt	Opt
Reagent	trombina 0.3	0.3
Stirrer	1000	1000
Gain		
Amplitude		
Slope	0	0
Comments		
con 4 ul de HGS		

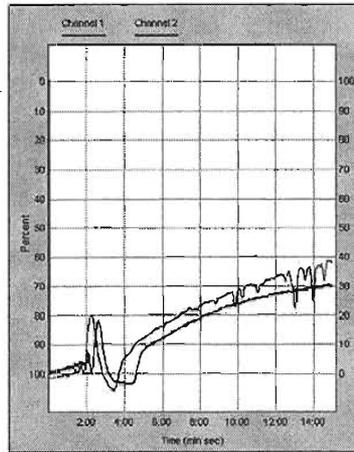


Fig. 6 Ensayo de agregación de plaquetas con 4  $\mu$ l de HGS y 30  $\mu$ l de trombina en ambos canales

Name exp2rep. con HGS  
 ID 24/10/03 Date 01/04/88 Hosp.

Channel	1	2
Instrument	Opt	Opt
Reagent	trombina 0.3	0.3
Stirrer	1000	1000
Gain		
Amplitude		
Slope	0	0
Comments		
5ul de HGS con .3 ul de trombina		

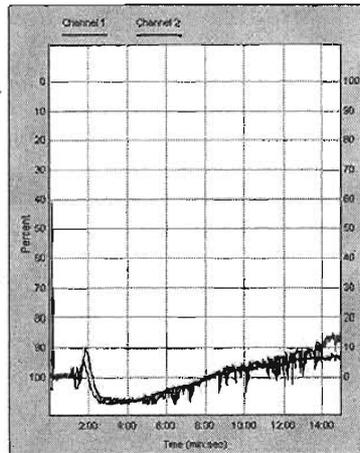


Fig. 7 Ensayo de agregación plaquetaria. En ambos canales se utilizaron 30 $\mu$ l de trombina incrementando la dosis a 5  $\mu$ l de buffer salino con HGS.

En la figura 7 observamos que la agregación plaquetaria al colocar 5  $\mu$ l del homogenado de glándulas salivales se inhibe hasta un porcentaje de agregación del 7 y 15 % en cada uno de los canales (inhibición con respecto al control de 83 y 85% respectivamente). Estos resultados

sugieren la presencia de un inhibidor de la agregación plaquetaria dependiente de trombina en el HGS y que esta inhibición es dependiente de la concentración de HGS utilizada (como posteriormente se confirma con otros dos ensayos similares figura 8). Los resultados de agregación representados en ambas gráficas indican que el porcentaje de inhibición es dependiente de la dosis administrada de los componentes de las glándulas salivales de *Aedes aegypti*. Esto sugeriría la actividad de una molécula presente en la saliva de las glándulas salivales del mosquito que esta interactuando con la molécula de trombina, interrumpiendo su función establecida en la activación de las plaquetas.

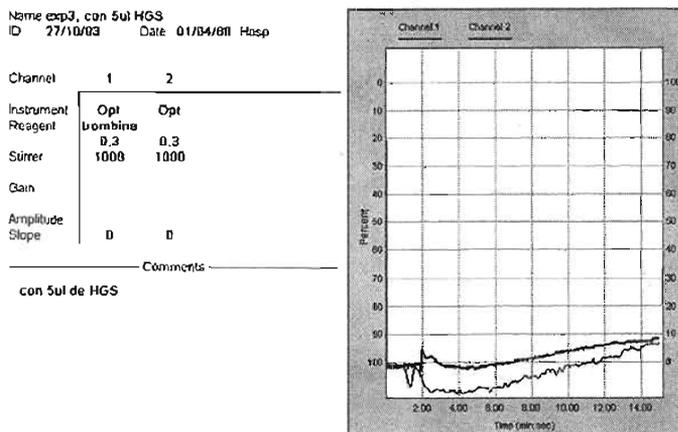


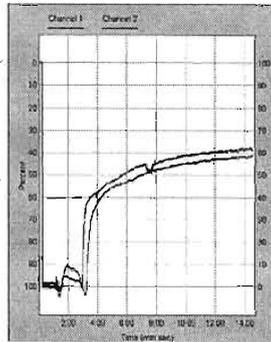
Fig. 8 La gráfica muestra una repetición del ensayo realizado con 5  $\mu$ l del HGS.

Las gráficas de las figuras 7 y 8 se compararon con los resultados obtenidos con heparina (un inhibidor conocido de la trombina, figuras 9 y 10) y se encuentra un porcentaje de inhibición similar al colocar 3.24  $\mu$ g de HGS. Con estos resultados se confirma que el extracto de las glándulas salivales de *Aedes aegypti* se comporta de manera similar a los ensayos en presencia de la heparina, al impedir la agregación plaquetaria dependiente de trombina.

Name: control\_heparina  
ID: 06/04/05 Date: 04/06/105 Hosp: Hosp

Channel	1	2
Instrument	Opt	Opt
Reagent	Trombina	Trombina
Solvent	3000	3000
Gain		
Amplitude	0	0
Slope		

Comments



Name: Heparin\_Suf  
ID: 06/04/05 Date: 04/06/105 Hosp: Hosp

Channel	1	2
Instrument	Opt	Opt
Reagent	Trombina	Trombina
Solvent	3000	3000
Gain		
Amplitude	0	0
Slope		

Comments

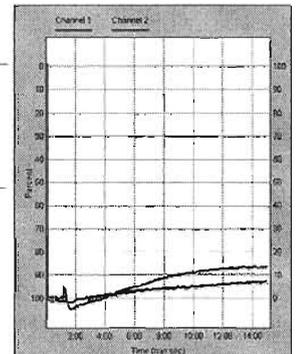


Fig. 9 y 10. En la fig. 10 se muestra un control positivo de agregación plaquetaria con 1ul/ml de heparina inhibiendo el porcentaje de agregación de plaquetas cuando se añaden 30  $\mu$ l de trombina como agonista, mientras que en la fig. 9 se muestra el control de este ensayo en ausencia de la heparina como molécula inhibidora.

Con base a que en las glándulas salivales de *Aedes aegypti* existe un inhibidor de la agregación plaquetaria dependiente de ADP, se determinó el porcentaje de inhibición plaquetaria al utilizar este agonista como activador agregando al ensayo una dosis de 4  $\mu$ M de ADP y 2 $\mu$ g/ml para la colágena, este porcentaje de agregación se comparó con los datos obtenidos a partir de la inhibición con trombina.

La figura 11 muestra el porcentaje de agregación plaquetaria al colocar las dosis mencionadas de ADP y colágena en ausencia del HGS y con buffer de disección como el ensayo control, el porcentaje de agregación fue entre un 64 y 67 %.

Name: Control 1.  
ID: Date: 08/13/104 Hosp: Hosp

Channel	1	2
Instrument	Opt	Opt
Reagent	ADP	COLAG
Solvent	1000	1000
Gain		
Amplitude	0	0
Slope		

Comments

Sin HGS y con Buffer

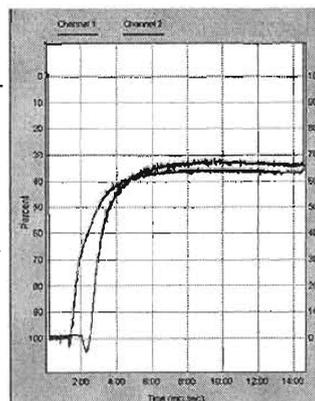


Fig. 11 Se muestra el porcentaje de agregación plaquetaria al colocar 4  $\mu$ M de ADP y 2 $\mu$ g/ml de colágena como agonistas y 3.24 pgs de buffer de disección.

En la gráfica 12 no se observó una inhibición de la agregación plaquetaria evidente al colocar la misma dosis (3.24 pgs) del HGS que se añadió al ensayo hecho con trombina, por lo que se aumento la dosis a 6.48 pgs para poder percibir una inhibición dependiente de ADP y colágena (datos mostrados en la figura 13).

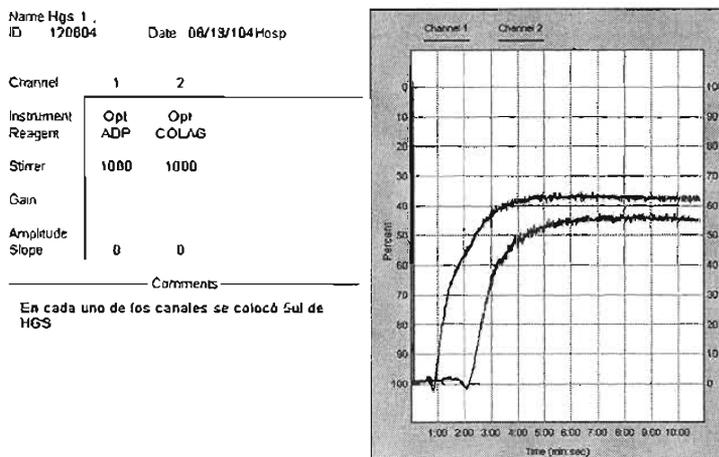


Fig. 12 Porcentaje de agregación plaquetaria dependiente de ADP y colagena (mismas dosis de la figura anterior) al agregar 3.24 pgs de HGS.

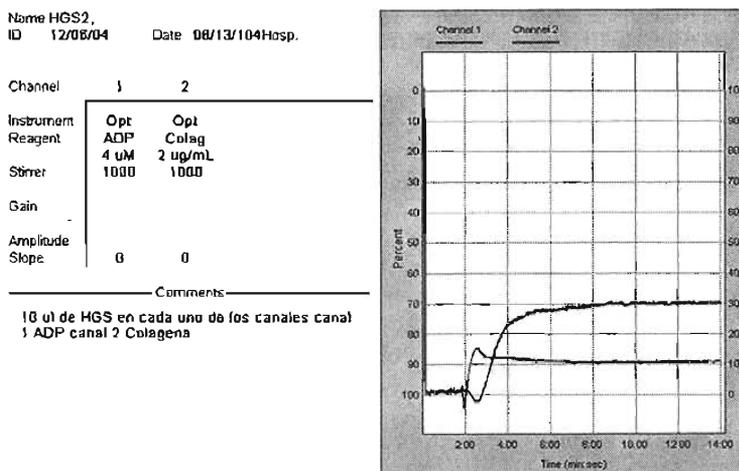


Fig. 13 El porcentaje de agregación plaquetaria dependiente de ADP y colagena (mismas dosis de la figura anterior) al agregar 6.48 pgs del HGS se disminuye en ambos canales y es aun más evidente en el ensayo dependiente de ADP. Estos resultados eran esperados debido a la presencia de la apyrasa en el extracto salival.

### Velocidad de polimerización de Fibrina.

El ensayo de velocidad de polimerización de fibrina se llevó a cabo como se mencionó en la metodología. En las siguientes tablas se muestran los valores de las medias, las desviaciones estandar de los datos, los valores de r y los valores de la pendiente obtenida tanto de los controles así como la diferencia de los datos obtenidos al agregar (concentraciones mencionadas en el encabezado de la tabla) el HGS en 3 experimentos diferentes. Cada uno de ellos se realizó por triplicado.

Tabla 1. VPF al agregar 5 µl de HGS

	Mean	Std.Dv.	r(X,Y)	r	t	p	N	Constant	Pendiente	Constant	Pendiente
Ln min	1,510441	0,733024						Y	Y	X	X
Control 5	0,202350	0,086535	0,983665	0,967991	15,55412	0,000000	10	0,022862	0,118832	-0,137881	8,145895
Ln min	1,510441	0,733024									
HGSPro5	0,186850	0,078547	0,970354	0,941586	11,36578	0,000003	10	0,029798	0,103977	-0,161613	9,055681

Tabla 2. VPF al agregar 10µl de HGS

	Mean	Std.Dv.	r(X,Y)	r	t	p	N	Constant	Pendiente	Constant	Pendiente
Ln min	1,510441	0,733024						Y	Y	X	X
Control 10	0,197900	0,086346	0,984736	0,969706	16,00235	0,000000	10	0,022695	0,115996	-0,143967	8,35982
Ln min	1,510441	0,733024									
HGSpro10	0,163950	0,070295	0,963468	0,928270	10,17494	0,000007	10	0,024395	0,092394	-0,136748	10,04690

Tabla 3. VPF al agregar 15 µl de HGS

	Mean	Std.Dv.	r(X,Y)	r	t	p	N	Constant	Pendiente	Constant	Pendiente
Ln min	1,510441	0,733024						Y	Y	X	X
Control 11	0,320960	0,149480	0,994417	0,988864	26,85345	0,000000	10	0,014719	0,202743	-0,054870	4,877430
Ln min	1,510441	0,733024									
HGSpro11	0,257400	0,121490	0,986788	0,973747	17,22582	0,000000	10	0,010370	0,163548	-0,022089	5,953888

Cada una de las tablas presenta un ensayo control y el experimental con la cantidad del HGS antes indicada. Se puede apreciar que la media de los valores con distintas condiciones abarca un intervalo entre 0.16 a 0.32, mientras que los valores de las desviaciones estándar a partir de la media de cada uno de los controles no difiere en más de dos unidades cuando se

compara a cada uno de los tratamientos realizados. Sin embargo, al observar los valores obtenidos a partir del ln de los tiempos y el ajuste de la mejor línea recta, las pendientes entre los ensayos control y del HGS varían, y se puede observar que la diferencia se incrementa (hasta en cuatro unidades) al aumentar el volumen del HGS indicando un retardo en la velocidad de polimerización de la fibrina en los ensayos experimentales con respecto a los controles, lo cual se aprecia en las siguientes gráficas.

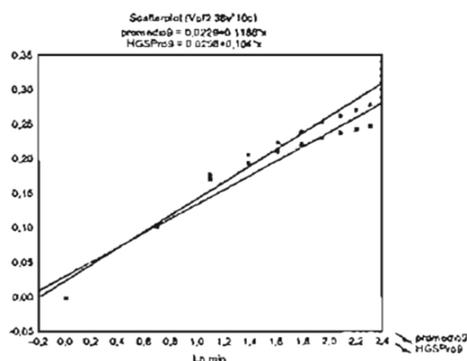


Fig. 14. Grafica obtenida a partir de los tiempos de VPF. Los datos se representan como la mejor línea recta obtenida del ln de los tiempos (seg) a partir de una ecuación de mínimos cuadrados. Con 5 µl de HGS; control en azul HGS en rojo.

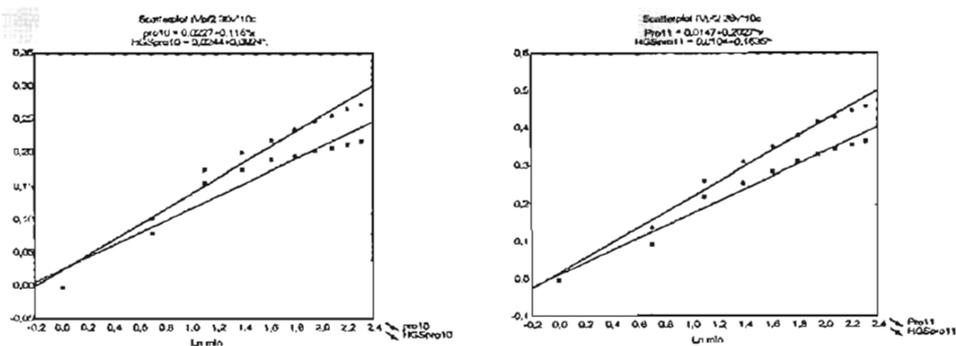


Fig. 15. Graficas obtenidas a partir de los datos de VPF. Utilizando 10 y 15 µl del HGS respectivamente, el control se muestra en azul y el HGS en rojo.

En éstas gráficas se puede ver un retardo en el tiempo de la formación de fibrina al aumentar la dosis de extracto salival, representado por la pendiente marcada en rojo.

## Ensayo cromogénico

Con base a la posibilidad que en el HGS exista un inhibidor de la trombina, decidimos llevar a cabo un ensayo cromogénico en la superficie de las células endoteliales en el cual se utilizó un sustrato para proteína C activada (ver métodos), ya que la trombina forma un complejo con la trombomodulina al entrar a la vía anticoagulante, este complejo activa a la proteína C la cual a su vez inactiva a los cofactores V y VIII. La trombina que no forma los complejos con la trombomodulina reacciona con el sustrato cromogénico de la proteína C, esta trombina libre se inhibe por medio de hirudina, si en el HGS existe un inhibidor de la trombina, entonces se espera que este actúe de manera similar en esta vía como lo haría la hirudina (figura 16).

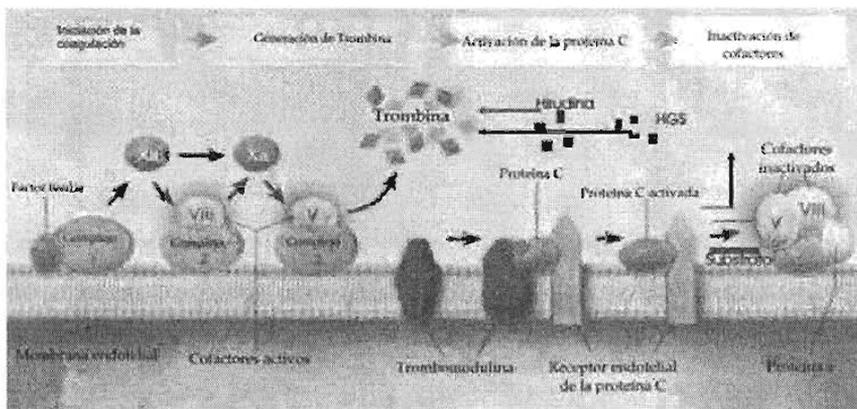


Fig. 16. En la primera parte del esquema se ilustra la iniciación de la cascada de coagulación por la vía intrínseca, en donde participa el factor tisular (proteína transmembranal presentada sobre la membrana endotelial); al generarse suficiente trombina se activa la vía anticoagulante, en donde participa la trombomodulina y la proteína C, esta proteína al estar activa reacciona con los cofactores V y VIII inactivándolos, en este caso reacciona con un sustrato cromogénico emitiendo un color, sin embargo, la trombina libre también interactúa con el sustrato, por lo que se inhibe con hirudina, en los tratamientos controles el único parámetro que cambia es la hirudina por extracto salival (HGS); Xa, factor X activado.

Los datos obtenidos a partir de este experimento son los siguientes:

Con Hirudina	.920
Con HGS	.903
Sin Hirudina	1.104

Encontramos que la actividad amidolítica de la proteína C sobre el sustrato sin hirudina se ve afectado por la presencia de trombina que no formo complejos con la trombomodulina, de este modo se consumió más sustrato, emitiendo mayor color que el presente al inhibir la trombina libre con hirudina. De los tratamientos con el HGS se puede inferir que existe una molécula en éste que interactúa con la trombina de forma similar como lo hace la hirudina.

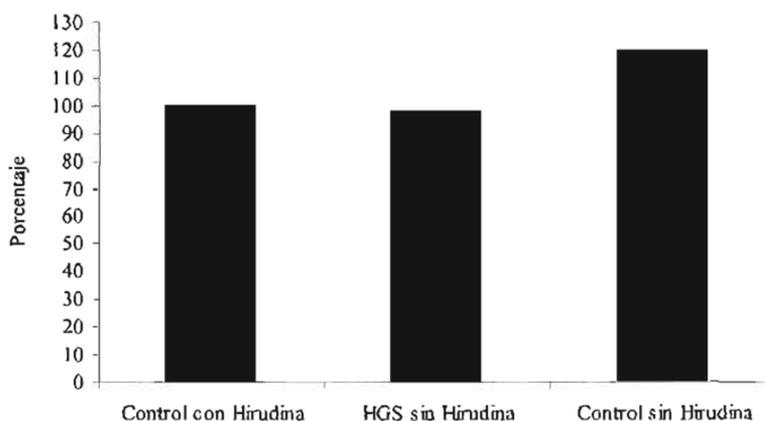


Fig 17 Se grafican los valores obtenidos del ensayo cromogénico, se toma el valor del tratamiento control como el 100 % y a partir de este se compara con los ensayos llevados a cabo en presencia del extracto salival. Los ensayos se realizaron por duplicado y se muestra únicamente su promedio.

En la gráfica anterior se muestra el porcentaje de consumo de sustrato cromogénico con HGS sin hirudina, el control positivo (con hirudina) y negativo (sin inhibidor). En esta gráfica no se observa una diferencia significativa entre el control y el tratamiento con HGS, aunque los valores de emisión de color son menores al colocar el extracto de saliva de mosquitos, esto pudiera deberse a la mayor actividad en contra de la trombina por parte del HGS o por la mayor formación de complejos trombina-trombomodulina. Para evitar este tipo de variables no controlables únicamente se evaluó la posible inhibición de esta enzima al incubar el homogenado total de glándulas salivales con el sustrato cromogénico durante cinco minutos antes de la adición de trombina (ver metodología) obteniendo los siguientes resultados:

Tabla 4. Valores determinados a partir de los ensayos cromogénico los valores se muestran como porcentajes de emisión de luz al retarlos con y sin el homogenado de glándulas salivales.

Trombina + sustrato	1.0854 = 100%
Trombina + Buffer + sustrato	2.042 = 110%
Trombina + HGS	0.9075 = 48.94%

Estos ensayos se llevaron a cabo por duplicado promediándose los valores obtenidos. Al agregar la trombina únicamente con su sustrato se obtuvo el valor de la actividad amidolítica y éste se tomó como el 100%. Al inducir la reacción de la trombina con el sustrato cromogénico en presencia del HGS éste porcentaje disminuyó hasta en un 50 por ciento, lo cual nos sugirió una posible interacción de alguna molécula proveniente del HGS con la molécula de trombina. Los resultados se ilustran en la figura 18.

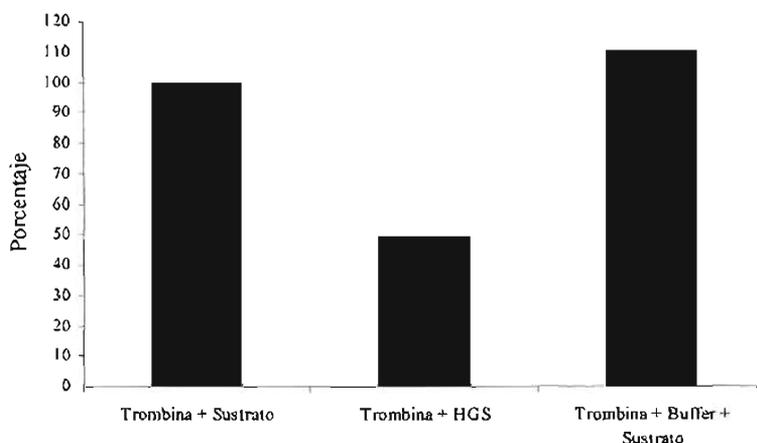


Fig. 18 Valores obtenidos del ensayo cromogénico, se tomó el valor del tratamiento control como el 100 % y a partir de este se comparó con los ensayos llevados a cabo en presencia del extracto salival. Los ensayos se realizaron por duplicado y se muestra únicamente su promedio

A diferencia de lo encontrado en el experimento en donde se seguía toda la vía anticoagulante, en la gráfica 18 se observa una disminución en el consumo de cromógeno y se evita tanto la influencia de trombomodulina como de la activación de la proteína C.

**Tiempo de protrombina (TP), Tiempo de tromboplastin parcial activado (TTPA) y Tiempo de trombina (TT).**

El procedimiento llevado a cabo en estos ensayos se describe en la sección de métodos. Brevemente: los tiempos de trombina (TT), TTPA y TP se evalúan con ayuda de un coagulómetro el cual cuenta con un balín adherido a un campo magnético, que deja de girar en el momento que el plasma se coagula. Este punto es el tiempo que tardó en coagularse el plasma (valor para cada uno de los controles). Paralelamente se evaluó el plasma incubado durante cinco minutos con el HGS. Los valores se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 5. Determinación del TP (vía intrínseca), TTPA (vía extrínseca) y TT (tiempo de trombina). Se muestra los tiempos en ausencia y en presencia de 32.4 pares de glándulas salivales del HGS en cuatro repeticiones.

	TP Control	TP con HGS	TTPA Control	TTPA con HGS	TT Control	TT con HGS
1	11,6	13,2	35,9	44,7	21,1	35,4
2	12,8	13	36,7	46,2	20,3	34,6
3	11,6	14	36,9	42,1	20,8	37,8
4	12,9	14,9	36,7	46	20,9	34,1

De la tabla 5 se obtuvo la media y desviación estándar para cada uno de los ensayos y se comparo con las muestras en las que se añadió el HGS.

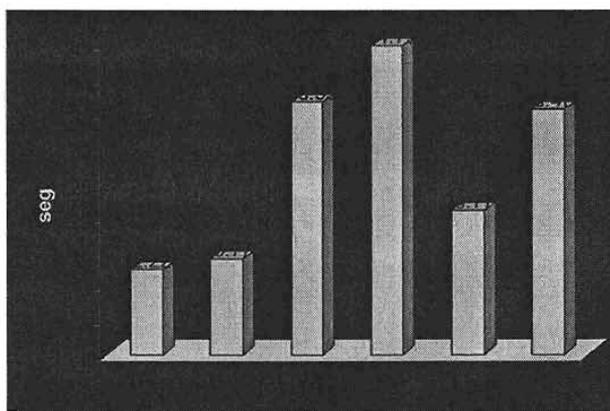


Fig. 19. Se muestra la diferencia entre las medias de los tiempos en las diferentes pruebas de coagulación tanto para los controles como en presencia del HGS.

La gráfica de barras de estos valores muestra una diferencia mínima entre el TP con y sin HGS, para el TTPA el alargamiento del tiempo es de aproximadamente 8 segundos, mientras que en el TT la diferencia del tiempo de coagulación es de 14.7 segundos.

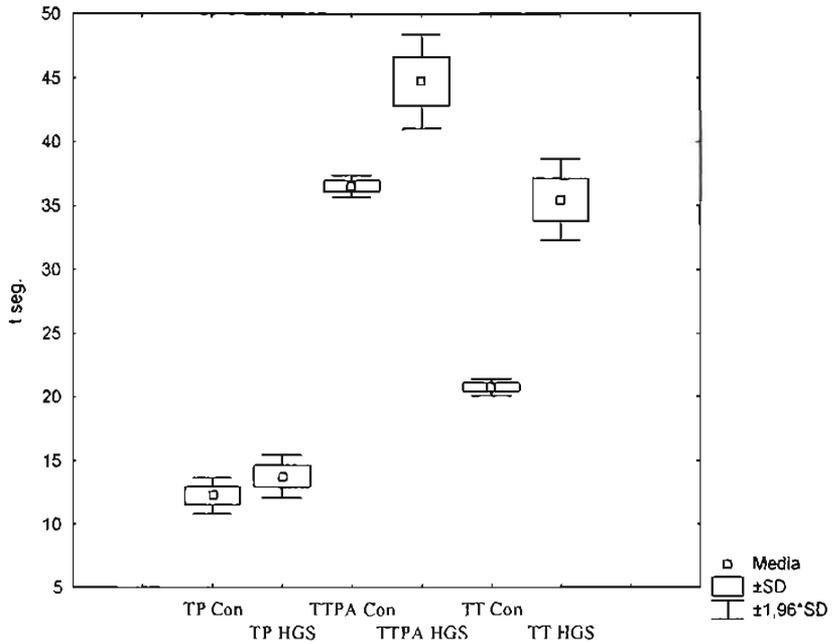


Fig. 20. La diferencia entre las medias se gráfica como la desviación estándar para los ensayos control y su respectivo tratamiento con HGS.

Ya que las desviaciones estándar presentes en los tiempos de trombina y TTPA muestran diferencias notables al graficarlas, se procedió a aplicar una t de student para ver si la diferencia entre las medias es significativa.

Tabla 6. Prueba T para muestras independientes, las diferencias significativas < .05 se marcan en rojo

	Media	Media	t-valor	df	p	N Valida	N Valida	Des. Est	Des. Est
TP Control vs. TP HGS	12,22500	13,77500	-2,74900	6	0,033336	4	4	0,722842	0,865544
TTPA Con vs. TTPA HGS	36,55000	44,75000	-8,45765	6	0,000149	4	4	0,443471	1,887679

	Media	Media	t-valor	df	p	N Valida	N Valida	Des. Est	Des. Est
TT Control vs. TT HGS	20,77500	35,47500	-17,5542	6	0,000002	4	4	0,340343	1,639868

Para ratificar las diferencias significativas observadas a partir de la tabla 6, y con base a que las repeticiones no representan una N válida para pruebas paramétricas, se decidió hacer dos pruebas no paramétricas; una de rangos en donde se comparan las diferencias a partir de las medianas (U de Mann-Whitney) y otra que compara la diferencia de las medias de dos poblaciones a partir de las varianzas (Kolmogorov-Smirnov), representadas en las tablas 7 y 8.

Tabla 7. Prueba de Kolmogorov-Smirnov  
Los resultados significativos con  $p < 0.0500$  se marcan en rojo

	Max Neg	Max Pos	Valor p	Mean	Mean	Std.Dev.	Std.Dev.	N Valida	N Valida
TP	-1,00000	0,00	p < .05	12,22500	13,77500	0,722842	0,865544	4	4
TTPA	-1,00000	0,00	p < .05	36,55000	44,75000	0,443471	1,887679	4	4
TT	-1,00000	0,00	p < .05	20,77500	35,47500	0,340343	1,639868	4	4

Tabla 8. Prueba U de Mann-Whitney  
Los resultados significativos con  $p < 0.0500$  se marcan en rojo

	Suma Rangos	Suma Ran	U	Z	p-level	Z	Valor p	N Valida	N Valida
TP	10,00000	26,00000	0,00	-2,30940	0,020922	-2,32327	0,020165	4	4
TTPA	10,00000	26,00000	0,00	-2,30940	0,020922	-2,32327	0,020165	4	4
TT	10,00000	26,00000	0,00	-2,30940	0,020922	-2,30940	0,020922	4	4

De las evaluaciones estadísticas se concluye que existe una diferencia significativa en los tiempos de coagulación en los tres ensayos, presentándose una diferencia mayor en el TT se aprecia por medio de la comparación de sus medias a partir de la t de student. Estos datos sugieren que puede existir una molécula en el extracto salival de *Aedes aegypti* que favorece un retraso en los tiempos de coagulación tanto en la vía intrínseca como en la extrínseca (o en donde convergen) de la cascada de coagulación.

## Separación de proteínas mediante electroforesis en gel de acrilamida (SDS-PAGE)

Con el objeto de llevar a cabo la evaluación inicial del HGS así como de comparar las proteínas presentes en nuestro homogenado total y las obtenidas anteriormente a partir de un banco de cDNA de la saliva de *Aedes aegypti* (Valenzuela 2002), se llevó a cabo la separación de las mismas a partir de un gel SDS-PAGE en condiciones no reductoras (ver métodos).

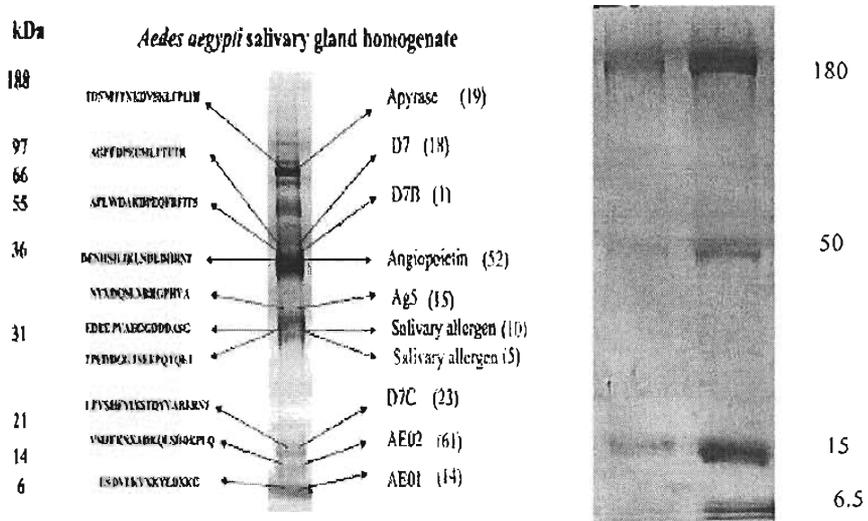


Fig. 19 A la derecha se muestra el patrón de bandas de proteínas obtenidas a partir de un extracto total de glándulas salivales de *Aedes aegypti* teñido con azul de Coomassie, los marcadores de peso molecular se muestran a la derecha de éste, mientras que a la izquierda se compara con un gel obtenido de un extracto de glándulas salivales del mismo mosquito, así como la secuencia aminoterminal de estas bandas. La concentración de proteínas obtenida del extracto total de glándulas salivales fue de 1.6  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , y en cada pozo se cargo 20 $\mu\text{l}$  de muestra diluida en un volumen de "sample buffer".

Podemos observar que en el homogenado de glándulas salivales se presentan 4 bandas principales que corresponden a los pesos de 180, 50, 15 y 6.5 KDa los cuales podrían corresponder a la apyrasa, a una proteína de la familia D7, así como dos proteínas con funciones desconocidas, sin embargo entre las bandas de 50 y 6.5 KDa existe una serie de proteínas que pudieran presentar la actividad de inhibición de agregación plaquetaria, retraso de la velocidad de polimerización e interacción con la molécula de trombina en el ensayo cromogénico.

## Purificación de posibles antagonistas de la trombina.

Con base a que desconocemos cual o cuales de las proteínas presentes en el gel podrían presentar las diferentes actividades biológicas encontradas; inhibición de plaquetas, retraso de la formación de la malla de fibrina, retraso en los tiempos de trombina, TTPA y TP, así como en los ensayos cromogénicos, en los cuales interviene la trombina, se llevó a cabo un fraccionamiento de la muestra total de glándulas salivales por medio de HPLC (cromatografía líquida de alta resolución) utilizando una columna de medida de exclusión, obteniendo 28 fracciones las cuales se evaluaron independientemente en los ensayos de agregación plaquetaria como escrutinio para continuar con los siguientes ensayos.

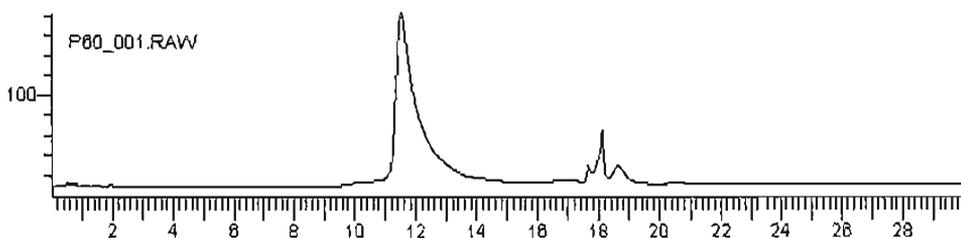


Fig. 20 Gráfica obtenida a partir del HPLC y del cual se obtuvieron 28 fracciones tomadas desde el minuto 10 y hasta el minuto 24. Las condiciones en las que fueron tomadas las fracciones se explican en los métodos.

De las fracciones analizadas nuevamente en los ensayos de agregación plaquetaria, 9 dieron una inhibición al menos del 50 % y de estas 4 fracciones agregaron por debajo de un 36% encontrando el mayor porcentaje de inhibición en la muestra que eludió al minuto 12 correspondiente a la fracción 5. En las siguientes figuras se muestran una fracción que no tuvo inhibición de la agregación, un ejemplo de inhibición no mayor del 70% y se presenta la grafica de la fracción 5.

Name Control con Buffer, Fraccion 24,25,26  
 ID 08/11/04 Date 11/09/104Hosp

Channel	1	2
Instrument	Opt	Opt
Reagent	Trombina 30ul 1000	Trombina 30ul 1000
Stirrer		
Gain		
Amplitude		
Slope	0	0
Comments		

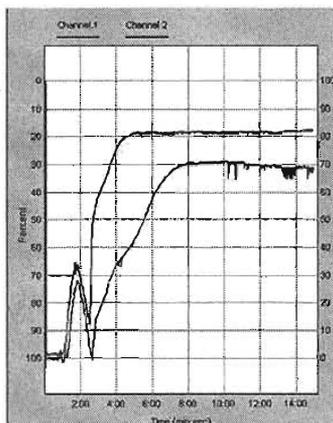


Fig. 21. Control de agregación plaquetaria de la fracción 24 tomada del HPLC, en ambos canales se muestra el porcentaje de agregación plaquetaria con buffer de disección sin HGS

Name fracción 24 HPLC, 15ul HGS  
 ID 08/11/04 Date 11/09/104Hosp

Channel	1	2
Instrument	Opt	Opt
Reagent	Trombina 30ul 1000	Trombina 30ul 1000
Stirrer		
Gain		
Amplitude		
Slope	0	0
Comments		

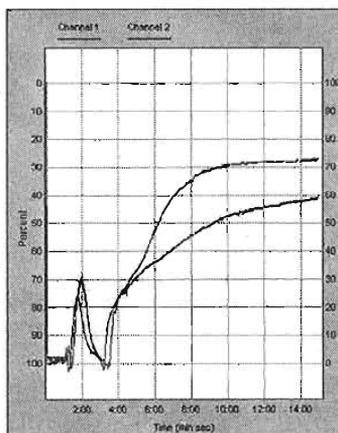


Fig. 22. Grafica que muestra el porcentaje de agregación plaquetaria de la fracción 24 con 15 µl de HGS

En las figuras 21 y 22 se muestran los porcentajes de inhibición semejantes a los que tuvieron 19 fracciones, las muestras con inhibición no mayor del 10 por ciento no se consideraron con actividad inhibitoria; se comparó el porcentaje de inhibición con el de la agregación de los controles tomando este valor como el 100 por ciento, y a partir de este se obtuvo el porcentaje de la agregación para cada una de las fracciones. De esta manera se obtuvo que la fracción 5 presenta la mayor actividad, ver tabla 9 y gráficas 25 y 26.

Tabla 9. Fracciones con mayor porcentaje de inhibición. Las marcadas en rojo son aquellas fracciones que inhibieron el porcentaje de agregación plaquetaria más de un 70 por ciento

Fracción	3	5	12	14	17	22	23	26	28
Min	11	12	15:30	16:30	18	20:30	21	22:30	23:30
% Agregación Plaquetaria	35.71	21.05	40.81	50	44.30	50	25	26.82	23.07

Name Control, Fraccion 3 HPLC  
 ID 31/08/04 Date 08/31/104Hosp

Channel	1	2
Instrument	Opt	Opt
Reagent	Trombina	Trombina
	30ul	30ul
Stirrer	1000	1000
Gain		
Amplitude		
Slope	0	0
Comments		

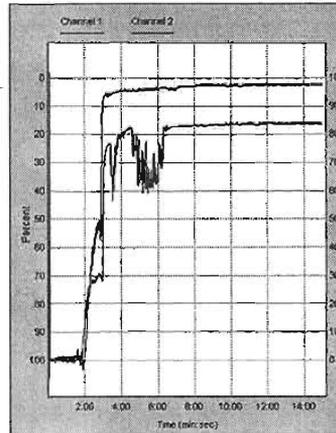


Fig. 23. Control de agregación plaquetaria de la fracción 3 tomada del HPLC, en ambos canales se muestra el porcentaje de agregación plaquetaria con buffer de disección sin HGS

Name HPLC fraccion 3, 15ul HGS  
 ID 31/08/04 Date 08/31/104Hosp

Channel	1	2
Instrument	Opt	Opt
Reagent	Trombina	Trombina
	30ul	30ul
Stirrer	1000	1000
Gain		
Amplitude		
Slope	0	0
Comments		

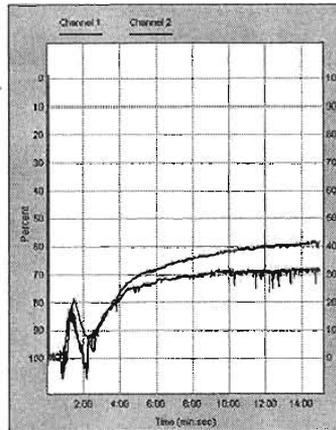


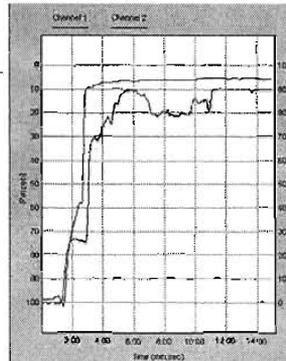
Fig. 24. Grafica que muestra el porcentaje de agregación plaquetaria de la fracción 3 con 15 µl de HGS

En la figura 24 se aprecia que en la fracción 3 existe un porcentaje de inhibición del 64.29%, sin embargo, si se compara con las figuras 25 y 26 y se toman en consideración los datos de la tabla 9, el porcentaje es menor al de la fracción 5 (78.95%), por lo que esta muestra fue seleccionada para llevar a cabo su purificación; con base a que fue la fracción que presento. En la figura 20 se pudo corroborar que la fracción 5 corresponde al mayor pico del cromatógrama resultante del HPLC.

Nombre control Fracción 4 y 5 HPLC  
ID 7/08/04 Date 08/07/104Hosp

Channel	1	2
Instrument	Opt	Opt
Reagent	Trombina	Trombina
Stamer	30ul	30ul
Gain	1000	1000
Amplitude	0	0
Slope	0	0

Comentarios



Nombre Fracción 5 HPLC, 15ul HGS  
ID 07/08/04 Date 08/07/104Hosp

Channel	1	2
Instrument	Opt	Opt
Reagent	Trombina	Trombina
Stamer	30ul	30ul
Gain	1000	1000
Amplitude	0	0
Slope	0	0

Comentarios

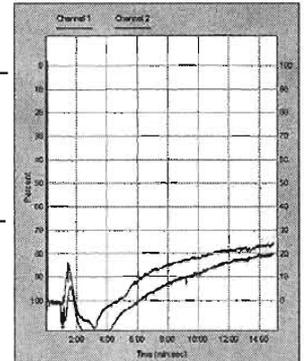


Fig. 25 y 26. Graficas de agregación plaquetaria control y con 15µl de la fracción 5 del HPLC obtenido de un extracto total de saliva de Aedes aegypti

En el apéndice B se muestra una gráfica que contiene el porcentaje de agregación plaquetaria de todas las fracciones, y se aprecia que las fracción 5 y 23 existen los mayores porcentajes de inhibición. Se considero únicamente la fracción 5 para su purificación por las razones anteriormente mencionadas. Los resultados obtenidos de los porcentajes de inhibición plaquetaria se hicieron por duplicado a partir de un pool de fracciones tomadas de 7 repeticiones de un HPLC (ver apéndice B).

## Ensayo de espectroscopía de masas

A partir de la matriz de datos obtenida del MALDI-ToF (tabla apéndice C) se obtuvo el alineamiento en la base de datos Mascot (obtenidos por espectroscopia de masas).

De las 38 secuencias buscadas 8 fueron las que presentaron valores de masas semejantes a una proteína sin función conocida de *Anopheles gambiae*. La secuencia de ésta proteína se muestra a continuación.

### Vista de la Proteína

Semejante a: Q5TMZ9 ANOGA Valor: 36 Expect: 27  
 ENSANGP00000026276 (Fragmento).- *Anopheles gambiae* str. PEST.

Masa Nominal (M<sub>r</sub>): 23361; Valor pI Calculado: 11.94  
 NCBI BLAST búsqueda de Q5TMZ9 ANOGA en contra de nr  
 Taxonomía: *Anopheles gambiae* str. PEST

Cortada por Tripsina:  
 Número de valores masas buscados: 38  
 Número de valores masas semejantes: 8  
 Porcentaje de la secuencia cubierto: 25%

Los péptidos semejantes se muestran en rojo.

1 SATPSVSLPP PSSSASRTPR SCRASPSPAR WKTSGALPAH ADTRPAPPAA  
 51 CHWPSPPSPC CAAPAPAPPS AAPHRRPTFS TAPSRCSPPS GCCSASAGSC  
 101 TSPSREHSSA RSRASVSSSS RDFAPGSSST FSRRSSASR FSFSLITSFE  
 151 ASQVRVSAAF RRPAPPRSSS GSTAPAPSRA PRSGCPRCGS SPPPARRSAP  
 201 ARADAFARAA SPGRSAPSPA STFPQRSTR T

Tabla 10. Secuencia semejantes a los valores masas de la fracción 5 del HGS de *Aedes aegypti*.

Inicio	-Final	Observado	Mr (exp.)	Mr (calc.)	Delta	Per.	Secuencia
24	- 30	685.51	684.50	684.36	0.15	0	R.ASPSPAR.W
122	- 134	1413.91	1412.90	1413.66	-0.76	1	
R.DFAPGSSSTFSRR.S							
135	- 140	594.40	593.39	593.28	0.11	0	R.SSSASR.F
157	- 161	552.17	551.17	550.29	0.88	0	R.SAAFR.R
180	- 187	842.60	841.59	842.42	-0.83	1	R.APRSGCPR.C
188	- 196	870.65	869.64	870.40	-0.76	0	
R.CGSSPPPAR.R							
197	- 202	657.43	656.42	656.37	0.05	1	R.RSAPAR.A
203	- 208	600.53	599.52	599.30	0.22	0	R.ADAPAR.A

Los valores de las masas peptídicas se muestran en la tabla 10, se indica el inicio y final en la secuencia de la proteína en *Anopheles gambiae*, así mismo se presenta el valor de las masas observadas y las masas calculadas para los aminoácidos de la secuencia de *A. gambiae*.

Tomando en consideración únicamente 11 valores de masas, 4 de éstos (marcados en amarillo en la matriz de datos del apéndice C) se asemejan a una secuencia péptida de *Aedes albopictus*, en particular a una proteína de la familia D7, presente en un gran número de mosquitos. Los valores de masas que se tomaron en consideración para este alineamiento fueron algunos de los más representados en el cromatograma de masas obtenido del MALDI-ToF (fig. 27), así como algunos valores que tuvieron similitud con masas péptidas de mosquitos. La secuencia se muestra a continuación.

### Vista de la Proteína

Semejante a: Q5MIW7\_AEDAL Valor: 29 Expect: 1.2e+02  
 Forma larga de D7Bclul salivary protein d711.- *Aedes albopictus*  
 (mosquito de día).

Masa Nominal M<sub>r</sub>: 38404; Valor pI Calculado: 8.87  
 NCBI BLAST búsqueda de Q5MIW7\_AEDAL en contra nr  
 Taxonomía: *Aedes albopictus*

Cortada por Tripsina:  
 Número de valores masas buscados: 11  
 Número de valores masas semejantes: 4  
 Porcentaje de la secuencia cubierto: 6%

Los péptidos semejantes se muestran en rojo.

```

1  MHSPKSFLLL AVVFVALRVT AAPLWNAKNP EQLQYIAARC MEEWSPKAKD
51 PKAALKNWME WKLQPSNEEA TQCYTKCML E NIGYYEPGEK RLKGVRVMMQQ
101 WETFNRYQSA DRNKVHDLTD TFDFIRPLKS SSCSDVFNAY KDVHAKHLET
151 IKAILFCDGK SAEKYKDKG KNVKQKGESI FVHCEEIHYP VGSPQRNELC
201 KVRKYELGTG KPFENLMECI FKGVRYFNDK NELNIDEIAR DFTQVGGKKPD
251 AVKAAMENCK SKTKETDPGK KAVEYKCLL ADSKVKKDFE EAFDYREIRS
301 KDYAQTITGK LKPYASDVR KEVNDIDSNK CV
  
```

Tabla 11. Secuencias de *Aedes albopictus* D7 semejantes a los valores masas de la fracción 5 de *Aedes aegypti*.

Inicio- Final	Observado	Mr (exp.)	Mr (calc.)	Delta	Per.	Secuencia
92 - 96	572.47	571.46	571.38	0.08	1	R. LKGV <b>R.V</b>
142 - 146	569.37	568.37	568.30	0.07	0	K. DVHAK <b>.H</b>
197 - 203	861.17	860.17	860.45	-0.29	1	R. NELCKV <b>R.R</b>
248 - 253	657.43	656.42	656.39	0.04	0	K. KPDAV <b>K.A</b>

No semejante a: 613.41, 640.66, 650.12, 656.13, 842.60, 899.62 y 1329.90

La tabla 11 muestran los valores masas provenientes de la fracción 5 que es similar a la secuencia de *Aedes albopictus*, un mosquito muy relacionado a *Aedes aegypti*. Con estas secuencias péptidicas se procedió a realizar una búsqueda de semejanza en un banco de cDNA de glándulas salivales de *Aedes aegypti* (Valenzuela *et al* 2000), utilizando un alineamiento local como se mencionó en la metodología.

Del alineamiento local el mejor valor de similitud en tres de los cuatro péptidos lo tuvo una secuencia de glándulas salivales de *Aedes aegypti*, en particular la forma larga de la proteína D7B de este mosquito (los alineamientos locales se muestran en el apéndice D). La secuencia total de la proteína D7 y el alineamiento de los péptidos de *Aedes albopictus*, se muestran a continuación.

>Aedes\_aegypti\_long\_form\_D7Bclu1\_salivary\_protein\_mRNA,\_complete  
User Entered, 332 aa

```

Nombre: Aedes_aegypti_1  Longitud: 332 aminoácidos
      1
Aedes_aegypti_1  MFPPRKFLLS SFILAALHVT AAPLWDAKDP EQFRFITSRC MEDWYFPAKN      50
      51
Aedes_aegypti_1  PKAALQNWLG WKLEPSDDQA TQCYTKCVLE KIGFYEPGEK RFKGVRVMRQ      100
      101
Aedes_aegypti_1  WETFNKYLNA DREKVHDLTS TDFEIPPLKS SSCSEVFEAF KKVHGKHSET      150
      151
Aedes_aegypti_1  IRAILFGKGE SSKKYYQEKI IKIKQKGQSV FMHCEALNYP KGSPQRKDLC      NELC
      201
Aedes_aegypti_1  KVR EIRKYQMGSG IVFGRHMECI FKGLRYMTSK NELDVDEIAR DFIEVKKKPD      KPD
      251
Aedes_aegypti_1  AVK ALKAMMTCK ANLKEKNAGK IAVHYRCLM NDSKVTNDFK EAFDYREVRS      300
      301
Aedes_aegypti_1  KDYFAALTGK LKPYSRSDVR KQVDDIDKIQ CS      332

```

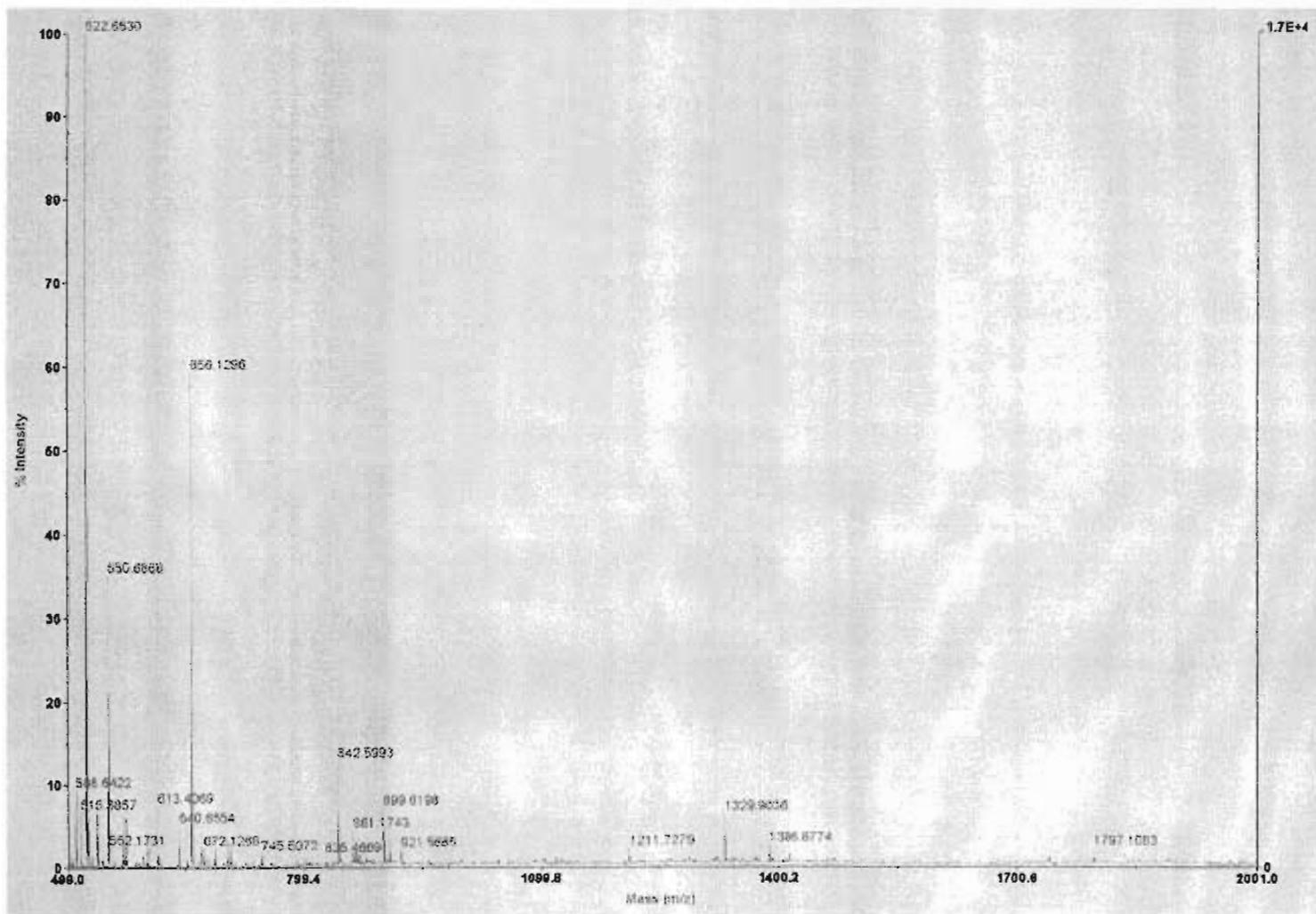


Fig 27. Cromatograma obtenido de la fracción 5 (HPLC) mediante MALDI-ToF en el eje de las x se muestra el valor de las masas peptidicas, mientras que en el eje de las y la intensidad de estos péptidos, los valores que no se tomaron en consideración para la comparación en Mascot, son de la matriz (ver apéndice C)

En la secuencia de la proteína D7B de *Aedes aegypti* se marcan en rojo los aminoácidos iguales entre esta secuencia y la D711 de *Aedes albopictus*, mientras que en azul se marcan los aminoácidos conservados.

Considerando la similitud de las masas péptidicas obtenidas del MALDI-Tof con la secuencia D7 de *Aedes aegypti*, se considera a esta proteína como posible candidata a llevar a cabo las funciones en las actividades de inhibición de agregación de plaquetas, retraso de la formación de la malla de fibrina, retraso en los tiempos de trombina, TTPA y TP, así como en los ensayos cromogénicos. Con base a la posible función de esta proteína, se llevó a cabo un alineamiento local de su secuencia tanto con proteínas implicadas en la inhibición de la trombina como con serino proteasas de distintos organismos (apéndice E). De la lista de inhibidores de trombina los que presentaron mayor similitud con un valor de E< de 5 se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 12. Mejor alineamiento de secuencia de inhibidores o serpinas a la secuencia D7 de *Aedes aegypti*, se muestran únicamente los mejores valores con base al algoritmo de Smith-Waterman.

Secuencia (No. aa/nt)	s-w	bits	E(30)
Serpina <i>Manduca sexta</i>	82	31	<u>0.0024</u>
Inhibidor de serino proteasas <i>Manduca sexta</i>	74	28	<u>0.02</u>
<i>Aedes aegypti</i> serina/treonina ( 528)	70	25	<u>0.11</u>
Antitrombina <i>Hirudomedicinalis</i> ( 72)	50	21	<u>0.3</u>
Antichimiotripsin <i>Bómbix mori</i> ( 375)	63	23	<u>0.34</u>
Inhibidor de serino proteasa <i>Mamestra</i> ( 392)	57	21	<u>1.8</u>
Inhibidor de serino proteasa <i>Caenorhabditis elegans</i> ( 366)	55	20	<u>2.6</u>
Serpina <i>Manduca sexta</i> ( 395)	54	20	<u>3.9</u>
<i>Aedes aegypti</i> _30_kDa_salivary_gland_allergen_Aed_ ( 253)	50	19	<u>4.3</u>
antithrombin_[ <i>Homo sapiens</i> ]_BAC21176.1_[AB083707] ( 122)	44	18	<u>4.4</u>

Con base a la tabla 12 se muestra que el mejor alineamiento es con dos proteínas tipo serpinas pertenecientes a *Manduca sexta*.

Para evaluar los residuos de aminoácidos conservados dentro de la proteína D7 de *Aedes aegypti* y las moléculas con función anti-trombina, se llevó a cabo un alineamiento con el programa ClustalX. En los alineamientos encontramos mayor similitud con 2 serpinas, una inhibidora de trombina y con la heparina. En la siguiente figura se esquematiza solo una parte del alineamiento y se muestran los residuos conservado entre las cinco secuencias.

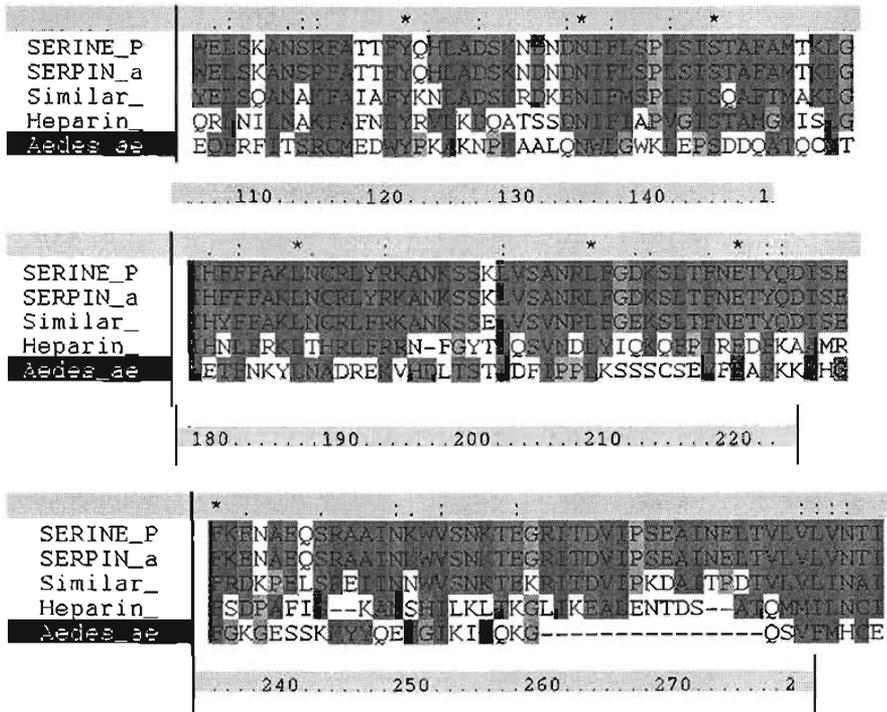


Fig. 28 Alineamiento local realizado por medio del paquete ClustalX; en la parte superior de éste se marca con un \* los aminoácidos iguales y con : los residuos conservados.

De la similitud de las secuencias observada en la gráfica 28, se decidió obtener la composición de aminoácidos y el perfil de hidrofobicidad tanto de la proteína D7 de *Aedes aegypti* como de una molécula antitrombina.

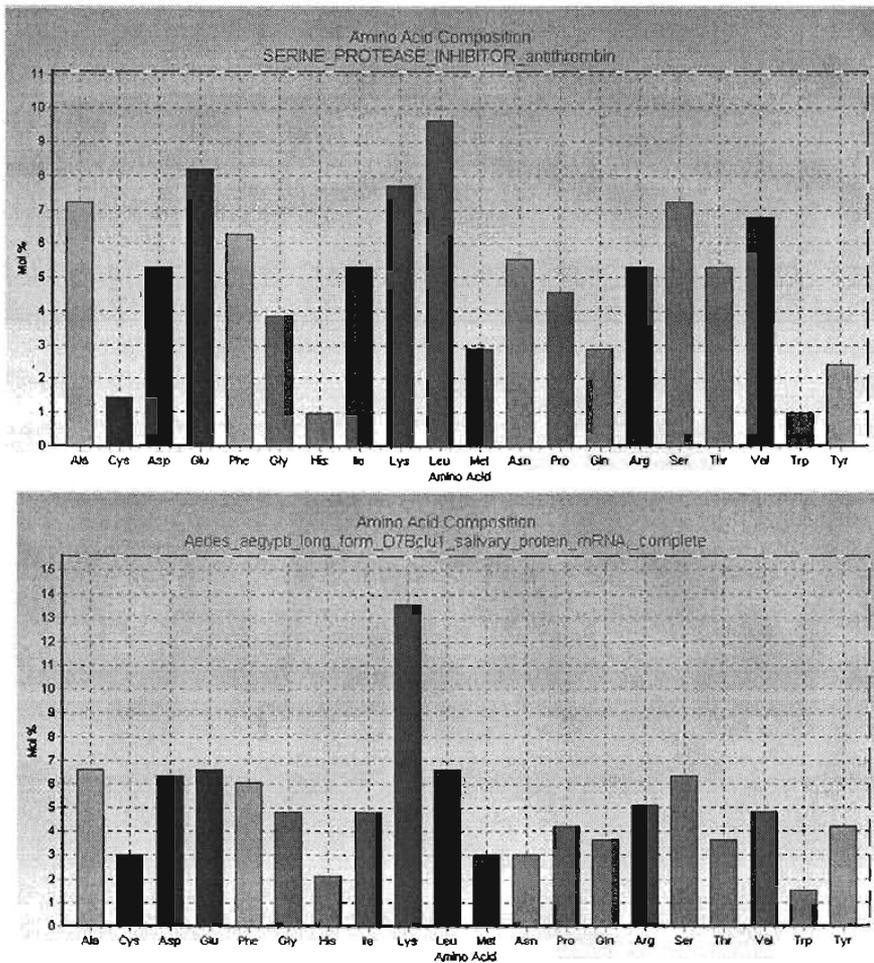


Fig. 29 comparación de la composición de los aminoácidos de la proteína D7 de *Aedes aegypti* y de una molécula antitrombina.

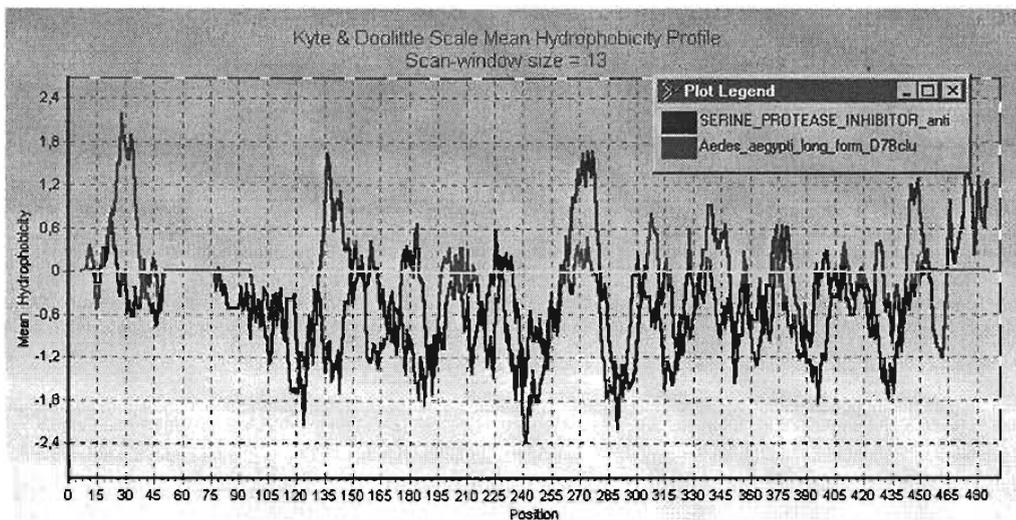


Fig. 30. Comparación del perfil de hidrofobicidad de un inhibidor de trombina, así como de la proteína D7 de *Aedes aegypti*.

Tomando en consideración la similitud en el perfil hidrofóbico se llevó a cabo un alineamiento entre ambas secuencias, así como la predicción de sus estructuras secundarias (con ayuda de la herramienta GOR 4), estos alineamientos se pueden ver en el apéndice F.

## DISCUSIÓN

La secreción de las glándulas salivales de algunos invertebrados hematófagos, contiene moléculas biológicamente importantes, que entre algunas otras funciones inducen una inhibición del sistema hemostático de los mamíferos, el cual presenta tres principales líneas de defensa: la vasoconstricción, la agregación plaquetaria y la coagulación sanguínea. Algunos de los efectos de inhibición, ocurren debido a que la saliva de los organismos hematófagos presenta moléculas que se parecen a las enzimas del sistema hemostático del huésped.

Varios de estos componentes ya se han caracterizado, observando que algunas de las proteínas activas de las secreciones salivales de los organismos hematófagos tienen secuencias de aminoácidos o pesos moleculares similares a las enzimas de los mamíferos. Se conoce que algunas de estas enzimas han evolucionado para ayudar a los organismos hematófagos en el proceso de alimentación, mientras que en otros pudiera ser parte del mecanismo de defensa (Markwardt; 1994a, 1994b y 1996).

Los componentes de las secreciones salivales de los organismos hematófagos más estudiados son los que intervienen en contra de la trombina, el factor X (FX), la función plaquetaria y el mecanismo fibrinolítico. En algunas especies de invertebrados se han encontrado, en el fluido salival del mismo organismo, diferentes moléculas dirigidas en contra de varias reacciones enzimáticas que controlan el sistema hemostático de los mamíferos. Por ejemplo entre los grupos más estudiados se encuentran las sanguijuelas, las cuales presentan actividades en contra de diferentes reacciones enzimáticas en la cascada de coagulación sanguínea de los mamíferos algunas de las proteínas implicadas en el sistema hemostático se han identificado en varias especies de sanguijuelas (Wallis, 1996).

En la sanguijuela *Hirudo medicinalis* se han identificado a las siguientes proteínas; el hirudin el cual es una antitrombina (Fareed *et al*, 1988), la destabilasa cuya función es convertir la fibrina insoluble a fibrina soluble, el calin que es un inhibidor de la función plaquetaria, el hirustasin un inhibidor de kallikrein y el piyavit que es una mezcla de inhibidores de los factores XI y XII y el cual así mismo presenta una actividad del tipo de la destabilasa (Wallis, 1996). Sin embargo, las sanguijuelas no son los únicos organismos que presentan estas actividades. En la tabla 13 del apéndice F se muestran algunos de los inhibidores de la trombina en diferentes organismos.

En los mosquitos también se han caracterizado proteínas involucradas tanto en la inhibición de factores de la cascada de coagulación como en contra de agonistas implicados en la agregación de plaquetas. En *Anopheles albimanus* se ha descrito un inhibidor de la trombina denominado anophelina, que es un péptido de 6.5-KDa, el cual inhibe a la trombina mediante su interacción tanto con el sitio catalítico como con el exosito I de esta molécula (Francischetti *et al*, 1999). La anophelina es una enzima de inhibición no competitiva con la trombina la cual es considerada como la enzima más importante de la coagulación.

*Aedes aegypti* es un mosquito considerado como uno de los principales vectores hematófagos transmisores de enfermedades tropicales, transfiriendo a los agentes patógenos durante la ingesta de sangre, favoreciendo a su vez la inducción de diferentes actividades en contra del proceso hemostático. En la saliva de estos mosquitos se han encontrado dos vasodilatadores conocidos como sialokinina I y II, así como un inhibidor de la agregación plaquetaria (apirasa) y un anticoagulante dirigido en contra del FXa, este anti-FXa presenta un peso molecular de 47.8 KDa con una cadena peptídica de 419 aminoácidos, el cual funciona como un inhibidor reversible no competitivo (Ribeiro, 1992; Champagne y Ribeiro, 1993; Valenzuela, *et al* 1999; Stark y James, 1998).

Previo a la identificación del anti-FXa (AFXa), ya se había intentado (sin tener éxito) aislar algunas moléculas en *Aedes aegypti* involucradas en la inhibición de proteínas de la cascada de coagulación (Metcalf, 1945). Sin embargo, en la especie homóloga, *Aedes comunis*, (*A. intrudens*, *A. punctor*, *A. stictius*, *A. cinereus*, *A. excrucians*) se encontró un péptido denominado DeG, el cual tiene un peso molecular de 22 KDa, y presenta actividad amidolítica frente a un sustrato cromogénico tanto para la trombina como para el fibrinogeno, liberando al fibrino péptido A (Huang, 1971; Kunz, 1996).

La dificultad para localizar moléculas que participen en el sistema hemostático de los mamíferos en las glándulas salivales de *Aedes aegypti*, pudiera deberse a la utilización de sangre total no depletada de plaquetas, ya que en sangre depletada de plaquetas se han podido identificar anticoagulantes en *Anopheles Stephensi* y *A. freeborni* (Waidhet-Kouadio *et al* 1998).

En 1995 Stark y James demostraron que existe actividad anticoagulante en el extracto de glándulas salivales de *A. aegypti*, percibiendo inhibición tanto en la vía intrínseca como en la vía extrínseca de la cascada de coagulación. Sin embargo, no encontraron un retraso en el tiempo de trombina (TT), por lo que bajo sus condiciones experimentales el homogenado de glándulas salivales (HGS) de *Aedes aegypti* no ejerció efecto alguno de inhibición directo hacia la trombina. En el presente trabajo demostramos que efectivamente existe un retraso tanto en el TTPA como en el TP cuando el HGS se incubaba durante cinco minutos previo a la adición de los reactivos para cada ensayo (ver métodos). En esta mezcla se observa un alargamiento considerable tanto en el TP como en el TTPA. El aumento para el TP con respecto a los controles fue de 1.55 mientras que para el TTPA fue de 8.2. En el TT existió un retraso incluso mayor

al presentado por los TTPA y TP con un incremento de 14.7 segundos con respecto al control.

Las diferencias en el TP y TTPA podrían deberse en gran medida al anti-FXa y no a una molécula que interactúe con la trombina. Sin embargo, con base a que en el ensayo de TT se mide únicamente el tiempo de coagulación dependiente de trombina, se puede decir que si este se ve afectado es por una molécula presente en el HGS que pudiera estar interactuando con la trombina.

Con base en lo anterior evaluamos la actividad del HGS en presencia de un sustrato cromogénico específico para la trombina. Así mismo, tomando en cuenta que la trombina no solamente esta involucrada en el proceso de coagulación, decidimos llevar a cabo un ensayo para evaluar la actividad anticoagulante mediada por la formación de complejos con la trombomodulina (TM) y la activación de la proteína C (PC) a nivel de la membrana de células endoteliales (ver métodos), este complejo holoenzimático (TM-TB-PC) actúa sobre un sustrato cromogénico para proteína C activada. Sin embargo la trombina también es capaz de hidrolizar al mismo sustrato, por lo que la actividad de trombina fue inhibida utilizando a la hirudina (un inhibidor de la trombina). En nuestros ensayos el HGS sustituyó a la hirudina (como el inhibidor de la trombina). Encontramos que la inhibición en presencia del HGS fue similar al ensayo con hirudina, es decir, el HGS esta interactuando de manera análoga a ésta enzima. Así mismo, observamos que en ausencia tanto de la hirudina como del HGS, la actividad amidolítica del sustrato cromogénico aumenta (ver pagina 32). Sin embargo, como no se pueden controlar variables como el número de complejos holoenzimáticos formados, la disponibilidad de trombomodulina o la actividad de trombina libre, paralelamente llevamos a cabo ensayos *in vitro* (en ausencia de células endoteliales) utilizando el sustrato cromogénico en presencia de trombina y el HGS sustituyendo a la hirudina.

Observamos una disminución (similar a los resultados en la superficie endotelial) en la actividad amidolítica de la trombina hasta en un 50% (ver figura 18).

Para evaluar la diferencia entre los tiempos de trombina, calibramos el reactivo para el ensayo de TT (con NaCl) a un tiempo control entre 19 y 22 segundos y a partir de estas lecturas se obtuvieron los tiempos con el HGS. Así mismo, en estos ensayos es importante determinar los equivalentes de pares de glándulas salivales y la concentración de proteína en el HGS (Valenzuela et al 2002), con base en esto, en el presente ensayo utilizamos un equivalente de 32.4 pares de glándulas salivales (PGS) (1 µg de proteína equivale a 0.4 pares de glándulas), para los TT, TTPA y TP. Esta cantidad es mayor que la utilizada por Stark y James (1995) en estudios similares, por lo que los hallazgos con respecto al alargamiento en el tiempo de trombina pudieran deberse a la cantidad de PGS utilizadas.

Los TP, TTPA, TT, así como la evaluación de la vía anticoagulante de la proteína C no fueron en los únicos ensayos en los que se demostró la participación del HGS en funciones en donde interviene la trombina ya que en un ensayo de agregación de plaquetas mediado por trombina, se pudo observar una clara disminución del porcentaje de agregación en presencia del HGS respecto al control, utilizando una cantidad equivalente a 3.2 pares de glándulas, las cuales fueron suficiente para inhibir el porcentaje de agregación plaquetaria hasta en un 80%. Cabe mencionar que en estos ensayos no interviene el ADP como agonista por lo que la apirasa no esta involucrada en este proceso, no obstante, estos porcentajes se compararon con los obtenidos a partir de un ensayo de agregometría utilizando ADP como agonista. Con la misma cantidad de pares de glándulas utilizadas en los ensayos tanto con trombina como con ADP, observamos una mayor disminución del porcentaje en la agregación plaquetaria en presencia de trombina como agonista, por lo que aumentamos la dosis a un equivalente

de 6.48 pares de glándulas para obtener un porcentaje de inhibición con ADP equivalente al producido por la trombina.

A pesar de que la trombina es un agonista más potente que el ADP para la agregación plaquetaria, existe un mayor porcentaje de inhibición en presencia de trombina (cuando se agregan el mismo número de pares de glándulas) que con ADP. Así mismo, observamos que la molécula presente en el HGS que inhibe a la trombina como agonista es más potente que la apirasa, utilizando la misma equivalencia en pares de glándulas. La inhibición podría llevarse a cabo tanto de manera directa con la trombina como a través de los receptores activados por proteasas (PARs) específicos para esta enzima, los cuales están presentes en la membrana de las plaquetas (Dugina, 2002).

Con base a que la trombina es una molécula clave en el proceso pro-coagulante evaluamos su actividad en la formación de la malla de fibrina, mediante ensayos de velocidad de polimerización de fibrina (VPF), en los cuales observamos que existe un retraso en la VPF en presencia del HGS, y que éste aumenta al incrementar la dosis de pares de glándulas salivales (9.72 pares de glándulas salivales). De acuerdo a los resultados obtenidos, sugerimos la existencia de una molécula presente en el HGS la cual tiene una actividad inhibitoria de la trombina en varias de sus funciones. Con base en lo anterior; llevamos a cabo la caracterización de la misma. A partir de un extracto total de 700 pares de glándulas salivales de *Aedes aegypti* se analizaron diferentes fracciones proteicas obtenidas mediante ensayos de HPLC (obtenidas en una columna de exclusión de peso molecular en un intervalo de 1000 a 20000 Da). A partir del minuto 10 al 24 se obtuvieron 28 fracciones, las cuales fueron analizadas de manera independiente en los ensayos de agregación plaquetaria. De las distintas fracciones la

número cinco fue en la que obtuvimos un mayor porcentaje de inhibición plaquetaria. Esta muestra fue utilizada para su caracterización mediante espectroscopia de masas.

A partir de una evaluación de espectroscopia de masas (MALDI-ToF) de la fracción 5 del HPLC, se obtuvieron cuatro péptidos que se relacionaron a una proteína de glándulas salivales de *Aedes albopictus*, y en particular con la proteína d711, la cual es un miembro de la familia de proteínas D7 (aunque las bases de datos de valores de masas consultadas, no cuentan con información de *Aedes aegypti* se encontró relación con una especie homóloga). Mediante un alineamiento local de estos péptidos con un banco de cDNA (Valenzuela *et al* 2002) de las glándulas salivales de *Aedes aegypti*, obtuvimos el mejor valor de alineamiento con la forma larga de la proteína D7B de este mosquito.

En *Aedes aegypti* James y col en 1991 identificaron por primera vez las proteínas salivales de la familia D7. Estas están relacionadas a las proteínas de unión a odorantes, las cuales son péptidos con una estructura tridimensional característica y adaptadas para unir pequeños ligandos (Steinbrecht, 1998). Se ha propuesto que las proteínas D7, de los insectos hematófagos, sirven como anti-hemostáticos por unirse a agonistas de la hemostasia (Arca *et al* 2002). Sin embargo, aunque las proteínas D7 están dentro de las más abundantes de las glándulas salivales en las hembras de mosquitos, aun se desconoce su papel en la alimentación sanguínea (Valenzuela *et al* 2002).

Ribeiro *et al* 2003, mencionan que éstas proteínas pueden funcionar mediante su unión con agonistas inflamatorios o hemostáticos, o bien favoreciendo la liberación de algunos componentes farmacológicos de bajo peso molecular de las glándulas salivales del insecto a la piel, ya que en su secuencia, contienen un péptido señal que indica su secreción. Isawa *et al* 2002, reportaron la única proteína D7 con función conocida, que

pertenece al *Anopheles stephensi*, llamada hamadarin, la cual inhibe la activación de los sistemas de contacto del plasma por unirse al factor XII y a la precalicreina, ambos implicados en la vía intrínseca de la cascada de coagulación, previniendo tanto la formación de bradiquinina como la activación de la vía de coagulación intrínseca.

Valenzuela y col (2002b), reportaron que el mecanismo de inhibición de las proteínas D7 podría no ser enzimático o mediado por receptores, así mismo, que los mosquitos pudieran requerir de 1 a 10  $\mu\text{M}$  (la concentración normal de mediadores fisiológicos como la histamina, serotonina o ADP cuando se satura algunos de sus receptores comunes), o concentraciones entre 0.015 y 0.150  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de proteína al alimentarse en el área de la picadura, aunado a esto se ha inferido que el sitio en donde se alimentan los mosquitos hay un volumen de 10  $\mu\text{l}$ , por lo que se requeriría de .015 a 1.5  $\mu\text{g}$  de proteína para llevar a cabo su función. Esto contrasta con la actividad de los componentes que se unen a los receptores celulares tal como el maxadilán (vasodilatador salival), el cual es activo a concentraciones nanomolares (Moro y Lerner, 1997).

Se sabe que las proteínas D7 representan del 10 hasta el 50% del total de las proteínas presentes en las glándulas salivales de los mosquitos y que en las glándulas de *Anopheles*, hay  $\sim 1\mu\text{g}$  de proteína. Si una proteína particular D7 abarcara tan solo el 10% de la glándula, se necesitarían 150 pares de glándulas salivales por ml en un bioensayo para detectar una actividad particular (Valenzuela *et al* 2002b). Estas cantidades de PGS son mucho mayores de lo que generalmente se han usado en tales ensayos. Estos cálculos pudieran ayudar a explicar porque las funciones de estas proteínas permanecen desconocidas.

En nuestro estudio utilizamos un equivalente a 32.4 pares de glándulas salivales para la evaluación de los tiempos de trombina, tomando en cuenta que las glándulas

salivales de los mosquitos tienen un contenido de proteína entre 1 y 2.5  $\mu\text{g}$  (Marianotti *et al.*, 1990; Nascimento *et al.*, 2000; Ribeiro *et al.*, 1985) y que las proteínas D7 representan del 10 al 50 % del contenido de las glándulas salivales, y que la mitad de las proteínas son transferidas durante la alimentación, podemos decir que gran parte de la cantidad de proteína D7 presente en estos pares de glándulas esta presente en los ensayos en donde interviene la trombina, y que estos pares de glándulas son suficientes para modificar la actividad de la trombina durante la formación del coágulo, y que con tan sólo 9.72 pares de glándulas se logró inhibir su función hacia el fibrinógeno en ensayos *in vitro* (en los ensayo de VPF). De acuerdo a lo anterior, podríamos proponer que una proteína de la familia D7 (D7B) puede estar involucrada en los diferentes procesos en donde interviene la trombina y que junto con el AFXa ayudaría a la alimentación exitosa del mosquito *Aedes aegypti*. Como se mencionó anteriormente, el FXa junto con el FVa forman el complejo protrombinasa cuya función es generar trombina (300 000 veces más rápido que con el FXa sólo), si este complejo se interrumpe, no se genera gran parte de la trombina. Sin embargo, si el AFXa no es suficiente como para impedir que su sustrato genere aunque sea una pequeña cantidad de trombina, entonces la molécula D7 contrarrestaría las funciones de la trombina y su posible retroalimentación al impedir que se formen los factores V, X, IX, VIII y XI, así como su función al interactuar con el fibrinógeno, formar la malla de fibrina y solidificarla al activar al factor XIII. Los procesos en la cascada de coagulación en los que interviene la trombina son muchos y si no se inhibe a esta enzima se dificulta la ingesta de alimento por el mosquito.

Inhibir a la trombina para los mosquitos no solo implica resolver el problema de la coagulación, sino también regula las vías en donde participa esta enzima, por ejemplo, la inhibición de la trombina impide la agregación plaquetaria dependiente de

este agonista y por lo tanto no hay liberación de ADP, serotonina y tromboxano otros de los agonistas de la agregación plaquetaria (Lawrence 2003).

Sin embargo, no solo se presenta actividad sobre las plaquetas puesto que en células endoteliales, la trombina induce la liberación del factor de Von Willebrand, P selectina y la producción de quimiocinas, a través de las que hay unión de plaquetas y leucocitos a la superficie de las células endoteliales (Coughlin, 2000; O'Brien *et al* 1999). Así mismo, la presencia de la trombina en las células musculares provoca vasoconstricción y regula la producción de citocinas.

Inhibir a la trombina, no solo le permite al mosquito alimentarse de manera exitosa sino también indirectamente impide la agregación plaquetaria, induce una vasoconstricción así como la liberación de moléculas implicadas en la inflamación.

Con base en lo anterior proponemos que la proteína D7B puede jugar un papel importante para impedir las estrategias desarrolladas por los mamíferos para contrarrestar la pérdida de sangre y la invasión de organismos patógenos. Sin embargo, es necesario determinar el posible mecanismo de acción de la proteína D7 con la molécula de trombina. Ya que la trombina cuenta con un sitio catalítico y dos exositos de unión a distintas moléculas es factible que D7 pueda interactuar en algunos de estos sitios con la trombina.

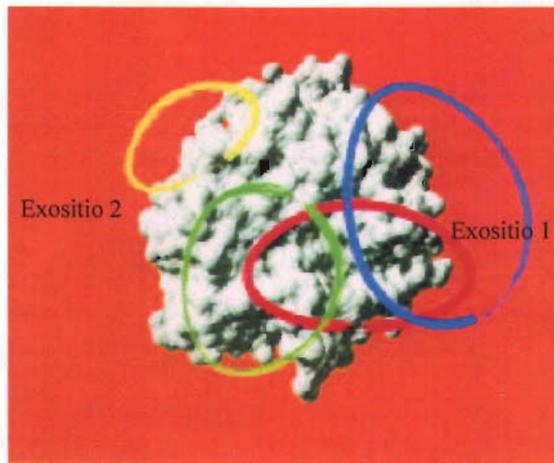


Fig. 31. Se muestra la molécula de trombina con sus principales sitios de interacción a sus substratos; modificado de Di Cera (2003). Rojo. Sitio de unión a fibrina y fibrinógeno, PAR 1, Hirudina  
Azul. Sitio de unión a trombomodulina  
Amarillo. Sitio de unión a heparina  
Verde. Sitio de unión a proteína C

Es conocido que la trombina cuenta con varios sitios de acoplamiento a diversas moléculas y con base en esto se han catalogado a sus inhibidores (Fig. 31). La heparina (un inhibidor indirecto) se une al exosítio 2 favoreciendo la formación de un puente con la antitrombina manteniendo en estrecho contacto a ambas moléculas, sin embargo, no se une al exosítio 1 lugar en el que interacciona con el fibrinógeno, por lo que la trombina unida a la fibrina es resistente a la inactivación por heparina (Narayanan *et al* 2001). Para la molécula D7 al parecer no ocurre lo anterior ya que en los ensayos de velocidad de polimerización de fibrina observamos un retraso en la formación de la malla de fibrina y esto sólo ocurriría si estuviera interactuando en éste sitio. Así mismos, se sabe que el exosítio 1 es el mismo lugar en el que la trombina interactúa con los PARs, por lo que la inhibición de la agregación plaquetaria también se vería afectado si D7 se uniera al exosítio 1. Sin embargo, existen moléculas como la Bivalirudina (Kam *et al* 2005) que tiene la capacidad de interactuar tanto con el sitio activo, como con el exosítio 1.

Sería necesaria evaluar si la proteína D7B presenta la capacidad de unirse con ambos sitios de la trombina.

Con base a la presencia mayoritaria de las proteínas D7 en las glándulas salivales de los mosquitos, y en especial en las hembras, es posible asociar las funciones de estas proteínas con la alimentación sanguínea. El ¿cómo? y ¿en donde? nos indicarían la relevancia de éstas. Este trabajo contribuye a elucidar una red de sospechas de las interacciones de estas proteínas en la relación con el huésped. Así mismo, se abre la posibilidad de su utilización como una herramienta alternativa de anticoagulación especialmente en pacientes que sufren de trombocitopenia inducida por heparina, por otra parte se colabora con la proteómica de uno de los principales vectores de enfermedades tropicales.

## CONCLUSIONES

- En el homogenado de las glándulas salivales del mosquito *Aedes aegypti* existe una molécula que presenta una actividad de antiagregante plaquetario mediado por trombina la cual mostró un porcentaje de inhibición del 80% (con un equivalente a 3.4 pares de glándulas), y cuya actividad es dependiente de la concentración. La inhibición mostrada por el HGS fue equivalente al obtenido en presencia de hirudina.
- El HGS presenta una actividad inhibitoria en la formación del coágulo de fibrina mediado por trombina, ésta actividad es dependiente de la dosis.
- En el HGS está (n) presente (s) una (s) molécula (s) que induce (n) un retraso en los Tiempos de Protrombina, Tromboplastin Parcial Activado, y más evidente en el Tiempo de Trombina, en presencia de 32.4 pares de glándulas salivales.
- A nivel del endotelio vascular existe una inhibición de la actividad de la trombina, en presencia del HGS, a través de la vía anticoagulante de la proteína C.
- Durante la caracterización de esta (s) molécula (s) se pudieron identificar mediante HPLC 4 fracciones (que eluyeron en el minuto 11 y 12 así como en el minuto 21 y 23) que presentan actividad de anti agregante plaquetario mediado por trombina.

- Mediante estudios de espectroscopía de masas, a partir de la fracción 5 del HPLC del HGS, se identificaron masas de iones peptídicos relacionados con la familia de proteínas D7 en particular con la proteína d11 de *Aedes albopictus*.
- Las masas de los iones obtenidas del MALDI-ToF se relacionaron con la forma larga de la proteína D7B de *Aedes aegypti*.
- Se propone a la proteína D7B como el inhibidor de la trombina, en distintas vías en donde tiene actividad esta enzima.

## REFERENCIAS

Abebe M, Cupp M, Ramberg F, Cupp E. Anticoagulant activity in salivary gland extracts of black flies (Diptera: Simuliidae). *J Med Entomol* 1994; 31: 908-11

Arca B., Lombardo F., Lanfrancotti A., Spanos L., Veneri M., Louis C & Coluzzi M. 2002. A cluster of four D7-related genes is expressed in the salivary glands of the African malaria vector *Anopheles gambiae*. *Insect Molecular Biology* 11: 47-55

Arocas V., Zingali R.J., Guillin M.C., Bon C., & Jandrot-Perrus M. 1996. Bithrombin: A Potent Two-Site-Directed Thrombin Inhibitor. *Biochemistry*. 35: 9083-9089

Berntsen B. T, Champagne D. E., Coleman J. L., Campos Y. A. & James A. A. 1999. Characterization of the Sialokinin I gene encoding the salivary vasodilator of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Molecular Biology* 8: 459-67

Bode W., Turk D., & Karshikov, A. 1992. The refined 1.9-Å X-ray crystal structure of D-Phe-Pro-Arg chloromethylketone-inhibited human  $\{\alpha\}$ -thrombin: Structure analysis, overall structure, electrostatic properties, detailed active-site geometry, and structure-function relationships. *Protein Sci.* 1: 426-471.

Cadroy Y., Diquélou A., Dupouy D., Bossavy J.P., Sakariassen K.S., Sié P y Boneu B. 1997. The thrombomodulin/Protein C/ Protein S anticoagulant pathway modulates the thrombogenic properties of the normal resting and stimulates endothelium. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 17: 520-527.

Champagne D.E., Smartt C.T., Ribeiro J.M., & James A.A. 1995. The salivary gland-specific apyrase of the mosquito *Aedes aegypti* is a member of the 5'-nucleotidase family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 92: 694-698

Champagne E y Ribeiro J. Sialokinin I and II: Vasodilatory tachykinins from the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. 1994. *Proc Natl Acad Sci USA*. 91: 138-42

Clements, Alan Neville. 1992 The biology of mosquitoes Edt. London Chapman and Hall. 509 pag.

Coughlin S. R. 2000. How the protease thrombin talks to cell. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96: 11023-027

Di Cera E. 2003. Thrombin interactions. CHEST. 124:11S-17S

Dugina T. N., Kiseleva E. V., Chistov I. V., Umarova B. A., & Strukova S. M. 2002. Receptors of the PAR Family as a Link between Blood Coagulation and Inflammation. Biochemistry (Moscow). 67: 65-74.

Fareed J, Walenga J, Breddin K, Markwardt F, Hoppenstead D. 1988. Development of hirudin as an antithrombotic agent: some practical considerations. Haemostasis. 18: 133

Francischetti I.M., Valenzuela J.G., & Ribeiro J.M. 1999. Anophelin: Kinetics and Mechanism of Thrombin Inhibition. Biochemistry. 38: 16678-16685

Fuentes-Prior P, Noeske-Jungblut C, Schleuning W, Huber R, Bade W. Structure of the trombin complex with Triabin, a lipocalin-like exosite-binding inhibitor derived from a triatomide bug . Proc Natl Aca Sci USA 2001; 11845-50

Gubler D.J., 1998. Dengue and dengue hemorrhagic fever. Clinical Microbiology Reviews. 11: 480-496

Harrington L.C., Edman J.D., & Scott T.W. 2001. Why do female *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) feed preferentially and frequently on human blood?. Journal of Medical Entomology. 38: 411-422

Hawkins R., 1966. Factors affecting blood clotting from salivary glands and crop of *Glossina austensi*. Nature; 212: 738-9

Huang C. Vertebrate serum inhibitors of *Aedes aegypti* trypsin. Insect Biochem 1971; 1: 27-38.

Ibáñez S. B. & Gómez H.D.. 1995. Los vectores del dengue en México. Salud pública de México. 37: s53-s63

Isawa H., Yuda M., Orito Y & Chinzei Y. 2002. A mosquito salivary protein inhibits activation of the plasma contact system by binding to factor XII and high molecular weight kininogen. J Biol Chem. 277: 27651-8

James A. A., Blackmer K., Marinotti O., Ghosn C. R. & Racioppi J. V. 1991. Isolation and characterization of the gene expressing the major salivary gland protein of the female mosquito, *Aedes aegypti*. Molecular and Biochemical Parasitology. 44: 245-54

Kam P.C., Kaur N & Thong C.L. 2005. Direct thrombin inhibitors: pharmacology and clinical relevance. Anaesthesia. 60: 565-74

Kunz A. Resolution and properties of the proteinases in adult *Aedes aegypti*. Insect Biochem 1978; 8: 169-175

Lawrence F. B. Trombin and platelet activation 2003; 124: 18s-25s

Mann K. G. 2003. Thrombin formation CHEST. 124: 4s-10s

Mann K. G., Brummel k. & Butenas S. 2003. What is all that thrombin for?. Journal of thrombosis and haemostasis. 1:1504-1514

Marianotti O., James A. A. & Ribeiro J.M. 1990. Diet and salivation in female *Aedes aegypti* mosquitoes. Journal of Insect physiology 36: 545-48

Martinez M, Quintana G, Fernández R, Kasper C. Hemofilia 2001 ed. Prado pp 414

Markwardt F. Aantitrombotic agents from hematophagus animals. Clin Appl Thromb Hemostas 1996; 2: 75-82

Markwardt F. Coagulation inhibitors from animal feeding on blood. Rev Iberoamer Tromb Hemos 1994a; 7: 225-31.

- Markwardt F. Coagulation inhibitors from blood sucking animals. A new line of developing antithrombotic drugs. *Pharmazie* 1994b; 49: 313-6
- Metcalf R.L. 1945. The physiology of the salivary glands of *Anopheles quadrimaculatus*. *Journal of insect physiology* 36: 545-548
- Michelson A. D. 2003. How platelets work: platelet function and dysfunction. *Journal of thrombolysis*. 16: 7-12
- Monroe D.M., Hoffman M. & Roberts H.R. 1996 Transmission of a procoagulant signal from tissue factor-bearing cell to platelets. *Blood coagulation & Fibrinolysis* 7: 459-64
- Moro O. & Lemer E.A. 1997. Maxadilan, the vasodilator from sand flies, is a specific pituitary adenylate cyclase activating peptide type I receptor agonist. *J Biol Chem*. 272: 966-70.
- Nascimento E.P., Dos Santos Malafrente R. & Marinotti O. 2000. Salivary gland proteins of the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Arch Insect Biochem Physiol*. 43: 9-15.
- Narayanan A. S. & Thiagarajan P. 2001. Thrombin. *Encyclopedia of life sciences*. Pag 1-7
- Parker M, Mant M, Effects of Tsetse (*Glossina morsitans morsitans* Westw). (Díptera: Glossinidae) salivary gland homogenate on coagulation and fibrinolysis. *Tromb Haemost* 1979; 42: 743-51
- Pearson, W. R. (1999). Flexible similarity searching with the FASTA3 program package. In *Bioinformatics Methods and Protocols*, S. Misener and S. A. Krawetz, ed. (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 185-219.

Pereira M, Souza M, Vargas A, Martins M, Penido C, Diotaiuti L. Anticoagulant activity of *Triatoma infestans* and *Panstrongylus megistus* saliva (Hemiptera/triatominae). *Acta Trop* 1996; 61: 225-61

O'Brien P. J., Prevost N., Molino M., Hollinger K. M., Woolkalis J. M., Woulfe S. D. & Lawrence F. B. 2000. Thrombin responses in human endothelial cells. *The journal of biological chemistry*. 18:13502-509

Reddy C, Suvamakumari G, Devi C, Reddy CN. Pathology of scorpion venom poisoning. *J Trop Med Hyg* 1972;75: 98-100.

Ribeiro J.M. 1987. Role of arthropods saliva in blood feeding. *Ann Rev Entomol*. 32: 463-478.

Ribeiro J.M. 1992. Characterization of a vasodilator from the salivary glands of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *Journal of Experimental Biology*. 165: 61-71

Ribeiro J.M. 1995. Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? *Infect Agents Dis*. 4: 143-52.

Ribeiro J.M. 2000. Blood-feeding in mosquitoes: probing time and salivary gland anti-haemostatic activities in representatives of three genera (*Aedes*, *Anopheles*, *Culex*). *Med. Vet. Entomol*. 14: 142-148

Ribeiro J.M., Rossignol P.A., & Spielman A. 1984. Role of mosquito saliva in blood vessel location. *Journal of Experimental Biology*. 108: 1-7

Ribeiro J.M., Rossignol P.A., & Spielman A. 1985. Salivary gland apyrase determines probing time in *Anopheline* mosquitoes. *Journal of Insect Physiology*. 31: 689-92

Ribeiro J.M., Charlab R., & Valenzuela J.G. 2001. The salivary adenosine deaminase activity of the mosquitoes *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti*. *Journal of Experimental Biology*. 204: 2001-2010

Ribeiro J.M., & Francischetti I.M. 2003. Role of arthropod saliva in blood feeding:

Sialome and Post-Sialome Perspectives. *Annu. Rev. Entomol.* 48: 73-88.

Steinbrecht R. A. 1998. Odorant-binding proteins: expression and function. *Ann N Y Acad Sci.* 30:323-32.

Smartt CT, Kim AP, Grossman GL, James AA. The Apyrase gene of the vector mosquito, *Aedes aegypti*, is expressed specifically in the adult female salivary glands. *Exp Parasitol.* 1995 Nov;81(3):239-48.

Stark, F.E., & James A.A. 1998. Isolation and characterization of the gene encoding a novel factor Xa –directed anticoagulant from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Journal of biological chemistry.* 273: 20802-20809

Valenzuela J. G. 2002. High-throughput approaches to study salivary proteins and genes from vectors of disease. *Insect Biochemistry and molecular biology.* 32: 1199-1209

Valenzuela J. G. 2005. Blood –feeding Arthropod salivary glands and saliva. En *Biology of disease vectors.* Edt. Elsevier second edition pag 377

Valenzuela J.G., Francischetti I.M., & Ribeiro J.M. 1999. Purification, Cloning, and Synthesis of a Novel Salivary Anti-thrombin from the Mosquito *Anopheles albimanus*. *Biochemistry.* 38: 11209-11215

Valenzuela JG., Belkaid Y., Garfield M., Mendez S., Kamhawi S., Rowton ED., Sacks DL & Ribeiro JM. 2001 Toward a defined anti-Leishmania vaccine targeting vector antigens: characterization of a protective salivary protein. *J Exp Med.* 194: 331-42.

Valenzuela J.G., Pham V.M., Garfield M.K., Francischetti I.M., & Ribeiro J.M. 2002. Toward a description of the sialome of the adult female mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology.* 32: 1101-1122.

Valenzuela JG, Charlab R, Gonzalez EC, de Miranda-Santos IK, Marinotti O, Francischetti IM, Ribeiro JM. 2002b. The D7 family of salivary proteins in blood sucking diptera. *Insect Mol Biol.* 2: 149-55.

Van de Locht, Lambda D, Bauer M, Huber R, Friedrich T, Kröger B, Höfken W, Bode W. Two heads are better than one: crystal structure of the insect derived double domain kazal inhibitor rhodniin in complex with thrombin. *EMBO J* 1995; 14: 5149-57

Waidhet-Kouadio P., Yuda M., Ando K & Chinzei Y. 1998. Purification and characterization of a thrombin inhibitor from the salivary glands of a malarial vector mosquito, *Anopheles stephensi*. *Biochimica et Biohysica Acta.* 1381: 227-33

Wallis R. 1996 Hirudins: from leeches to man. *Semin Thromb Hemost.* 22: 185-196

Wikel S. 1996. Host immunity to ticks. *Ann Rev Entomol.* 41: 1-22

Otros recursos

<http://workbench.sdsc.edu/>

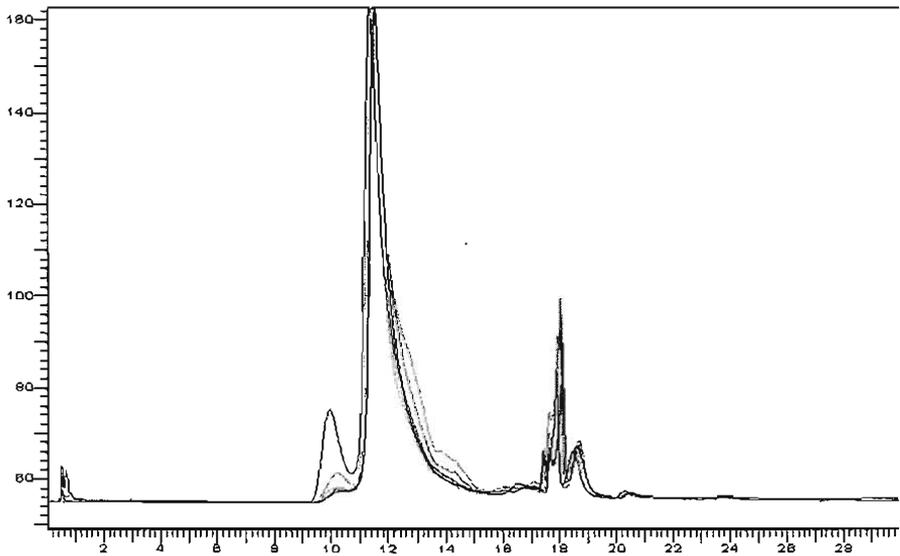
[http://www.matrixscience.com/search\\_form\\_select.html](http://www.matrixscience.com/search_form_select.html)

## Apéndice A: Pares de glándulas salivales equivalentes

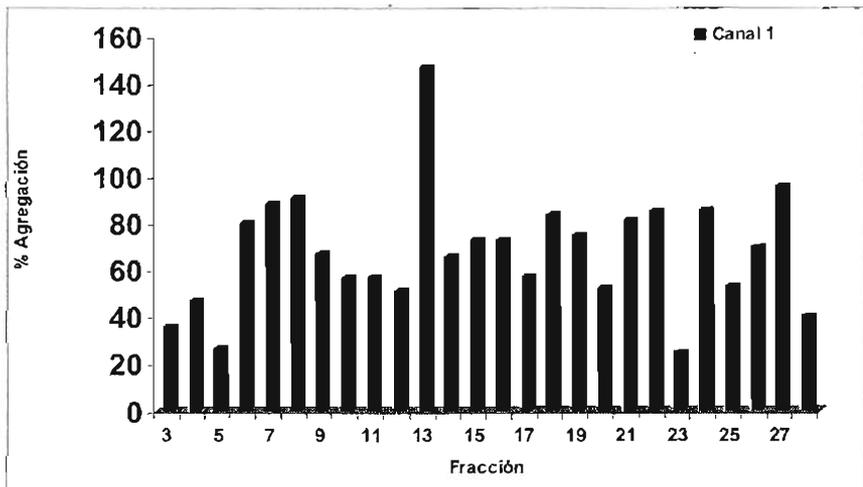
1 µg	0.4 pares de glándulas	Ribeiro 1985	Stark y James 1998
1.5	0.6 pares de glándulas		
2	0.8 pares de glándulas		
2.5	1 par de glándulas		
1.62	0.64 pares de glándulas		
8.1	3.24 pares de glándulas	en 5 µl	
16.2	6.48 pares de glándulas	en 10 µl	
24.3	9.72 pares de glándulas	en 15 µl	
1.62 µg	en 20 pares de glándulas		
8.1 µg	en 100 pares de glándulas		
10 µg de un HGS de 100 pares para TT, TTPA y TP	81 µg	equivalente a 32.4 pares de glándulas	

La concentración total de proteínas del HGS se midió por dos ensayos; micro BCA y Bradford (ver métodos), la comparación a equivalentes de glándulas salivales, se llevó a cabo como en las citas mencionadas, tomando en consideración que 0.4 pares de glándulas salivales equivalen a 1 µg de proteína; y comparando este valor con nuestros valores de cuantificación.

## Apéndice B: Porcentajes de agregación HPLC



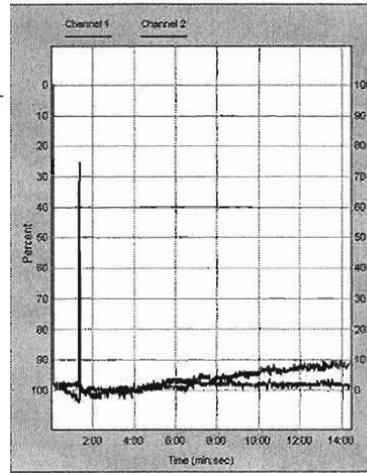
Grafica de las fracciones obtenidas en el HPLC, los distintos colores muestran distintas repeticiones realizadas.



Porcentaje de agregación plaquetaria para cada una de las fracciones obtenidas de las repeticiones del HPLC

Name HGS,  
ID control tromb Dane 05/21/200#0sp.

Channel	1	2
Instrument	Opt	Opt
Reagent	trombina	trombina
Stirrer	1000	1000
Gain		
Amplitude		
Slope	0	0
Comments		



Porcentaje de agregación plaquetaria control sin agonista ni tratamiento alguno.

### Apéndice C: Valores masas MALDI-ToF.

508.642171	600.531334	861.174255
515.385740matriz	613.406905	864.576796
522.222474	640.655355	867.177663
522.653013matriz	650.118062	870.650889
525.346501	656.129579	877.157622
529.228053	657.428709	899.619814
536.661723	668.698280	907.337909
537.400071	672.126813	921.568532
550.686845matriz	685.509558	1211.727875
552.173114	701.481457	1329.902565
568.191263	705.201473	1386.877413
569.372433	745.507155	1413.909664
572.468667	825.466866	1797.108347
594.395677	842.599256	

Se muestran en amarillo los valores de las masas péptidicas que se asemejan a la secuencia de la proteína D7 de *Aedes albopictus* y *A. aegypti*.

## Apéndice D: Péptidos

>Aedesegyptifrac4572.47  
LKGVR LEU LYS GLY VAL ARG

> Aedesegyptifrac4569.37  
DVHAK ASP VAL HIS ALA LYS

> Aedesegyptifrac4860.17  
NELCKVR ASN GLU LEU CYS LYS VAL ARG

>Aedesegyptifrac4657.43  
KPDVAK LYS PRO ASP ALA VAL LYS

### • >Aedesegyptifrac4 – 0

#### Secuencias con mejor score:

Secuencia (No. aa/nt)	s-w	bits	E(39)
Aedes_aegypti_long_form_D7Bclu1_salivary_protein_ ( 332)	27	16	<u>0.81</u>
gi_18568292_gb_AAL76016.1_AF466593_1 putative 56. ( 530)	26	16	<u>1.4</u>
gi_18568302_gb_AAL76021.1_AF466598_1 putative sec ( 566)	26	16	<u>1.4</u>
Aedes_aegypti_salivary_purine_nucleosidase_mRNA,_ ( 338)	25	15	<u>1.6</u>
gi_18568288_gb_AAL76014.1_AF466591_1 putative lys ( 144)	22	13	<u>2.9</u>
gi_18568286_gb_AAL76013.1_AF466590_1 putative car ( 636)	23	15	<u>4.1</u>
gi_18568300_gb_AAL76020.1_AF466597_1 putative sec ( 580)	22	14	<u>5.4</u>
_AAL76011_Reports_putative_7.8_kDa_...[gi:185682 ( 171)	20	12	<u>5.9</u>
Aedes_aegypti_blood_meal-induced_protein_(MRRG)_m ( 829)	22	15	<u>6.2</u>
Aedes_aegypti_isolate_AEA_CLU58_putative_chymotry ( 288)	20	13	<u>7.4</u>

#### Alineamientos con mejor similitud:

#### >>Aedes\_aegypti\_long\_form\_D7Bclu1\_salivary\_protein\_mRNA, (332 aa)

s-w opt: 27 Z-score: 75.6 bits: 16.3 E(): 0.81  
Smith-Waterman score: 27; 80.000% identity (80.000% ungapped)  
in 5 aa overlap (1-5:92-96)

```

Aedesa                                LKGVR
                                     . . . . .
Aedes_
KLEPSDDQATQCYTKCVLEKIGFYEPGEKRFKGVVRVMRQWETFNKYLNADREKVHDLTST

```

```

          70          80          90          100          110          120
Aedes_
FDFIIPPLKSSSCSEVF EAFKVKVHGKHSETIRAILFGKGESSKKYYQEKGIKIKQKQSVF
          130          140          150          160          170          180

```

**>>gi\_18568292\_gb\_AAL76016.1\_AF466593\_1 putative 56.5 kDa (530 aa)**

s-w opt: 26 Z-score: 71.3 bits: 16.1 E(): 1.4  
 Smith-Waterman score: 26; 60.000% identity (60.000% ungapped)  
 in 5 aa overlap (1-5:112-116)

```

Aedesa                                LKGVR
                                     :::.
gi_185
VMDSLVEAGSPITFQGLSNVARISSGDVGRAFKGIRDDISYAVDLHEEHISLVDASRGVLG
          90          100          110          120          130          140

gi_185
NATADYFEGLLGKLVGNLMNITELLNIIQS AVVQIQVMPRNOAAVNALLPNSDIKALNA
          150          160          170          180          190          200

```

**>>gi\_18568302\_gb\_AAL76021.1\_AF466598\_1 putative secreted (566 aa)**

s-w opt: 26 Z-score: 71.1 bits: 16.2 E(): 1.4  
 Smith-Waterman score: 26; 60.000% identity (60.000% ungapped)  
 in 5 aa overlap (1-5:142-146)

```

Aedesa                                LKGVR
                                     :::.
gi_185
HTSEKASATIAKLKEDIKKLDEEVGTLHEKLGKIQDFEKVKRDLCVTYLNSNQMSKAKA
          120          130          140          150          160          170

gi_185
KLKEMASTYLIEIVQQQLNKSANIMPMLFSAAIPLDDMG EAYKEIYKFLEEQRLEG
          180          190          200          210          220          230

```

**>>Aedes\_aegypti\_salivary\_purine\_nucleosidase\_mRNA,\_compl (338 aa)**

s-w opt: 25 Z-score: 70.3 bits: 15.3 E(): 1.6  
 Smith-Waterman score: 25; 75.000% identity (75.000% ungapped)  
 in 4 aa overlap (2-5:23-26)

```

Aedesa                                LKGVR
                                     :::.
Aedes_
MLHLVGLLLLLTYAVAVPLPCSEKGI RRVIIDQDGGGDDGWALLMMLMNEKKYNVVVEAIT
          10          20          30          40          50          60

```

**ESTA TESIS NO SALE  
 DE LA BIBLIOTECA**

>>gi\_18568288\_gb\_AAL76014.1\_AF466591\_1 putative lysozyme (144 aa)

s-w opt: 22 Z-score: 65.5 bits: 13.2 E(): 2.9  
Smith-Waterman score: 22; 75.000% identity (75.000% ungapped)  
in 4 aa overlap (2-5:135-138)

```
Aedesa                                LKGVR
                                      :...
gi_185 NDITKAVNCANKVFARHGYNAWYGWKSCKSKGVKDLSYCM
      110      120      130      140
```

>>gi\_18568286\_gb\_AAL76013.1\_AF466590\_1 putative carboxyl (636 aa)

s-w opt: 23 Z-score: 62.7 bits: 14.8 E(): 4.1  
Smith-Waterman score: 23; 40.000% identity (40.000% ungapped)  
in 5 aa overlap (1-5:66-70)

```
Aedesa                                LKGVR
                                      ...:
gi_185
PVDDPVVVFVRYVVGKSARVEGTRSRQTGLYSFRGIRYAEAPIGEYRFQRPTFKRLSGDVNA
   40           50           60           70           80           90

gi_185
INNGPPCPQPEPNNPYKVI GNEDCLLLNVFT PQMPDET TGLPVVVWIHGGGYRYGSAAY
  100      110      120      130      140      150
```

>>gi\_18568300\_gb\_AAL76020.1\_AF466597\_1 putative secreted (580 aa)

s-w opt: 22 Z-score: 60.4 bits: 14.3 E(): 5.4  
Smith-Waterman score: 22; 60.000% identity (60.000% ungapped)  
in 5 aa overlap (1-5:399-403)

```
Aedesa                                LKGVR
                                      :...:
gi_185
MERTELQYDPHPVDEVV RMYDESITALPDSLKNIR SCLKLVKIYNHV TNQCILATNEVED
370      380      390      400      410      420

gi_185
VNNSNPKFKSNVLGR RKLVTASNDCTPFRLEPSADKASIRIITPKGDAL TNINSIQPGL
430      440      450      460      470      480
```

>>\_AAL76011\_Reports\_putative\_7.8\_kDa\_...[gi:18568282]\_ (171 aa)

s-w opt: 20 Z-score: 59.6 bits: 12.3 E(): 5.9  
Smith-Waterman score: 20; 75.000% identity (75.000% ungapped)  
in 4 aa overlap (1-4:165-168)

```
Aedesa                                LKGVR
                                      :...:
_AAL76 CTCGEENGKKYTRYLP CNFGDTFSLEQQKCVKGVAKA
```

140 150 160 170

**>>Aedes\_aegypti\_blood\_meal-induced\_protein\_(MRRG)\_mRNA\_(829 aa)**

s-w opt: 22 Z-score: 59.1 bits: 14.5 E(): 6.2  
Smith-Waterman score: 22; 60.000% identity (60.000% ungapped)  
in 5 aa overlap (1-5:20-24)

```
Aedesa          LKGVR
                :...:
Aedes_
MRRTSRNSFNFDLSLRLLLQGARAARGSPPLGQRLCDVEKASGSSRDGGGPGSGSSSKHD
      10          20          30          40          50          60
```

**>>Aedes\_aegypti\_isolate\_AEA\_CLU58\_putative\_chymotrypsin-(288 aa)**

s-w opt: 20 Z-score: 57.7 bits: 12.7 E(): 7.4  
Smith-Waterman score: 20; 50.000% identity (50.000% ungapped)  
in 4 aa overlap (1-4:131-134)

```
Aedesa          LKGVR
                :...:
Aedes_
RGGSRLRVERFVIHPRYDRSLAANDIGLVQIKGIFLWLTNRVARLELGKDYDPPGTEATI
      110          120          130          140          150          160
Aedes_
TGWGGTLRSGGPLSDKLOYARLRVIDQRQCQALLPNIDAWNLCFTFTREGQGICGGDSGSP
      170          180          190          200          210          220
```

Fragmentos seleccionados

● **>Aedesaegyptifrac4 – 1**

**Secuencias con mejor valor:**

Secuencia (No. aa/nt)	s-w	bits	E(42)
Aedes_aegypti_apyrase_gene_complete_cds. ( 49)	19	17	<u>0.11</u>
gi_18568310_gb_AAL76025.1_AF466602_1 putative sec ( 85)	18	15	<u>0.76</u>
gi_18568308_gb_AAL76024.1_AF466601_1 putative sec ( 259)	24	16	<u>1</u>
gi_18568290_gb_AAL76015.1_AF466592_1 putative 8.3 ( 96)	17	14	<u>1.7</u>
Aedes_aegypti_apyrase_mRNA_complete_cds. ( 562)	27	16	<u>2.1</u>
gi_18568334_gb_AAL76037.1_AF466614_1 putative pro ( 413)	24	15	<u>3.5</u>
Aedes_aegypti_isolate_AEA_CLU4_putative_18.6_kDa_ ( 168)	18	13	<u>4.6</u>
gi_1856 8306_gb_AAL76023.1_AF466600_1 putative ser ( 296)	21	13	<u>5.4</u>

Aedes_aegypti_long_form_D7Bclul_salivary_protein_(332)	21	13	<u>7.3</u>
gi_18568322_gb_AAL76031.1_AF466608_1 putative 30 (215)	18	12	<u>8.6</u>
gi_18568284_gb_AAL76012.1_AF466589_1 putative sec (255)	19	12	<u>8.7</u>

## Secuencias con mejor similitud:

### >>Aedes\_aegypti\_apyrase\_gene\_complete\_cds.(49 aa)

s-w opt: 19 Z-score: 92.1 bits: 16.6 E(): 0.11  
 Smith-Waterman score: 19; 66.667% identity (66.667% ungapped)  
 in 3 aa overlap (1-3:47-49)

```

Aedes                               DVHAK
                                   :::
Aedes_ SVAVIARATDNMPANKDVSKLFPLTLIHINDLH
        20             30             40

```

### >>gi\_18568310\_gb\_AAL76025.1\_AF466602\_1 putative secreted (85 aa)

s-w opt: 18 Z-score: 76.8 bits: 14.5 E(): 0.76  
 Smith-Waterman score: 18; 75.000% identity (75.000% ungapped)  
 in 4 aa overlap (2-5:26-29)

```

Aedes                               DVHAK
                                   :::
gi_185
MKQQTVCILLALVLSAAYTDALVFVYAKTCSSCKAYGARYCGYGLNSKGYVSCDGATS
        10             20             30             40             50             60

```

### >>gi\_18568308\_gb\_AAL76024.1\_AF466601\_1 putative secreted (259 aa)

s-w opt: 24 Z-score: 74.5 bits: 15.7 E(): 1  
 Smith-Waterman score: 24; 60.000% identity (60.000% ungapped)  
 in 5 aa overlap (1-5:67-71)

```

Aedes                               DVHAK
                                   :::
gi_185
ACNGLSTLSRTCGAGSFEVALNRAQQQLIVDLHNKLRKSKVAMGQQKNSAGQRFFQQACRMA
        40             50             60             70             80             90

gi_185
TLQWDPELAHIAATNARRCVYGHDTFCRNTASMKFAGQNIKYYGWTFTNEQLLTGFIN
        100            110            120            130            140            150

```

### >>gi\_18568290\_gb\_AAL76015.1\_AF466592\_1 putative 8.3 kDa (96 aa)

s-w opt: 17 Z-score: 70.6 bits: 13.5 E(): 1.7

Smith-Waterman score: 17; 66.667% identity (66.667% ungapped)  
in 3 aa overlap (3-5:64-66)

```
Aedes                DVHAK
                   :::
gi_185
QDGGQNGPPSPVNVVTQLIQDIWQTITSAINHAQNSTASTSSNSSSSSSAASNSSSSANSTS
   40         50         60         70         80         90
gi_185 EGR
```

**>>Aedes\_aegypti\_apyrase\_mRNA,\_complete\_cds. (562 aa)**

s-w opt: 27 Z-score: 68.8 bits: 15.8 E(): 2.1  
Smith-Waterman score: 27; 60.000% identity (60.000% ungapped)  
in 5 aa overlap (1-5:47-51)

```
Aedes                DVHAK
                   ::::
Aedes_
SVAVIARATDNMPPNKDVSRLFPLTLIHINDLHARFEETNMKSNACTQKQDCIAGIARVY
   20         30         40         50         60         70
Aedes_
QKIKDLLKEYESKNPIYLNAGDNFQGLWYNLLRWNVTADEFIKKPKAAMTLGNHEFDHT
   80         90        100        110        120        130
```

**>>gi\_18568334\_gb\_AAL76037.1\_AF466614\_1 putative propheno (413 aa)**

s-w opt: 24 Z-score: 64.6 bits: 14.5 E(): 3.5  
Smith-Waterman score: 24; 60.000% identity (60.000% ungapped)  
in 5 aa overlap (1-5:147-151)

```
Aedes                DVHAK
                   ::: .
gi_185
CGGFVFPKGVFGGPIAEIDEFPWAALLFYRDVHHRCCGGSVISRTFVITAAHCLAGPSYTR
   120        130        140        150        160        170
gi_185
NGPLEMVRRLREYNTLSDPDCIVIPTDSGNFEECNEKRLDVLPKSIIIVHPDYDPSDVQYH
   180        190        200        210        220        230
```

**>>Aedes\_aegypti\_isolate\_AEA\_CLU4\_putative\_18.6\_kDa\_secre (168 aa)**

s-w opt: 18 Z-score: 62.2 bits: 12.8 E(): 4.6  
Smith-Waterman score: 18; 50.000% identity (50.000% ungapped)  
in 4 aa overlap (1-4:22-25)

```
Aedes                DVHAK
                   ...:
```

```

Aedes_
MKLQAI10AVALS20SAMLLIVAAEPDINAAEVEKAIHQQSEAFLES30IIYAAAGESQPDGSM40DVIE50

```

>>gi\_18568306\_gb\_AAL76023.1\_AF466600\_1 putative serine p (296 aa)

```

s-w opt: 21 Z-score: 60.9 bits: 13.4 E(): 5.4
Smith-Waterman score: 21; 80.000% identity (80.000% ungapped)
in 5 aa overlap (1-5:207-211)

```

```

Aedes_                               DVHAK
                                     :: ::
gi_185
SQIVPLARREWISG180NVTVTGWGKNSDGKVPDVLAKVVL190PVVNRKTCDFLWEG200LITDDMIC210
AGDSGSDSCDGD240SGGPAVQNGIQYGVSWGR250TVCCTALPGVYT260NIAHPAIRGE270FIKRTTMV280

```

>>Aedes\_aegypti\_long\_form\_D7Bclu1\_salivary\_protein\_mRNA, (332 aa)

```

s-w opt: 21 Z-score: 58.5 bits: 13.1 E(): 7.3
Smith-Waterman score: 21; 75.000% identity (75.000% ungapped)
in 4 aa overlap (2-5:143-146)

```

```

Aedes_                               DVHAK
                                     ::::
Aedes_
EKVHDLTSTFDFI120PPLKSSSCSEVFEAFK130VHGK140HSETIRAILFGK150GESSK160KYYQ170QERKIG
IKQKGGQSVFMH180CEALNYPK190GGSPQRKDLCEIR200KYQMGSGIVFGR210HMECI220FKGLRYMT230SKNE

```

>>gi\_18568322\_gb\_AAL76031.1\_AF466608\_1 putative 30 kDa a (215 aa)

```

s-w opt: 18 Z-score: 57.0 bits: 12.2 E(): 8.6
Smith-Waterman score: 18; 60.000% identity (60.000% ungapped)
in 5 aa overlap (1-5:61-65)

```

```

Aedes_                               DVHAK
                                     ::: :
gi_185
EEFQTQETTGSDE40KNGASEEPNADDASKPDDVEEK50GDDDTAKKEDD60GESKDGEGSEK70SDK80
EKGE100PKNDPRETYNKVIEQLDQIKVDNVEDGHERSELAADI110QRYLRNPIVDVIGSAG120DFS130

```

>>gi\_18568284\_gb\_AAL76012.1\_AF466589\_1 putative secreted (255 aa)

s-w opt: 19 Z-score: 56.9 bits: 12.4 E(): 8.7  
 Smith-Waterman score: 19; 75.000% identity (75.000% ungapped)  
 in 4 aa overlap (2-5:194-197)

```

Aedes                               DVHAK
                                   :::
gi_185
DSYPMSHSGPQIGHFTQMANDRAWKMGCSMVHYKNGRVIKYLLVCNYSMTNMIEEPIYTR
 170           180           190           200           210           220

gi_185
GSAGSKCQTGQNPQYRGLCSPREKVRSESYRG
 230           240           250
  
```

Fragmento seleccionado

- >Aedesaegyptifrac4 – 2

Secuencias con mejor valor:

Secuencia (No. aa/nt)	s-w	bits	E(48)
Aedes_aegypti_long_form_D7Bclu1_salivary_protein_ ( 332)	32	18	<u>0.44</u>
Aedes_aegypti_isolate_AEA_CLU61_putative_16.9_kDa ( 148)	30	16	<u>0.68</u>
gi_18568306_gb_AAL76023.1_AF466600_1 putative ser ( 296)	28	16	<u>1.6</u>
gi_18568300_gb_AAL76020.1_AF466597_1 putative sec ( 580)	28	17	<u>1.9</u>
Aedes_aegypti_isolate_AEA_CLU8_putative_18.2_kDa ( 158)	25	14	<u>3.6</u>
gi_18568288_gb_AAL76014.1_AF466591_1 putative lys ( 144)	24	13	<u>4.8</u>
gi_18568278_gb_AAL76009.1_AF466586_1 putative sec ( 255)	24	14	<u>5.6</u>
gi_18568312_gb_AAL76026.1_AF466603_1 putative cal ( 407)	24	14	<u>6.3</u>
Aedes_aegypti_serine/threonine_protein_kinase_Akt ( 528)	24	15	<u>6.7</u>
Aedes_aegypti_short_form_D7Cclu23_salivary_protei ( 149)	22	12	<u>9.1</u>
gi_18568302_gb_AAL76021.1_AF466598_1 putative sec ( 566)	23	14	<u>9.3</u>
gi_18568286_gb_AAL76013.1_AF466590_1 putative car ( 636)	23	14	<u>9.5</u>

Alineamientos con mejor Similitud:

>>Aedes\_aegypti\_long\_form\_D7Bclu1\_salivary\_protein\_mRNA, (332 aa)

s-w opt: 32 Z-score: 82.2 bits: 18.0 E(): 0.44  
 Smith-Waterman score: 32; 50.000% identity (50.000% ungapped)  
 in 6 aa overlap (2-7:198-203)

```

Aedesa                                NELCKVR
                                      .....
Aedes_
EKGIKIKQKQSVFMHCEALNYPKGSPPQRKDLCEIRKYQMGGIVFGRHMECIFKGLRYM
170      180      190      200      210      220

Aedes_
TSKNELDVDEIARDFIEVKKKPPDALKAMMKTKCANLKEKNAGKIAVHYYKCLMNSKVTN
230      240      250      260      270      280

```

**>>Aedes\_egypti\_isolate\_AEA\_CLU61\_putative\_16.9\_kDa\_sec (148 aa)**

s-w opt: 30 Z-score: 78.6 bits: 16.1 E(): 0.68  
 Smith-Waterman score: 30; 75.000% identity (75.000% ungapped)  
 in 4 aa overlap (4-7:41-44)

```

Aedesa                                NELCKVR
                                      :::.
Aedes_
YFSLVFCMCNAVSHFKNCADKQLSDDKPLQCKIRNLQVDGNMPKVKEYMNCAPFESSGWAK
      20      30      40      50      60      70

Aedes_
DGGKKLDTSKVAQDMVPGFNIKTELDEVTKECETEFGAEISSIDYLACLLIDEKTKTQF
      80      90      100     110     120     130

```

**>>gi\_18568306\_gb\_AAL76023.1\_AF466600\_1 putative serine p (296 aa)**

s-w opt: 28 Z-score: 71.9 bits: 15.9 E(): 1.6  
 Smith-Waterman score: 28; 60.000% identity (60.000% ungapped)  
 in 5 aa overlap (3-7:12-16)

```

Aedesa  NELCKVR
        ::..
gi_185
MFRSSQLVIGSLCAIRMRIVCLLLLLASLVDGNNQLTIQEVLARVHRTPPVLASVVARAT
      10      20      30      40      50      60

```

**>>gi\_18568300\_gb\_AAL76020.1\_AF466597\_1 putative secreted (580 aa)**

s-w opt: 28 Z-score: 70.5 bits: 16.6 E(): 1.9  
 Smith-Waterman score: 28; 71.429% identity (71.429% ungapped)  
 in 7 aa overlap (1-7:154-160)

```

Aedesa                                NELCKVR
                                      ::.::
gi_185
ARQKMQELKKDIATLEQNVNTLHRDLEGITDELGKVRMDLCLTYMESNQLSNAQDKVKRTL
      130     140     150     160     170     180

gi_185
APKYLMELVQFLNKSEKNWLPVVDLSVAIPDLDDRGQVYKTVHEFLKTKNRDGGEDSIL

```

190 200 210 220 230 240

**>>Aedes\_aegypti\_isolate\_AEA\_CLU8\_putative\_18.2\_kDa\_secres (158 aa)**

s-w opt: 25 Z-score: 65.4 bits: 13.8 E(): 3.6  
Smith-Waterman score: 25; 75.000% identity (75.000% ungapped)  
in 4 aa overlap (2-5:107-110)

```
Aedesa                               NELCKVR
                                     :::
Aedes_
TRHALNVLKRIANDLKTSGYPDRQNQIEEQIKLCKNIYDPLNAMNYLDCIALGRNSTKEI
  80      90      100      110      120      130

Aedes_
IAFIRKREPDFFNVFHCKGITL
  140      150
```

**>>gi\_18568288\_gb\_AAL76014.1\_AF466591\_1 putative lysozyme (144 aa)**

s-w opt: 24 Z-score: 63.0 bits: 13.2 E(): 4.8  
Smith-Waterman score: 24; 100.000% identity (100.000% ungapped)  
in 3 aa overlap (4-6:95-97)

```
Aedesa                               NELCKVR
                                     :::
gi_185
KNSNGSTDYGLFQINNKYWCSSAGFASGNDCCKVSCADLMTNDITKAVNCANKVFARHGYN
  70      80      90      100      110      120

gi_185
AWYGWKSKCSKGVKDLASYCM
  130      140
```

**>>gi\_18568278\_gb\_AAL76009.1\_AF466586\_1 putative secreted (255 aa)**

s-w opt: 24 Z-score: 61.8 bits: 13.8 E(): 5.6  
Smith-Waterman score: 24; 100.000% identity (100.000% ungapped)  
in 3 aa overlap (3-5:253-255)

```
Aedesa                               NELCKVR
                                     :::
gi_185 YSSWTWMEKPIYNGKACSKCKKCDKTYKSLCK
                230      240      250
```

**>>gi\_18568312\_gb\_AAL76026.1\_AF466603\_1 putative calretic (407 aa)**

s-w opt: 24 Z-score: 60.8 bits: 14.3 E(): 6.3

Smith-Waterman score: 24; 100.000% identity (100.000% ungapped)  
in 3 aa overlap (4-6:115-117)

```
Aedes_          NELCKVR
                :::
gi_185
SNKDDTLVIQFSVKHEQNIDCGGGYLKVFDCRVQKDLHGDSPLYLVMFGPDICGPGTKKV
  90      100      110      120      130      140

gi_185
HVIFSYKGNHNLINKDIRCKDDVYTHFYTLVVKSDNTYEVLIDNEKVESGSLEEDWDFLP
  150      160      170      180      190      200
```

**>>Aedes\_aegypti\_serine/threonine\_protein\_kinase\_Akt\_mRNA (528 aa)**

s-w opt: 24 Z-score: 60.3 bits: 14.6 E(): 6.7  
Smith-Waterman score: 24; 100.000% identity (100.000% ungapped)  
in 3 aa overlap (3-5:328-330)

```
Aedes_          NELCKVR
                :::
Aedes_
LHSHEIVYRDLKLENLLLDKDGHIKIADFGLCKEQITYGRRTTKTFCGTPPEYLAPEVLEDN
 300      310      320      330      340      350

Aedes_
DYGLAVDWWGTGVVMYEMMCGRLPFYNRDHDILFTLILMEEVKFPRISANARDLLAGLL
 360      370      380      390      400      410
```

**>>Aedes\_aegypti\_short\_form\_D7Cclu23\_salivary\_protein\_mRN (149 aa)**

s-w opt: 22 Z-score: 57.7 bits: 12.3 E(): 9.1  
Smith-Waterman score: 22; 75.000% identity (75.000% ungapped)  
in 4 aa overlap (1-4:38-41)

```
Aedes_          NELCKVR
                : : :
Aedes_
YLLGILFSLSMALFVSHFYICSTDYVARERNFLCHTANFKLVSLPPKGDEFDCCFQTSE
  10      20      30      40      50      60

Aedes_
WMDRGSRELKTNKVFVSDMKKYGFDKRKAIEKVVQSKTEMGDKINGWAYFRFCFVMDRKIS
  70      80      90      100     110     120
```

**>>gi\_18568302\_gb\_AAL76021.1\_AF466598\_1 putative secreted (566 aa)**

s-w opt: 23 Z-score: 57.5 bits: 14.2 E(): 9.3  
Smith-Waterman score: 23; 75.000% identity (75.000% ungapped)  
in 4 aa overlap (1-4:54-57)

```

Aedesa                               NELCKVR
                                     :: :
gi_185
NIFESELSKIDHVLRRHMEKPIYSEEQFASDNEECTNLLNGIHAQLRRLTQRYKLMNKGYV
      30          40          50          60          70          80

gi_185
KVEEYQRMADNYEKQLKTLNDELVELQQHTSEKASATIAKLKEDIKKLDEEVGTLHEKLV
      90          100         110         120         130         140

```

>>gi\_18568286\_gb\_AAL76013.1\_AF466590\_1 putative carboxyl (636 aa)

s-w opt: 23 Z-score: 57.3 bits: 14.3 E(): 9.5  
 Smith-Waterman score: 23; 40.000% identity (40.000% ungapped)  
 in 5 aa overlap (3-7:1-5)

```

Aedesa NELCKVR
      . . . .
gi_185
MCRNRLLIILAGLLLLLTVVKRCEAIVGGIRSAAPPVDDPVVFRVYVGKSARVEGTRS
      10          20          30          40          50

```

Fragmento seleccionado

• >Aedesaegyptifrac4 – 3

Secuencias con mejor valor:

Secuencia (No. aa/nt)	s-w	bits	E(47)
Aedes_aegypti_long_form_D7Bclul_salivary_protein_ ( 332)	36	21	<u>0.041</u>
gi_18568322_gb_AAL76031.1_AF466608_1 putative 30 ( 215)	28	17	<u>0.46</u>
gi_18568312_gb_AAL76026.1_AF466603_1 putative cal ( 407)	29	18	<u>0.58</u>
Aedes_aegypti_serine/threonine_protein_kinase_Akt ( 528)	26	16	<u>2.1</u>
gi_18568300_gb_AAL76020.1_AF466597_1 putative sec ( 580)	26	16	<u>2.2</u>
Aedes_aegypti_salivary_purine_nucleosidase_mRNA_ ( 338)	24	15	<u>2.7</u>
Aedes_aegypti_FXa-directed_anticoagulant_precurso ( 415)	24	15	<u>3.3</u>
Aedes_aegypti_clone_unKRc2_unknown_protein_(GI8)_ ( 335)	23	15	<u>3.8</u>
gi_18568292_gb_AAL76016.1_AF466593_1 putative 56. ( 530)	24	15	<u>4.1</u>
gi_18568302_gb_AAL76021.1_AF466598_1 putative sec ( 566)	24	15	<u>4.3</u>
Aedes_aegypti_isolate_AEA_CLU4_putative_18.6_kDa_ ( 168)	20	13	<u>5.7</u>
Aedes_aegypti_isolate_AEA_CLU30_putative_serpin_m ( 418)	22	14	<u>6.5</u>
Aedes_aegypti_isolate_AEA_CLU8_putative_18.2_kDa_ ( 158)	19	12	<u>7.5</u>
gi_18568334_gb_AAL76037.1_AF466614_1 putative pro ( 413)	21	14	<u>8.8</u>

## Alineamientos con mayor similitud:

### >>Aedes\_aegypti\_long\_form\_D7Bclu1\_salivary\_protein\_mRNA, (332 aa)

s-w opt: 36 Z-score: 100.4 bits: 21.1 E(): 0.041  
Smith-Waterman score: 36; 83.333% identity (83.333% ungapped)  
in 6 aa overlap (1-6:248-253)

```
Aedesa                                KPDAVK
                                         :::::
Aedes_
ECIFKGLRYMTSKNELDVDEIARDFIEVKKKPDALKAMMKTCANLKEKNAGKIAVHYHK
220      230      240      250      260      270

Aedes_
CLMNDISKVNTDFKEAFDYREVRSKDYFAALTGKLPYSRSDVRKQVDDIDKIQCS
280      290      300      310      320      330
```

### >>gi\_18568322\_gb\_AAL76031.1\_AF466608\_1 putative 30 kDa a (215 aa)

s-w opt: 28 Z-score: 81.6 bits: 17.0 E(): 0.46  
Smith-Waterman score: 28; 66.667% identity (66.667% ungapped)  
in 6 aa overlap (1-6:58-63)

```
Aedesa                                KPDAVK
                                         ::: ..
gi_185
GTSEEPQTQETTGSDEKNGASEEPNADDASKPDDVEEKGDGDDTAKKEDDGESKDGEGSEK
 30      40      50      60      70      80

gi_185
SDKEKGEKPNDFRETYNKVIEQLDQIKVDNVEDGHERSELAADIQRYLRNPIVIDVIGSAG
 90      100     110     120     130     140
```

### >>gi\_18568312\_gb\_AAL76026.1\_AF466603\_1 putative calretic (407 aa)

s-w opt: 29 Z-score: 79.8 bits: 17.6 E(): 0.58  
Smith-Waterman score: 29; 80.000% identity (80.000% ungapped)  
in 5 aa overlap (2-6:245-249)

```
Aedesa                                KPDAVK
                                         :::::
gi_185
KPEWDDRATIPDPDDTKPEDWPKPEHIPDPDATKPDWDDMDGWEPPMIDNPEYKGE
220      230      240      250      260      270

gi_185
WKPKQIDNPNYKGVVWHPEIDNPEYVEDKDLYLREEVCAVGLDLWQVKSGTIFDNFMITN
280      290      300      310      320      330
```

**>>Aedes\_aegypti\_serine/threonine\_protein\_kinase\_Akt\_mRNA (528 aa)**

s-w opt: 26 Z-score: 69.7 bits: 16.1 E(): 2.1  
Smith-Waterman score: 26; 75.000% identity (75.000% ungapped)  
in 4 aa overlap (1-4:63-66)

```
Aedesa                                KPDAVK
                                         :::
Aedes_
WLYKRGEHIKNWRSRYFILRDDGTLVGYKNRPDASFQAEPSSNNFTVRGCQIMSVDPRPF
      40          50          60          70          80          90

Aedes_
TFIIRGLQWTTVIERMFHVEEERERQEWVEAIRSVANRLTEAEAYQGSQSNNGDGDVEMAS
      100         110         120         130         140         150
```

**>>gi\_18568300\_gb\_AAL76020.1\_AF466597\_1 putative secreted (580 aa)**

s-w opt: 26 Z-score: 69.0 bits: 16.1 E(): 2.2  
Smith-Waterman score: 26; 60.000% identity (60.000% ungapped)  
in 5 aa overlap (2-6:396-400)

```
Aedesa                                KPDAVK
                                         ::::
gi_185
MMSMERTELOQYDPHPDEVVRMYDESITALPDSLKNIRSCCLKVKIYNHVNTQCILATNE
      370          380          390          400          410          420

gi_185
VEDVNNSNPKFKSNVLGRRRLVKVTASNDCTPFRLEPSADKASIRIITPKGDALTNINSIQ
      430          440          450          460          470          480
```

**>>Aedes\_aegypti\_salivary\_purine\_nucleosidase\_mRNA\_compl (338 aa)**

s-w opt: 24 Z-score: 67.4 bits: 15.0 E(): 2.7  
Smith-Waterman score: 24; 100.000% identity (100.000% ungapped)  
in 3 aa overlap (1-3:124-126)

```
Aedesa                                KPDAVK
                                         :::
Aedes_
SERLITPAPRRDVRNRYFWGVDGFGDVQFQSKPDLGNVPDEHAVVKMHELIRKYPRQISIL
      100          110          120          130          140          150

Aedes_
CLGPLTNLAMLFKMFPSVKSEIAGIYILGGNRNGVGNDFAAEFNFFTDPEANIVMNNA
      160          170          180          190          200          210
```

**>>Aedes\_aegypti\_FXa-directed\_anticoagulant\_precursor\_(AF (415 aa)**

s-w opt: 24 Z-score: 65.9 bits: 15.1 E(): 3.3

Smith-Waterman score: 24; 60.000% identity (60.000% ungapped)  
in 5 aa overlap (2-6:96-100)

```
Aedesa                                KPDAVK
                                     :: ..
Aedes_
QQLTVSTNPFASAAALSEQLKMYLRFNPKGKLPDLVRRRYSSQRAMLERENSFNTTTLAAVI
 70          80          90          100          110          120

Aedes_
GREKKTNSFWDLFNSCAIFVGLSLRPGSPKQMSRRFNAAMRNISKSGMQNFLSTSDIDRDL
 130          140          150          160          170          180
```

**>>Aedes\_aegypti\_clone\_unKRc2\_unknown\_protein\_(G18)\_mRNA,  
(335 aa)**

s-w opt: 23 Z-score: 64.7 bits: 14.5 E(): 3.8  
Smith-Waterman score: 23; 60.000% identity (60.000% ungapped)  
in 5 aa overlap (2-6:311-315)

```
Aedesa                                KPDAVK
                                     :::
Aedes_ KTVKIWNVAERQCLHTFEDHQDQVWGVKYSFDSSKVISVSEDRCVNLYDCPPNII
          290          300          310          320          330
          290          300          310          320          330
```

**>>gi\_18568292\_gb\_AAL76016.1\_AF466593\_1 putative 56.5 kDa (530  
aa)**

s-w opt: 24 Z-score: 64.2 bits: 15.1 E(): 4.1  
Smith-Waterman score: 24; 100.000% identity (100.000% ungapped)  
in 3 aa overlap (1-3:20-22)

```
Aedesa                                KPDAVK
                                     :::
gi_185
MLRLAVFSLLLIASVLSEPKPDLTPVPTITGVSTGSLDTNGNIVANVDRI L ATLNQFQSI
 10          20          30          40          50          60
```

**>>gi\_18568302\_gb\_AAL76021.1\_AF466598\_1 putative secreted (566  
aa)**

s-w opt: 24 Z-score: 63.7 bits: 15.1 E(): 4.3  
Smith-Waterman score: 24; 100.000% identity (100.000% ungapped)  
in 3 aa overlap (1-3:487-489)

```
Aedesa                                KPDAVK
                                     :::
gi_185
VTPSGNPFMSNVNLHLEGNSLHNYVATPKSNKPDRTFSSSDEWILDANYNNDTIKIESQFS
 460          470          480          490          500          510

gi_185
```

DYKTKKTEVDHLLVRDINHLPVHVARYGFMGLKNSDAKDTIEWNLKCGS  
520 530 540 550 560

**>>Aedes\_aegypti\_isolate\_AEA\_CLU4\_putative\_18.6\_kDa\_secres (168 aa)**

s-w opt: 20 Z-score: 61.5 bits: 12.9 E(): 5.7  
Smith-Waterman score: 20; 66.667% identity (66.667% ungapped)  
in 3 aa overlap (1-3:51-53)

```
Aedesa                                KPDAVK
                                      ...
Aedes_
PDINAAEVEKAIHQQSEAFLESIYAAAGESQPDGSMDEVIEELITAAAPESIRQDVAKELK
      30      40      50      60      70      80

Aedes_
ADGNGALS DGLKERINH YVLQW S LQYVPEDLQKDVSEALEEYQTTGRVSNKERNRVR
      90     100     110     120     130     140
```

**>>Aedes\_aegypti\_isolate\_AEA\_CLU30\_putative\_serpin\_mRNA, (418 aa)**

s-w opt: 22 Z-score: 60.4 bits: 14.0 E(): 6.5  
Smith-Waterman score: 22; 66.667% identity (66.667% ungapped)  
in 6 aa overlap (1-6:248-253)

```
Aedesa                                KPDAVK
                                      : : : :
Aedes_
ENVKFL EGSISAGYARLDNLKVEVVELISDKVDG V K L W L I M P D R A S S I K D F N D Q L S V E S I
220      230      240      250      260      270

Aedes_
RQIENGLTAQKVDVSLALPMVTIEYNSQEDAYVTEVFEV F S S L F T K P S V K L V D G K D D L Y V
280      290      300      310      320      330
```

**>>Aedes\_aegypti\_isolate\_AEA\_CLU8\_putative\_18.2\_kDa\_secres (158 aa)**

s-w opt: 19 Z-score: 59.2 bits: 12.4 E(): 7.5  
Smith-Waterman score: 19; 66.667% identity (66.667% ungapped)  
in 3 aa overlap (1-3:144-146)

```
Aedesa                                KPDAVK
                                      ...
Aedes_ DPPLNAMNYLDCIALGRNSTKEIIAFIRKREP D F F N V F H C K G I T L
      120     130     140     150
```



## Apéndice E: Inhibidores de Trombina.

Alineamiento de *Aedes aegypti* proteína salival D7Bclul mRNA, completo

Origen/ base de datos	Nombre de la secuencia
User Entered	ANTITHROMBIN ANOPHELES ALBIMANUS
User Entered	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade [Mus musculus]
User Entered	SERINE PROTEASE INHIBITOR_Antithrombin, 432 AA
User Entered	Similar to serine (or cysteine) proteinase [Xenopus laevis]
User Entered	antithrombin [Homo sapiens] BAC21176.1 [AB083707], 122 AA
User Entered	SERINE PROTEASE INHIBITOR_antithrombin
User Entered	SERPIN_antithrombin-iii, 417 AA
User Entered	Hirullin P18 (Thrombin inhibitor hirullin P18)
User Entered	Heparin cofactor II precursor (HC-II) (Protease inhibitor leuserpin 2) [Rattus norvegicus (Rat
User Entered	Hirudo medicinalis (medicinal leech) hirudin (anticoagulant
User Entered	Aedes aegypti isolate AEA_CLU58 putative chymotrypsin-like serine
User Entered	Aedes aegypti FXa-directed anticoagulant precursor (AFXa) mRNA
User Entered	Aedes aegypti serine/threonine protein kinase Akt mRNA, complete
GBINV 25140428_25140429	Mamestra configurata serine protease inhibitor serpin 1c mRNA,
GBINV 42405398_42405399	Caenorhabditis elegans serine or cysteine protease inhibitor
GBINV 431334_431335	Manduca sexta (clone H1) putative serine protease inhibitor (serpin
GBINV 431342_431343	Manduca sexta (clones F1-F7, F9-F20) putative serine proteinase
GBINV 431344_431345	Manduca sexta (clones H8, H12) putative serine proteinase inhibitor
GBINV 431346_431347	Manduca sexta (clone H3) putative serine proteinase inhibitor
GBINV 431348_431349	Manduca sexta (clone H9) putative serine proteinase inhibitor
GBINV 431350_431351	Manduca sexta (clone F8) putative serine proteinase inhibitor
GBINV 45594229_45594230	Bombyx mori serpin-5 mRNA, complete cds.
GBINV 45594233_45594234	Manduca sexta serpin-5B mRNA, complete cds.

SWISSPROT ACH2_BOMMO	Antichymotrypsin II (ACHY-II) [ <i>Bombyx mori</i> (Silk moth)]
SWISSPROT ADAM_CROAD	Adamalysin II (EC 3.4.24.46) (Proteinase II) [ <i>Crotalus adamanteus</i> (Eastern diamondback rattlesnake)]
SWISSPROT PAI1_HUMAN	Plasminogen activator inhibitor-1 precursor (PAI-1) (Endothelial plasminogen activator inhibitor) (PAI) [ <i>Homo sapiens</i> (Human)]
SWISSPROT PEDF_HUMAN	Pigment epithelium-derived factor precursor (PEDF) (EPC-1) [ <i>Homo sapiens</i> (Human)]
SWISSPROT PEDF_MOUSE	Pigment epithelium-derived factor precursor (PEDF) (Stromal cell- derived factor 3) (SDF-3) (Caspin) [ <i>Mus musculus</i> (Mouse)]
SWISSPROT PTI6_MOUSE	Placental thrombin inhibitor (Protease inhibitor 6) (PI-6) [ <i>Mus musculus</i> (Mouse)]

## Apéndice F: Alineamiento entre D7 de *Aedes aegypti* y una molécula inhibidora de trombina

Consensus key (see documentation for details)

- \* - residuos totalmente conservados
- : - conservación de grupos fuertes
- . - conservación de grupos débiles
- sin consenso

CLUSTAL W (1.81) alineamiento de secuencias

```

Aedes_aegypti_long_form_D7Bc      ---MFPPrKFLSSFILAAALHVTAAP---LWDAKDP-EQFRFITSRCME
SERINE_PROTEASE_INHIBITOR_an      VDICTAKPRDIPMNPmCIYRSKIPEATNRRVWELSKANSRFATTFYQHLa
                                   **.: :.:. : :.:. *. :*: ... :.* : :

Aedes_aegypti_long_form_D7Bc      DWYpKAK---NPKAALQNwLgWkLEPSDDQATQcYTKCVLEKIGFYEPG
SERINE_PROTEASE_INHIBITOR_an      DSKNDNDNIflSPLSISTAFAMTKLGACNDTLQQLMEVFKFDtISEKtSD
* . . . . * : : ** ..* * : :*. ..

Aedes_aegypti_long_form_D7Bc      EKRFK---GVRVMRQWETFNkYLNADR--EKVHDLTSTFDfIPPLKSS
SERINE_PROTEASE_INHIBITOR_an      QIHFFFAKLNCRlyRKANKSSkLVSANRlFGDKSLTFNetyQDISeLVYg
: :* . * : * : :. . * :.* : * : :. : * : * .

Aedes_aegypti_long_form_D7Bc      SCSEVFEAFKkVHGkHSETIRAILFG-KGESSkKYQEKGIKIKQKGQSV
SERINE_PROTEASE_INHIBITOR_an      AKLQlPDKENAEQSRAAINKwVSNKTEGRITdVIPSEAINELTVLVLvN
: : : : :. . : : : : : : * . . . * : :

Aedes_aegypti_long_form_D7Bc      FMHCEALNYPKGSPO--RKDLCEIRKYQMGSGIVFGRHMECIfKGLRYMT
SERINE_PROTEASE_INHIBITOR_an      TIYFKGLWKSfSPENTRkELfYKADGESCSASmMYQEGKfRYRRVABGT
: : :* . * ** : ** : * . : * : : : : : : *

Aedes_aegypti_long_form_D7Bc      SKNELDVDEIARDFIEVKKKPD-ALKAMMKTCKANLKEKNAGKIAVHYK
SERINE_PROTEASE_INHIBITOR_an      QVLELpFGDDITMVLlLPkPEKSLAKVEKELTPEVLQEWLDELEEMMLV
. ** .. : : : ** : * : * .. : : : :

Aedes_aegypti_long_form_D7Bc      CLMNdSKVTNDFKEAFDYREVRskDYFAALtGKLK-----PYSRSD

```

```

SERINE_PROTEASE_INHIBITOR_an      VHMPRFRIEDGFSLKEQLQDMGLVDLFSPEKSKLPGIVAEGRDDLYVSDA
      *  : : : , * ,   : : : :   * * : . . , * *           *   .

Aedes_aegypti_long_form_D7Bc      VRKQVDDIDKIQCS-----
SERINE_PROTEASE_INHIBITOR_an      FHKAFLEVNEEGSEAAASTAVVIAGRSLNPNRVTFKANRPFLVFIREVPL
      : * . : : : :   . .

Aedes_aegypti_long_form_D7Bc      -----
SERINE_PROTEASE_INHIBITOR_an      NTIIFMGRVANPCV

```

\* - un unico, residuo totalmente conservado Hélice alfa = H Hoja Beta= E Vuelta fortuita = C  
 : - conservación de grupos fuertes  
 . - conservación de grupos débiles  
 - sin consenso

CLUSTAL W (1.81) alineamiento de secuencias múltiples

```
Aedes_aegypti_long_form_D7Bc      ----MFPPRKFLSSFILAAALHVTAAP---LWDAKDP-EQFRFITSRCME
SERINE_PROTEASE_INHIBITOR_an      VDICTAKPRDIPMNPNCIYRSKIPEATNRRVWELSKANSRFATTFYQHLA
                                   **.: :.: : :.: *. :*: ... :.* : :
```

1

```
Aedes_aegypti_long_form_D7Bc      DWYPKAK----NPKAALQNWLGWKLEPSDDQATQCQYTKCVLEKIGFYEPG
SERINE_PROTEASE_INHIBITOR_an      DSKNDNDNIFLSPLSISTAFAMTKLGACNDTLQQLMEVEKFDTISEKTS
* . . . . * : : : ** .:~ * : :.*. ..
```

```
Aedes_aegypti_long_form_D7Bc      EKRFK----GVRVMRQWETFNKYLNADR---EKVHDLTSTFDFIPLKSS
SERINE_PROTEASE_INHIBITOR_an      QIHFFFAKLNCRLYRKANKSSKLVSANRLFGDKSLTFNETYQDISLVYG
: : * . * : * : : . * : : * * : * : : . * : * .
```

2

```
Aedes_aegypti_long_form_D7Bc      SCSEVF EAFKRVHGHSETIRAILFG-KGESSKYYQEKGIKIKQKQSV
SERINE_PROTEASE_INHIBITOR_an      AKLQPLDFKENAEQSRRAINKWVSNKTEGRITDVIPSEAINELTVLVLVN
: : : : :.: :.: : : : : * . . . * :.:
```

3

```
Aedes_aegypti_long_form_D7Bc      FMHCEALNYPKGSPPQ--RKDLCEIRKYQMGSGIVFGRHMECIFKGLRYMT
SERINE_PROTEASE_INHIBITOR_an      TIYFKGLWKS KFS PENTR KELFYKADGESCSASMMYQEGKFRYRRVAEGT
: : : * . * ** : ** * . : * . : : : : : : ~
```

4

```
Aedes_aegypti_long_form_D7Bc      SKNELDVDEIARDFIEVKKKPD-ALKAMMKTCKANLKEKNAGKIAVHYK
SERINE_PROTEASE_INHIBITOR_an      QVLELFPFGDDITMVLILPKPEKSLAKVEKELTPEVLQEWLDELEEMMLV
. ** .. : : : ** : * : * ..: : : : : :
```

5

```
Aedes_aegypti_long_form_D7Bc      CLMNSKVTNDFKEAFDYREVRSKDYFAALTGKLGK-----PYSRSD
SERINE_PROTEASE_INHIBITOR_an      VHMFRFRIEDGFSLKEQLQDMGLVDLFSPEKSKLPGIVAEGRDDLYVSDA
* : : : * . : : : * * . . . * * * .
```

6

```
Aedes_aegypti_long_form_D7Bc      VRKQVDDIDKIQCS-----
SERINE_PROTEASE_INHIBITOR_an     FHKAFLEVN EEGSEAAASTAVVIAGRSLNPNRVTFKANRPFLVFIREVPL
..* . :::: ..
```

```
Aedes_aegypti_long_form_D7Bc      -----
SERINE_PROTEASE_INHIBITOR_an     NTIIFMGRVANPCV
```

Secuencias tanto de un inhibidor de trombina así como la secuencia de la forma larga de la proteína D7B

```
>SERINE_PROTEASE_INHIBITOR_antithrombin
VDICTAKPRDIPMNP MCIYRSKIPEATNRRVWELSKANSRFATTFYQHLA
DSKNDNDNI FLSELSISTAFAMTKLGACNDTLQQLMEVFKFDTISEKTS D
QIHFFFAKLNCR L YRKANKSSKLV SANRLFGDKSLTFNETYQDISELVYG
AKLQPLDFKENAEQSR AA INK WVS NKTEGRITDVIPSEAINELTVLVLVN
TIYFKGLWKS KFSPE NTRKELFYKADGESCSASMMYQEGKFRYRVAEGT
QVLEL PFKGDDITMVLILPKPEKSLAKVEKELTPEVLQEWLDELEEMMLV
VHMPRFRIEDGFSLKEQLQDMGLVDLFSPEKSLPGIVAEGRDDLYVSDA
FHKAFLEVN EEGSEAAASTAVVIAGRSLNPNRVTFKANRPFLVFIREVPL
NTIIFMGRVANPCV
```

```
>Aedes_aegypti_long_form_D7Bclul_salivary_protein_mRNA,_complete
MFPFRKFLSSFIL AALHVTAAPLWDAKDPEQFRFITSRMEDWYPKAKN
PKAALQNLWGKLEPSDDQATQCYTKCVLEKIGFYEPGEKRFKGV RVMRQ
WETFNKYLNADREK VHDLTSTFD FIPPLKSSSCSEVFEAFKKVHGKHSET
IRAILFGKGESSK KYYQEKGIKIKQKQSVFMHCEALNYPKGS PQRKDLC
EIRKYQMGSGIVFGRHMEC I FKGLRYMTSKNELDVDEIARDFIEVKKKPD
ALKAMMKTCKANLKEKNAGIAVHYKCLMND SKVTNDFKEAFDYREVRS
KDYFAALTGK LKPYRSRSDVRKQVDDIDKIQCS
```

**Apéndice G Tabla 13. Se muestran algunos inhibidores de la trombina pertenecientes a distintos organismos**

Especie	Modo de acción	Referencia
<b>Moscas Tsetse</b>		
<i>Glossina morsitans</i> <i>G. palpalis</i>	Inhibición de sitios proteolíticos y estereolíticos de la trombina	Parker, 1979
<i>G. austensi</i>	Antitrombina	Hawkins, 1966
<b>Moscas negras</b>		
<i>Simulium vittatum</i>	Inhibición de trombina	Abebe <i>et al</i> , 1994
<i>Simulium argus</i>		
<b>Chinches asiáticas</b>		
<i>Rhodnius prolixus</i>	Inhibición de la interacción con el fibrinogeno	Van de Loch <i>et al</i> , 1995
<i>Triatoma infestans</i>		Pereira <i>et al</i> , 1996
<i>T pallidipennis</i>	Inhibición de la interacción con fibrinogeno y trombomodulina	Fuentes-Prior <i>et al</i> 2001
<i>Eutriatoma maculatus</i>	Aantitrombina	
<b>Tabanos</b>		
<i>Tabanus bovinus</i>	Inhibición de la trombina	Markwardt <i>et al</i> , 1991 en Abebe <i>et al</i> 1994
<b>Escorpiones</b>		
<i>Palamneus gravianinus</i>	Inhibición de la interacción con el fibrinogeno	Reddy <i>et al</i> , 1972
<b>Garrapatas</b>		
<i>Ornithodoros moubata</i>	Antitrombina moderada	Wikel, 1996
<i>Ixodes ricinus</i>	Destruye la trombina	
<i>I. holocyclus</i>	Antitrombina	
<i>Dermacentor andersoni</i>	Inhibición de la interacción con el fibrinogeno	