



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

FACULTAD DE MEDICINA

**LA METILACIÓN DEL ADN EN *ANOPHELES ALBIMANUS* MODULA LA
RESPUESTA INMUNE INTESTINAL CONTRA *PLASMODIUM BERGHEI***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA

FABIOLA CLAUDIO PIEDRAS

DIRECTOR DE TESIS

DR. CUAUHTÉMOC JUAN HUMBERTO LANZ MENDOZA

FACULTAD DE MEDICINA

COMITÉ TUTOR

DR. MARIO E. ZURITA ORTEGA

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

DR. LUIS IGNACIO TERRAZAS VALDÉS

FACTULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., MAYO DE 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

RECONOCIMIENTOS ACADÉMICOS

La presente tesis se adscribió al posgrado de Ciencias Biomédicas-UNAM y se realizó con la tutoría del Dr. Humberto Lanz Mendoza, en el laboratorio tres planta alta del Centro de Investigaciones Sobre Enfermedades Infecciosas (CISEI) del Instituto Nacional de Salud Pública (INSP) sede Morelos, Cuernavaca.

La sustentante agradece la beca académica otorgada por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. Registro 288041/228628) durante la realización de la presente tesis de doctorado.

Se agradece y reconoce al comité tutor que asesoró la presente tesis:

Dr. Humberto Lanz Mendoza	Instituto Nacional de Salud Pública
Dr. Mario Zurita Ortega	Instituto de Biotecnología-UNAM
Dr. Ignacio Terrazas Valdés	Facultad de Estudios Superiores Iztacala

Se agradece a los miembros del Jurado que revisaron y enriquecieron con sus observaciones este trabajo

PRESIDENTE:	Dr. Federico Ávila Moreno
SECRETARIO:	Dr. Cuauhtémoc Juan Humberto Lanz Mendoza
VOCAL:	Dr. Julio César Carrero Sánchez
VOCAL:	Dra. Leonor Huerta Hernández
VOCAL:	Dra. Viviana del Carmen Valadéz Graham

Un agradecimiento especial a la Universidad Nacional Autónoma de México, que me formó científica, humanista y técnicamente. Gracias por la oportunidad de madurar académicamente en un espacio donde rige la pluralidad, la diversidad, la ética y, sobre todo, donde prospera la libertad y el conocimiento.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Al Dr. Humberto Lanz Mendoza por promover el libre pensamiento y ejercicio experimental, por todo su apoyo a través de todos estos años.

A mis tutores Mario Zurita Ortega y Luis I. Terrazas Valdés por su contribución intelectual y su guía a lo largo de mi doctorado.

Al Biólogo Juan Manuel Hernández Tablas por su apoyo, compañía y arduo trabajo durante el desarrollo de esta investigación.

Al estimado Dr. Renaud Condé por la retroalimentación permanente y su postura crítica que contribuyó a mejorar esta investigación.

A Guillermo Perales Ortiz y Gerardo Hurtado Sil por sus invaluable enseñanzas y apoyo durante la experimentación.

A Patricia Munguía y Laura Salgado por su apoyo y trabajo para la obtención del material biológico para esta investigación.

Sobre todo, a Benito Recio Tótoro por su indispensable contribución intelectual para esta investigación; por su generosidad, maestría y esfuerzo. Por todo el apoyo y la constante motivación que con el ejemplo y cariño me ha dado.

A la voluntad.

A la pequeña *Habba*.

TABLA DE CONTENIDOS

LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
LISTA DE FIGURAS.....	12
LISTA DE TABLAS.....	13
RESUMEN.....	14

PRIMERA PARTE INTRODUCCIÓN

I. Panorama general.....	19
Metilación de citosinas en los ácidos nucleicos.....	19
Mecanismo	21
Efectos de la 5mC.....	24
Vías de señalización.....	25
Modulación.....	26
Detección y análisis de la 5mC.....	28
II. ADN metiltransferasa 2.....	29
Conservación genómica de <i>dnmt2</i>	30
Características de la proteína y catálisis.....	32
Blancos de metilación.....	33
Localización subcelular.....	33
Expresión en tejidos y su temporalidad.....	34
Procesos en los que participa DNMT2.....	34
III. La metilación del ADN es inducida por factores ambientales.....	35
IV. Metilación del ADN en insectos.....	36
V. Metilación del ADN e infecciones.....	37
VI. Mosquitos <i>Anopheles</i> y su infección con <i>Plasmodium</i>	38
Respuesta inmune y resistencia de <i>Anopheles</i> contra <i>Plasmodium</i>	40
<i>Anopheles albimanus</i>	42

Fenotipos.....	42
Genoma.....	44
Transcriptoma.....	44
VII. Propuesta.....	46

SEGUNDA PARTE
RESULTADOS

I. <i>Anopheles albimanus</i> posee un sistema de metilación de ácidos nucleicos funcional y necesario para el desarrollo del mosquito.....	48
II. Los fenotipos Blanco y Café de <i>A. albimanus</i> difieren en el porcentaje de metilación del ADN, el perfil de transcripción de genes de la respuesta inmune y la susceptibilidad a la infección por <i>P. berghei</i>	53
III. <i>A. albimanus</i> fenotipo Blanco y Café difieren en la modulación transcripcional de marcadores de la respuesta inmune por metilación de ácidos nucleicos.....	60
IV. Los fenotipos Blanco y Café de <i>A. albimanus</i> responden diferencialme al reto con <i>P. berghei</i> en términos de metilación del ADN y transcripción de genes de la respuesta inmune	64
V. La inhibición de la metilación del ADN en <i>A. albimanus</i> dirige a los mosquitos a una condición de resistencia contra <i>P. berghei</i>	69

TERCERA PARTE
DISCUSIÓN

I. Discusión	75
--------------------	----

CUARTA PARTE
OBSERVACIONES FINALES

I. Observaciones finales..... 82

QUINTA PARTE
PERSPECTIVAS

I. Perspectivas..... 86

SEXTA PARTE
MATERIALES Y MÉTODOS

I. Identificación *in silico* de los genes *dnmt2*, *tet2* y *mbd*..... 88

II. *Anopheles albimanus* Wiedemann (1829)..... 88

III. *Plasmodium berghei*..... 88

 Crecimiento de las fases merogónicas en el ratón..... 88

 Cultivo de oocinetos..... 89

IV. Ensayos de inhibición de la metilación..... 89

 Inhibición de la metilación en la ontogenia de *A. albimanus*..... 90

 Inhibición de la metilación en mosquitos *A. albimanus*..... 90

 Efecto de la azacitidina en la sobrevivencia y desarrollo de *P. berghei*..... 91

V. Infecciones de mosquitos *A. albimanus* con *P. berghei*..... 91

 Infecciones..... 91

 Prevalencia, abundancia, intensidad y eficiencia de las intervenciones en el bloqueo de la transmisión 92

VI. ADN genómico y ARN..... 92

 Extracción..... 92

 Síntesis de ADN complementario 93

 Tratamiento con ADNasa..... 93

PCR.....	94
qPCR.....	94
PCR largo y secuenciación del gen <i>dnmt2</i>	94
VII. Digestión con la enzima de restricción <i>HpaII</i>	95
VIII. Dot Blot.....	95
IX. HPLC.....	96
Hidrólisis.....	96
Derivatización.....	96
Cromatografía.....	96
X. Actividad de fenoloxidasa.....	97
XI. Cuantificación de nitritos y nitratos.....	97
Nitritos y estándar.....	98
Nitratos.....	98
XII. Análisis estadístico.....	98
XIII. Diseño experimental y datos adicionales.....	98

SÉPTIMA PARTE
FIGURAS

I. Figuras suplementarias.....	100
--------------------------------	-----

OCTAVA PARTE
TABLAS

I. Tablas suplementarias.....	111
-------------------------------	-----

NOVENA PARTE
REFERENCIAS

I. Bibliografía citada.....	116
-----------------------------	-----

DÉCIMA PARTE
ANEXOS

I. Anexo I.....	133
II. Anexo II.....	137
III. Anexo III.....	139
IV. Anexo IV.....	143
V. Artículo publicado.....	151

LISTA DE ABREVIATURAS

-CH ₃	grupo metilo
2-OG	2-oxoglutarato
5mC	5-metilcitosina
5mdC	5-metil-2-desoxicitidina
A+Pb	Mosquitos tratados con Azacitidina y retados con <i>Plasmodium berghei</i>
AALBS	Línea celular de <i>A. albimanus</i> (LSB-AA695BB)
ADNg	ADN genómico
ARNm	ARN mensajeros
ARNmi	ARN pequeño
ARNmisc	ARN misceláneo
ARNnl	ARN no codificantes largos
ARNr	ARN ribosomal
ARNsc	ARN pequeño condicional
ARNsn	ARN pequeño nuclear
ARNsno	ARN pequeño nucleolar
ARNt	ARN de transferencia
Aza	Azacitidina; 5-azacitidina
B	Mosquitos fenotipo Blanco
BA	Mosquitos fenotipo Blanco tratados con Azacitidina
Bb	Mosquitos fenotipo Blanco hemoalimentados
BD	Mosquitos fenotipo Blanco tratados con Decitabina
BPb	Mosquitos fenotipo Blanco retados con <i>Plasmodium berghei</i>
C	Mosquitos fenotipo Café
CA	Mosquitos fenotipo Café tratados con Azacitidina
Cb	Mosquitos fenotipo Café hemoalimentados
CD	Mosquitos fenotipo Café tratados con Decitabina
CPb	Mosquitos fenotipo Café retados con <i>Plasmodium berghei</i>
C5-MeTfs	Citosina-C5-metiltransferasas
CTL4	Lectina tipo C 4
CTL6	Lectina tipo C 6
D	Decitabina; 5-aza-2'-desoxicitidina

DNMT2	ADN metiltransferasa 2
DNMTs	ADN metiltransferasas
dpe	días post-emergencia
DUOX	Oxidasa dual
FREP3	Inmunoelectina con dominio de fibrinógeno 3
<i>HpaII</i>	Enzima de restricción sensible a metilación <i>HpaII</i>
L1	Larva en etapa 1
LRIM1	Proteína con repetidos ricos en leucina 1
MBD	Proteína con dominio de unión a CpG metilado
mTOR	<i>mechanistic Target of Rapamycin Kinase</i>
NF-kB	Factor de transcripción nuclear kB
NO	Óxido nítrico
<i>P.b-ANKA-GFP</i>	<i>Plasmodium berghei</i> Antwerpen-Katanga-GFP
PO	Fenol-oxidasa
SAH	S-adenosil-homocisteína
SAM	S-adenosil-L-metionina
Tap	Cepa parental Tapachula
TBIs	<i>Transmission blocking interventions</i>
TEP	Proteína con enlace tioéster
TET	<i>Ten-eleven Translocation</i>
TRD	<i>Target Recognition Domain</i>

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.....	20
FIGURA 2.....	23
FIGURA 3.....	31
FIGURA 4.....	32
FIGURA 5.....	39
FIGURA 6.....	43
FIGURA 7.....	45
FIGURA 8.....	50
FIGURA 9.....	56
FIGURA 10.....	62
FIGURA 11.....	67
FIGURA 12.....	71
FIGURA S1.....	100
FIGURA S2.....	102
FIGURA S3.....	104
FIGURA S4.....	106
FIGURA S5.....	107
FIGURA S6.....	108
FIGURA S7.....	109

LISTA DE TABLAS

TABLA S1.....	111
TABLA S2.....	112
TABLA S3.....	113
TABLA S4.....	114

RESUMEN

LA METILACIÓN DEL ADN EN *ANOPHELES ALBIMANUS* MODULA LA RESPUESTA INMUNE INTESTINAL CONTRA *PLASMODIUM BERGHEI*

por

Fabiola Claudio Piedras

Doctorado en Ciencias Biomédicas

Universidad Nacional Autónoma de México, 2020

Los mecanismos epigenéticos como la metilación del ADN y las modificaciones postraduccionales en histonas son fundamentales para la plasticidad fenotípica de los insectos durante sus interacciones con el medio ambiente. En respuesta a las señales ambientales, el patrón de metilación del ADN se remodela para lograr el control epigenético de la expresión génica. La metilación del ADN en la posición C5 de las citosinas (5mC) ha sido objeto de estudio en insectos por su carácter evolutivamente conservado; sin embargo, existe un escaso conocimiento sobre la regulación epigenética en mosquitos vectores, especialmente durante la infección con parásitos del género *Plasmodium*. El objetivo de la presente tesis fue determinar la presencia de la marca epigenética 5mC en *Anopheles albimanus* y su participación en la respuesta inmune intestinal durante la infección con *Plasmodium berghei*. Para lograr este objetivo, se determinó la presencia de la 5mC a través de inmunodetección, de digestión con una enzima de restricción sensible a metilación y su cuantificación genómica mediante HPLC. Para probar los efectos biológicos de la metilación del ADN, se establecieron tratamientos con inhibidores de la metilación y se evaluó la tolerancia al tratamiento durante la ontogenia del mosquito, seguido de la evaluación de los efectos sobre los perfiles de transcripción de los genes del sistema de metilación del ADN y de siete genes de respuesta inmune anti-*Plasmodium*, así como sobre la prevalencia e intensidad de la infección en dos fenotipos de mosquitos con diferencias en la susceptibilidad a *P. berghei*. Las evaluaciones se realizaron en los cinco estadios de desarrollo del mosquito y en intestinos de hembras adultas alimentadas con sangre no

infectada y sangre infectada con *P. berghei*. En la presente investigación se demostró que el sistema de metilación del ADN en *A. albimanus* es funcional y esencial para el desarrollo y viabilidad larvaria. En mosquitos adultos, la 5mC está presente en el ADN de intestino y su abundancia es diferencial entre los fenotipos evaluados. Además, la transcripción de los genes del sistema de metilación del ADN, así como el enriquecimiento de 5mC son inducibles por la hemoalimentación y el reto con *P. berghei*. Finalmente, el borrado farmacológico de la metilación mediante azacitidina o decitabina, promovió una respuesta inmune anti-*Plasmodium* similar entre los fenotipos, adquiriendo mayor resistencia y reduciendo efectivamente las cargas intestinales de parásitos. La respuesta transcripcional de los fenotipos fue más específica y se redujeron las diferencias entre sus perfiles de transcripción. La presente investigación representa el primer análisis de la relación entre la metilación del ADN y la expresión de genes de la respuesta inmune en dos fenotipos funcionales de *A. albimanus*. De acuerdo con estos resultados, la metilación del ADN es una modificación epigenética importante en la competencia vectorial y un objetivo prometedor para prevenir la transmisión de la malaria.

ABSTRACT

DNA METHYLATION IN *ANOPHELES ALBIMANUS* MODULATES THE MIDGUT IMMUNE RESPONSE AGAINST *PLASMODIUM BERGHEI*

by

Fabiola Claudio Piedras

Doctorado en Ciencias Biomédicas

Universidad Nacional Autónoma de México, 2020

Epigenetic mechanisms such as DNA methylation and histone post-translational modifications are fundamental for the phenotypic plasticity of insects during their interactions with the environment. In response to environmental cues, the DNA methylation pattern is remodelled to achieve an epigenetic control of gene expression. DNA methylation at the C5 position of cytosines (5mC) has been studied in insects for its evolutionarily conserved character; however, there is scant knowledge about the epigenetic regulation in vector mosquitoes, especially during their infection by parasites of the *Plasmodium* genus. The objective of the present thesis was to determine the presence of the 5mC epigenetic mark in *Anopheles albimanus* and its participation in the midgut immune response during infection with *Plasmodium berghei*. To achieve this objective, the presence of 5mC was determined through immunodetection, methylation-sensitive restriction digestions, and its genomic quantification by HPLC. To test the biological effects of DNA methylation, treatments with methylation inhibitors were established and tolerance to treatment during mosquito ontogeny was assessed. This was followed by an evaluation of the effects on the transcription profiles of the DNA methylation system genes and seven anti-*Plasmodium* immune markers, as well as on the prevalence and intensity of infection in two mosquito phenotypes with differences in susceptibility to *P. berghei*. The evaluations were carried out in the five stages of development of the mosquito and in the midgut of adult females fed with uninfected and *P. berghei*-infected blood. In the present investigation it was demonstrated that the DNA methylation system in *A. albimanus* is functional and essential for larval development and

viability. In adult mosquitoes, 5mC is present in the DNA of the midgut and its abundance is differential between the phenotypes evaluated. Furthermore, transcription of the DNA methylation system genes as well as the enrichment of 5mC are inducible by blood-feeding and the challenge with *P. berghei*. Finally, the pharmacological deletion of methylation by azacitidine or decitabine promoted a similar anti-*Plasmodium* immune response among the phenotypes, acquiring greater resistance and effectively reducing midgut parasite loads. The transcriptional response of the phenotypes was more specific and the differences between their transcription profiles were reduced. The present investigation represents the first analysis of the relationship between DNA methylation and gene expression of the immune response in two phenotypes of *A. albimanus*. Consistent with these results, DNA methylation is an important epigenetic modification in vector competence and a promising target for preventing malaria transmission.

PRIMERA PARTE
INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

PANORAMA GENERAL

METILACIÓN DE CITOSINAS EN LOS ÁCIDOS NUCLEICOS

La metilación de los ácidos nucleicos es el mecanismo epigenético más antiguo y evolutivamente conservado entre las especies (Sarda et al. 2012; Karl M. Glastad, Hunt, y Goodisman 2014; Zilberman 2017; Feng et al. 2010). La metilación del ADN en la posición C5 de las citosinas consiste en la unión covalente de un grupo metilo al carbono cinco del anillo pirimidínico de la citosina; esta modificación química no afecta la secuencia subyacente del ADN y ha sido el proceso epigenético más estudiado (Allis y Jenuwein 2016; Jeltsch 2002) (Figura 1). El estudio de la 5-metilcitosina (5mC) se remonta a principios del siglo pasado, cuando en 1904 Johnson y Wheeler la sintetizaron *in vitro* por primera vez y en 1925 Johnson y Coghill la reportaron como componente estructural del ADN del bacilo de la tuberculosis. En 1948, Hotchkiss reportó la presencia de 5mC en timo bovino y sugirió que la base se encuentra naturalmente en el ADN de los organismos; la denominó “epicitosina” por su comportamiento cromatográfico y su espectro de absorción ultravioleta similar al de la citosina (Hotchkiss 1948). Posteriormente en 1951, Wyatt demostró que la 5mC está presente en el ADN de animales y plantas y en 1963 Gold reportó que la catálisis de la metilación en el ADN es realizada por las proteínas ADN metiltransferasas (Wyatt 1951). Sin embargo, fue hasta 1975 cuando se reportó en dos artículos independientes y por vez primera, la posible función de la 5mC: el silenciamiento de la expresión génica (Holliday R y Pugh JE 1975; Riggs 1975). Para 1978, la 5mC es reconocida como la quinta base del DNA en los vertebrados (Moore, Le, y Fan 2012).

Actualmente sabemos que la 5mC es una marca epigenética presente en la mayoría de las células eucariontes y un biomarcador prometedor para múltiples aplicaciones. Inicialmente, la función de la 5mC se conceptualizó en torno a la modulación de la

expresión génica en dos de los fenómenos más relevantes en la biología: la diferenciación celular y la herencia somática (Holliday R y Pugh JE 1975; Riggs 1975).

Más tarde, el interés por estudiar el paso de los caracteres adquiridos de un organismo a su descendencia consolidó a la 5mC como la marca de la herencia intra- y transgeneracional. Sin embargo, ha sido entorno al desarrollo y progresión del cáncer en humanos donde se ha centrado principalmente el interés por entender la función de la 5mC. Importantes avances se han logrado en el establecimiento de biomarcadores para la detección temprana, el diagnóstico preciso y la respuesta al tratamiento contra el cáncer. Hoy en día se investigan los cambios en los niveles y patrones de 5mC en enfermedades neurodegenerativas, autoinmunes, infecciosas, cardiovasculares, psiquiátricas, desórdenes mitocondriales, en la condición del envejecimiento y en el abordaje para trasplantes.

Figura 1. Metilación de citosinas

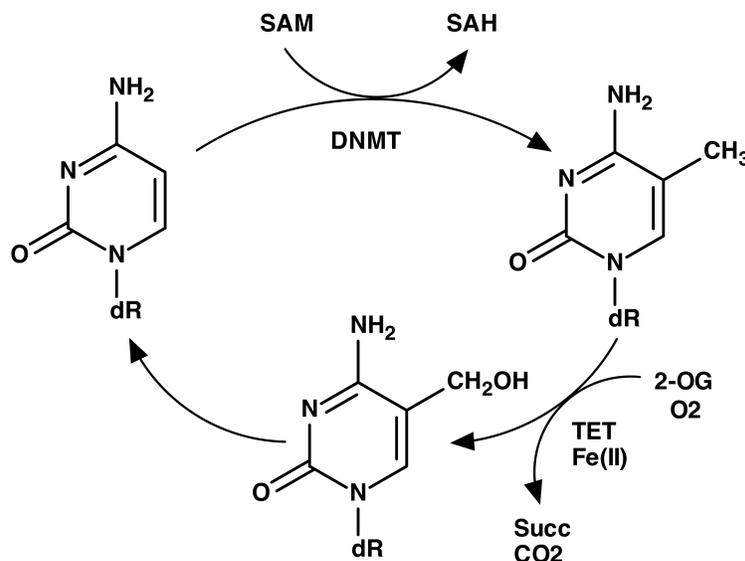


Figura 1. La metilación de citosinas en el ADN es una modificación química estable en la posición C5 del anillo pirimidínico catalizada por las ADN metiltransferasas. La metilación de citosinas es inducible y reversible al ser sustrato de las desmetilasas TET.

MECANISMO

La metilación de citosinas en los ácidos nucleicos es catalizada por las citosina-C5-metiltransferasas (C5-MeTfs). Las C5-MeTfs constituyen una familia de enzimas que producen modificaciones específicas sobre el anillo pirimidínico de la citosina en los ácidos nucleicos a través de un mecanismo enzimático conservado. La catálisis de esta modificación consiste en la transferencia de un grupo metilo ($-CH_3$) sobre el carbono cinco (C5) de la citosina para transformarla en 5-metilcitosina (5mC). El origen del grupo metilo transferido proviene del donador universal S-adenosil-L-metionina (SAM). La transferencia del $-CH_3$ por parte de las C5-MeTfs es ATP-dependiente y lleva a la liberación de S-adenosil-homocisteína (SAH) y $ADP + Pi$ (Jeltsch 2002; Jones 2012).

Las C5-MeTfs, originalmente llamadas ADN metiltransferasas (DNMT's, por sus siglas en inglés; *DNA methyl-transferases*), son una familia de tres enzimas evolutivamente conservadas: ADN (citosina-C5)-metiltransferasa 1 (DNMT1), ADN (citosina-C5)-metiltransferasa 2 (DNMT2) y ADN (citosina-C5)-metiltransferasa 3 (DNMT3)(Jeltsch 2002; Jurkowski y Jeltsch 2011; Jones 2012; Lyko 2018).

En general, las DNMTs contienen dos regiones: la región N-terminal de tamaño variable y con múltiples dominios regulatorios y, la región C-terminal donde reside el dominio catalítico. La región N-terminal guía la localización nuclear y media las interacciones de la DNMT con otras proteínas, con el ADN y la cromatina (Jurkowski y Jeltsch 2011). La región C-terminal contiene el dominio catalítico genérico AdoMet-MTasa (*S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases*) que consiste en siete láminas beta plegadas entrecruzadas y rodeadas por seis alfa hélices (Figura 2).

Todas las DNMTs contienen motivos evolutivamente conservados que las distinguen y son representados por los números romanos I, IV, VI, VIII, IX y X. Los motivos de las DNMTs están dispuestos en arreglos compactos de 7 a 16 aminoácidos que contienen al menos tres residuos altamente conservados y otros aminoácidos con posiciones variables representados genéricamente con una "x" (I—LFXGXGG, IV — GXPQXXSXXG, VI — PXXXXXENV, VIII — GXXQXRXR, IX — RXXXXXEXXRXXF, X— YXXXGNXVXVXXXXXl). Los motivos IV, VI y VIII están directamente involucrados en el

mecanismo catalítico de las DNMTs, mientras que el motivo no conservado TRD (por sus siglas en inglés; *Target Recognition Domain*) interactúa con el ADN blanco y el motivo I con el cofactor SAM (Jurkowski y Jeltsch 2011; Jeltsch 2002).

La metilación de citosinas tiene lugar una vez que la enzima DNMT se une con el ADN blanco a través del motivo TRD y con el donador SAM mediante el motivo I. Los motivos IV, VI y VIII participan en la eversión de la citosina para su proyección fuera de la doble hélice ("giro de base") y en su retención en el sitio catalítico de la DNMT (Jeltsch 2002). La reacción de metilación es iniciada por la cisteína conservada en el motivo IV, cuyo grupo tiol realiza un ataque nucleofílico en la posición C6 del anillo pirimidínico, que dirige a la subsecuente transferencia del -CH₃ del donador SAM. El ataque nucleofílico es facilitado por el ácido glutámico conservado en el motivo VI que interactúa con la posición N3 de la citosina, la transferencia del -CH₃ ocurre a través de la formación de un complejo transitorio y covalente entre la DNMT y la posición C6 de la citosina en el ADN. Posteriormente el complejo DNMT-ADN se resuelve mediante la reacción de beta eliminación que da como resultado la liberación de la DNMT activa y la presencia de 5mC en el ADN (Jeltsch 2002; Jurkowski y Jeltsch 2011; Jones 2012)

Por lo anterior, la identificación específica de genes de ADN metiltransferasas en los genomas secuenciados se realiza con el reconocimiento de las secuencias codificantes para los motivos I, IV, VI, VIII, IX y X, con prioridad de los motivos I, IV, VI y VIII, cuyas funciones han sido firmemente establecidas. Aspectos como la conservación de la arquitectura de los dominios y la presencia del motivo distintivo TRD son también necesarios para la identificación de genes miembros de la familia *dnmt2* (Jurkowski y Jeltsch 2011; Jeltsch 2002).

Figura 2. Familia de ADN metiltransferasas

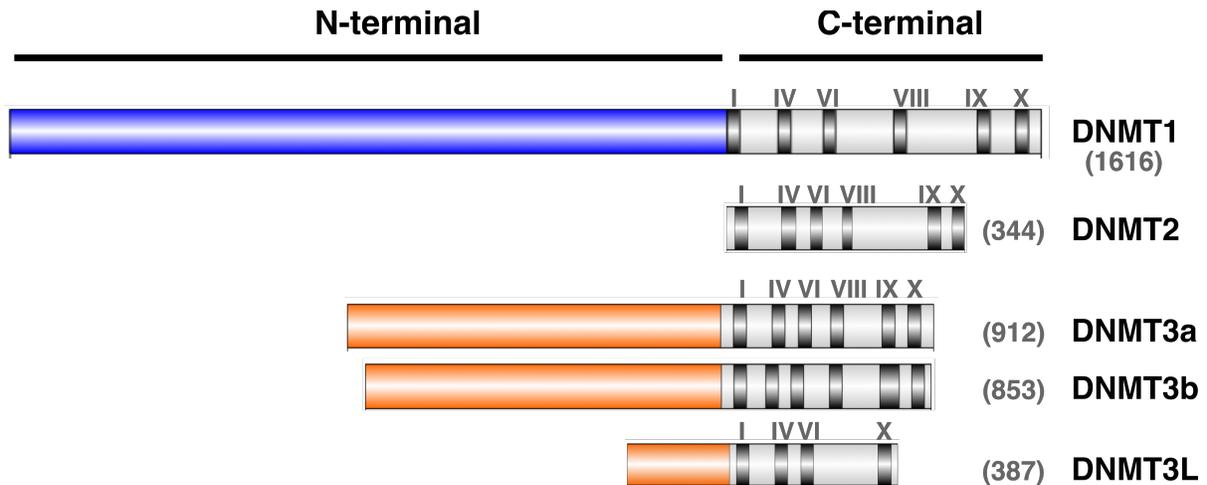


Figura 2. Representación esquemática de los tres miembros de familia de las ADN metiltransferasas: DNMT1, DNMT2 y DNMT3. Los números romanos se refieren a los motivos conservados de las ADN metiltransferasas. Los números entre paréntesis se refieren al número de aminoácidos de cada proteína.

EFFECTOS DE LA 5mC

La 5mC es una marca epigenética estable que agrega información al código genético, es dinámica e inducible por estímulos ambientales, no interfiere con el apareamiento de bases Watson/Crick, pero dependiendo del grado de metilación y su contexto, puede promover o inhibir la separación de las hebras del ADN (Allis y Jenuwein 2016; Jeltsch 2002; Severin et al. 2011; Cassina et al. 2016). Además, la 5mC es el sustrato de las desmetilasas TET (por sus siglas en inglés *Ten-eleven Translocation*), enzimas que tienen un papel clave en la dinámica epigenética de la 5mC durante la generación y el mantenimiento de la diversidad fenotípica (Kohli y Zhang 2013; Wu y Zhang 2017).

En general, la 5mC modula la unión y actividad de proteínas que influyen en la expresión génica a través de dos mecanismos de control transcripcional sobre el promotor: el mecanismo directo, en el que la 5mC previene la unión de los factores de transcripción como E2F, Krox-20 y CREB; y el mecanismo indirecto, mediante la unión de proteínas con dominios de unión a grupo metilo que bloquean la unión de la RNA polimerasa o reclutan complejos remodeladores de la cromatina (Jones 2012; Schübeler 2015).

Hoy en día se sabe que los efectos biológicos de la metilación del ADN dependen de la localización, abundancia, contexto y dinámica de la 5mC, así como de su distribución genómica e intragénica. Por lo que se refiere a la metilación en los promotores, se reconoce el efecto de inhibición de la iniciación de la transcripción y de la elongación (Jones 2012). En cuanto a la metilación de los cuerpos génicos, se ha asociado con mayor expresión génica, probablemente al facilitar la elongación transcripcional y prevenir los eventos de transcripción espurios (Schübeler 2015; Zilberman 2017). Por su parte, la metilación intragénica se ha asociado con la represión y uso de promotores alternativos o variantes de splicing (Zilberman 2017; Karl M. Glastad, Hunt, y Goodisman 2014; Sarda et al. 2012) En cambio, no se conocen bien los efectos de la metilación en las regiones de transición exón-intron y en sus bordes o extremos.

Respecto a las regiones reguladoras como enhancers, silencers e insulators, se ha documentado que al ser metiladas, el efecto es de cambio de la función particular de la región reguladora (Jones 2012; Schübeler 2015). Ahora bien, los efectos de la metilación más documentados son los generados sobre los transposones y en los centrómeros, en los que la metilación produce el silenciamiento de larga duración y la estabilidad cromosómica respectivamente (Jones 2012; Schübeler 2015). En resumen, la metilación del ADN controla y modula la expresión génica a través de la estructura y estabilidad de la cromatina (Schmitz, Lewis, y Goll 2019; Schübeler 2015).

Finalmente, los efectos biológicos de la introducción, mantenimiento y remodelado de la 5mC tienen un papel central en procesos biológicos como la herencia transgeneracional, la compensación de la dosis, la impronta génica, el desarrollo embrionario, la ontogenia celular, la determinación del fenotipo celular y la respuesta a estímulos como el estrés, la respuesta a patógenos y la reparación del ADN. (Santos, Ferreira, y Oliveira 2017; E. Li, Beard, y Jaenisch 1993; Tost 2010).

VÍAS DE SEÑALIZACIÓN

Aunque poco se entiende de la(s) vía(s) de señalización de la metilación del ADN, la conexión directa que tiene con el metabolismo es clara. En principio, la fuente de $-CH_3$ para todas las reacciones biológicas de metilación provienen del metabolismo de un carbono. El metabolismo de un carbono es dependiente de donadores como la metionina y la colina, o de cofactores como el ácido fólico, la vitamina B12 y el fosfato piridoxal para la formación del donador universal SAM. Brevemente, el metabolismo de un carbono consiste en la donación de unidades de carbono de aminoácidos específicos provenientes de nutrientes importados de la dieta o sintetizados, y su posterior distribución para diversos procesos celulares como la biosíntesis celular, la regulación del estado redox, la regulación epigenética y del mantenimiento genómico a través del abastecimiento de la poza de nucleótidos. En este sentido, se ha demostrado que los estímulos nutricionales pueden influir en la expresión génica a través de su conexión con mecanismos epigenéticos (Locasale 2013).

La conexión directa de la metilación del ADN con el metabolismo y su asociación con procesos como la longevidad / senescencia, el cáncer y la respuesta inmune, ponen de relieve a la vía de señalización mTOR (por sus siglas en inglés; *mechanistic Target of Rapamycin Kinase*). La vía mTOR es considerada como un integrador del estado nutricional y de la respuesta al estrés, debido a que su activación es inducida por rifampicina, aminoácidos, insulina, factores inmunes como TNF alfa y condiciones como el déficit energético, la hipoxia, el estrés oxidativo, la radiación ionizante, el acortamiento telomérico y el daño al ADN. mTOR es una vía de señalización que media las respuestas celulares al estrés y está presente desde bacterias, protozoarios, hongos, plantas y animales. Nuevos abordajes que incluyan el estudio de vías de señalización como la vía mTOR, son necesarios para una mejor comprensión de las respuestas epigenéticas a factores ambientales.

MODULACIÓN

La metilación del ADN tiene un vínculo directo con el metabolismo central a través de los intermediarios SAM, 2-oxoglutarato (2-OG), ATP, NAD⁺ y Fe(II), que fungen como sustratos o cofactores de las DNMTs y las desmetilasas TET (Cyr y Domann 2011; Jeltsch 2002; Jeltsch, Nellen, y Lyko 2006). Las fluctuaciones en estos intermediarios provocadas por estímulos fisiológicos o patológicos, tiene efectos directos sobre la dinámica epigenética que conducen a cambios medibles en la expresión génica. Tal es el caso de las variaciones en el contenido de metionina en la dieta, que pueden alterar los niveles de SAH y producir cambios en la expresión génica dependientes de metilación del ADN (Cyr y Domann 2011). La disponibilidad de SAM, ATP, Fe(II) y 2-OG son particularmente importantes para la regulación enzimática de la metilación y la desmetilación, ya que son factores limitantes para las reacciones. Altas concentraciones del producto SAH inhibe la acción de las DNMT's, al igual que la acumulación de succinato generado como producto de la actividad catalítica de las desmetilasas, que tiene un efecto inhibitorio sobre las enzimas TET.

Durante la catálisis, las DNMTs forman un complejo ternario con el ADN blanco y el donador SAM, por lo que modificaciones postraduccionales pueden cambiar la procesividad de la enzima. Se han identificado múltiples modificaciones postraduccionales en las DNMTs de ratón y humano, entre las que se encuentran la fosforilación, la acetilación, la metilación, la ubiquitilación y la SUMOilación; sin embargo, pocas de estas modificaciones se han caracterizado funcionalmente (Jeltsch y Jurkowska 2016b; Estéve et al. 2011; Deplus et al. 2014; Lyko 2018). La fosforilación de Ser515 en DNMT1 está involucrada en la interacción del N-terminal y el dominio catalítico, mientras que la metilación de la Lys142 resulta en la mayor estabilidad de la enzima y el mantenimiento de la metilación del ADN (Jeltsch y Jurkowska 2016b). En cuanto a la fosforilación en Ser146, esta modificación postraducciona l disminuye la afinidad de unión de DNMT1 al ADN (Jeltsch y Jurkowska 2016a). Se ha sugerido que la fosforilación de la Ser215 y Ser219 por la cinasa ATM podría ser requerida para la relocalización de DNMT2 en los gránulos de estrés (Dev et al. 2017). DNMT1 y DNMT3 tienen dominios regulatorios en la región variable N-terminal que interactúan con el dominio catalítico de estas enzimas y son el sitio donde se ha identificado la fosforilación y metilación de las proteínas; en cambio, DNMT2 carece de dominios regulatorios y no se ha reportado regulación dependiente de modificaciones postraduccionales (Estéve et al. 2011; Lyko 2018; Jeltsch y Jurkowska 2016a).

Otro nivel de modulación ocurre a través de la actividad de la familia de las proteínas TET (TET1, TET2 y TET3) que desmetilan activamente al ADN y son el principal elemento antagonista de la metilación genómica. Estas proteínas son dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato y Fe(II) que catalizan la desmetilación de las citosinas en el ADN a través de reacciones de oxidación secuenciales; oxidan a la 5mC para producir 5-hidroximetil-citosina (Kohli y Zhang 2013), y su oxidación adicional para formar 5-formil-citosina y 5-carboxil-citosina (Wu y Zhang 2017). Los grupos formilo y carboxilo son eliminados enzimáticamente con o sin escisión de base, regenerándose así la citosinano metilada.

El siguiente nivel de modulación ocurre a través de las proteínas con dominio de unión a CpG metilado (MBD1, MBD2 y MBD4). Las proteínas MBD poseen gran afinidad por sitios CpG metilados y cuentan con un dominio de represión transcripcional

(TRD) que les permite unirse a diversos complejos represores (Moore, Le, y Fan 2012). Al unirse a citosinas metiladas, las proteínas MBD median el reclutamiento de correpresores transcripcionales como los complejos de desacetilación de histonas, proteínas polycomb y complejos remodeladores de cromatina, que establecen una configuración de cromatina represiva (Zhu et al. 2017).

DETECCIÓN Y ANÁLISIS DE 5MC

Los métodos que se han empleado para estudiar la metilación gen-específico incluyen PCR metilación-específica, qPCR-metilación-específica y conversión con bisulfito de sodio y secuenciación. Por lo que se refiere a el análisis genómico de la metilación, se han empleado extensamente a las enzimas de restricción sensibles a metilación, la conversión por bisulfito de sodio y la captura por afinidad con anticuerpos o proteínas MBDs, para el posterior análisis del mapa de restricción o la secuenciación respectivamente.

En cuanto a el uso de inhibidores de las DNMT's, azacitidina (Vidaza) y 5-aza-deoxicitidina (Decitabina), han sido ampliamente usadas como estrategias complementarias en el estudio de la metilación del ADN. Los azanucleósidos son fármacos inhibidores de la metilación del ADN, actualmente aprobados por la FDA y la Agencia de Medicinas Europea como medicamentos para el tratamiento de neoplasias hematológicas. El mecanismo por el que la azacitidina y la decitabina inhiben la metilación es el mismo, y ocurre a través de la formación de un enlace covalente entre la DNMT y el ADN que las contiene. La azacitosina es incorporada en el ADN, donde sustituye a la citosina. Los dinucleótidos azacitosina-guanina son reconocidos como sustrato natural por las DNMT's, e inician la reacción de metilación a través de un ataque nucleofílico. En ausencia de la azacitosina, se produce la formación de un enlace covalente entre el C6 del anillo de la citosina y la enzima. Normalmente la unión se resuelve por la beta-eliminación del C5, pero la reacción es bloqueada por la azacitosina, donde el C5 está sustituido por el N5. Por lo tanto, la DNMT permanece unida covalentemente al ADN y su función se bloquea irreversiblemente; como

consecuencia de ello, las marcas de la metilación se pierden. (Stresemann y Lyko 2008).

ADN METILTRANSFERASA 2

DNMT2 es la ADN metiltransferasa más conservada pero su papel en la metilación del ADN ha sido debatible. Los primeros intentos por definir la funcionalidad de DNMT2 a través de fenotipos mutantes nulos, fallaron al no producir defectos evidentes. Tampoco se detectaron cambios en la metilación global de ADN en células embrionarias de ratón deficientes en *dnmt2* (Okano, Xie, y Li 1998), y la actividad catalítica *in vitro* de la DNMT2 humana sobre el ADN era apenas detectable (0,7% de todas las citosinas) (Hermann, Schmitt, y Jeltsch 2003). Actualmente se reconoce que los métodos empleados para determinar la actividad de DNMT2 no fueron lo suficientemente sensibles para detectar las cantidades de 5mC presentes en el ADN. En cambio, con el uso de métodos altamente sensibles, se ha logrado la detección de cantidades muy pequeñas de residuos metilados en el ADN y la demostración de la actividad catalítica en ensayos bioquímicos directos.

La primera evidencia convincente de la funcionalidad de DNMT2 como una metiltransferasa de ADN activa, fue la detección de 5mC en el ADN de *Drosophila* (Gowher, Leismann, y Jeltsch 2000; Lyko, Ramsahoye, y Jaenisch 2000). Se probó que la sobreexpresión del transgen *dnmt2* produce hipermetilación del ADN con un incremento en la vida media útil en la mosca del 58%, mientras que en el mutante nulo de *dnmt2* no se detectó metilación en el ADN y exhibió una vida media útil disminuida (Lin et al. 2005). Además, la interferencia de la expresión de *dnmt2* en embriones de *Drosophila* mediante iRNA, eliminó toda la 5mC genómica; no obstante, no se observaron anomalías evidentes en el desarrollo ni en la fertilidad de las moscas (Kunert et al. 2003).

En 2009, Phalke y colaboradores corroboraron la funcionalidad de DNMT2 en embriones de *Drosophila* y demostraron que las moscas mutantes nulas para *dnmt2*

pierden completamente la metilación en su ADN (Phalke et al. 2009). La cantidad máxima de 5mC en el ADN de *Drosophila* está presente durante la etapa embrionaria (0-3 h), en concordancia con la máxima cantidad de DNMT2 encontrada en embriones de las moscas. Mediante los análisis de restricción enzimática con *SgeI* (secuencia de restricción: 5mCpNpNpG), conversión por bisulfito y secuenciación, probaron que en células somáticas de *Drosophila* el silenciamiento de retrotransposones es dependiente de la metilación del ADN y ésta a su vez, es dependiente de DNMT2. En embriones, la hipermetilación de la secuencia 5'-LTR del retrotransposón *Invader4* es mediada por DNMT2 y la supresión de la expresión del retrotransposón en células somáticas es dependiente de la actividad de DNMT2. Además, demostraron que DNMT2 controla la integridad cromosómica de 2R y 3R. La función de DNMT2 es importante para la estabilidad cromosómica al interactuar con la metiltransferasa SUV4-20 y favorecer su actividad sobre regiones teloméricas; la marca H4k20me3 está ausente en células somáticas mutantes nulas para *dnmt2*^{-/-} y exhiben una sobreexpresión de *Invader4* y de los transposones *rt1b* y de *rb* (Phalke et al. 2009).

CONSERVACIÓN GENÓMICA DE DNMT2

DNMT2 es la DNMT más conservada y ampliamente distribuida entre los eucariontes (Bewick et al. 2016). La mayoría de los genomas eucariontes codifican para al menos *dnmt2*, con las notables excepciones de *Caenorhabditis elegans*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Oikopleura dionica* que no codifican para *dnmt* alguna y su genoma es carente de 5mC (Durdevic y Schaefer 2013). DNMT2 está presente en todos los organismos que cuentan con DNMT1 y/o DNMT3, mientras que en otros organismos está presente como la única DNMT (Ashapkin, Kutueva, y Vanyushin 2016). En los insectos dípteros como *Drosophila melanogaster*, *Anopheles gambiae* y *Aedes albopictus*, la única *dnmt* codificada en sus genomas es *dnmt2*; este gen es evolutivamente estable en los insectos (Regev, Lamb, y Jablonka 1998) (Figura 3). Otros insectos cuentan con más de un gen codificante para *dnmt*'s y confirman el hecho de que *dnmt2* está presente universalmente como copia única: el escarabajo *Tribolium castaneum* y el gusano *Bombyx mori* cuentan con un gen *dnmt1* y un gen

dnmt2; la abeja *Apis mellifera* tiene dos copias génicas de *dnmt1*, un gen *dnmt2* y uno *dnmt3*; por último, la avispa *Nasonia vitripennis* posee tres copias génicas de *dnmt1*, un gen *dnmt2* y un gen *dnmt3* (Glastad et al. 2011; Glastad et al. 2016).

Figura 3. Conservación de DNMT2

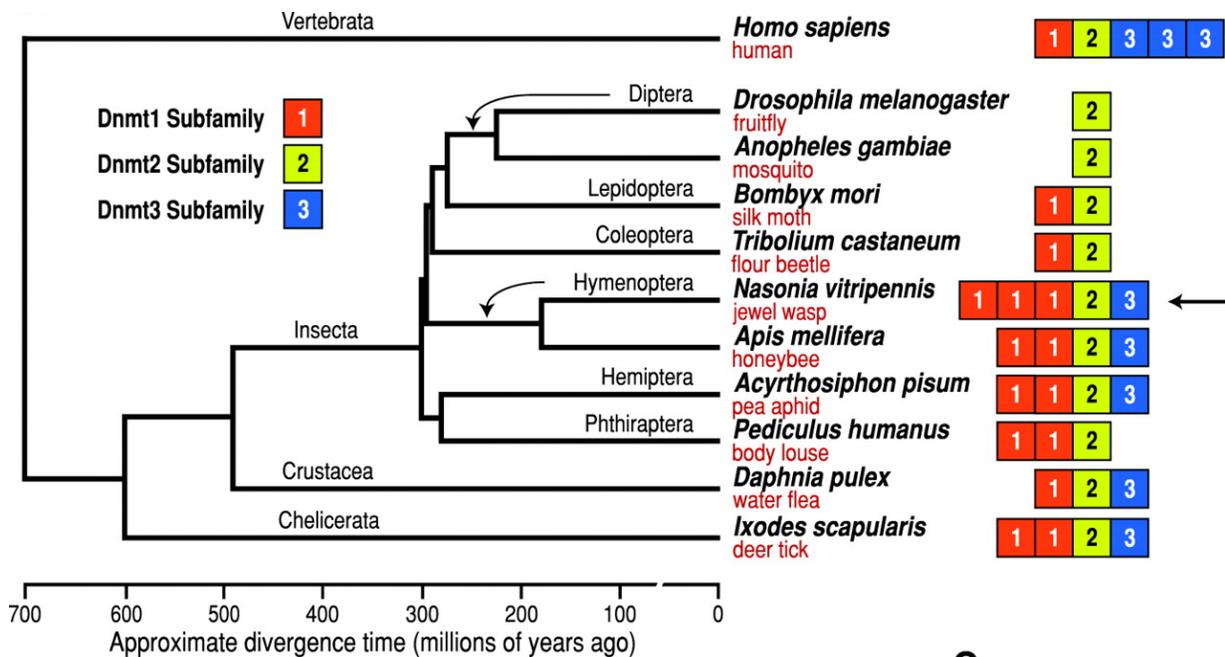


Figura 3. DNMT2 es la ADN metiltransferasa evolutivamente más conservada. Representación de las relaciones filogenéticas entre los sistemas de metilación del ADN entre insectos con genomas secuenciados. Se representan las subfamilias de ADN metiltransferasa (Dnmt1, Dnmt2, Dnmt3) en diversos taxones. Tomado de Richards, et al 2010.

CARACTERÍSTICAS DE LA PROTEÍNA Y CATÁLISIS

DNMT2 comparte la estructura fundamental del dominio catalítico y el mecanismo por el que las ADN metiltransferasas metilan a las citosinas: giran la base blanco fuera de la hélice del ADN y la entierran en pocket hidrofóbico de su centro catalítico. Las enzimas DNMT2 contienen un tripéptido invariante CFT en el motivo TRD, que es una característica específica de este miembro de la familia de las metiltransferasas. DNMT2 contiene todas las secuencias motivo características de la región catalítica DNA (citosinina-5)-metiltransferasa así como el motivo TRD localizado entre los motivos VIII y IX, sin embargo, carece del dominio regulatorio N-terminal presente en DNMT1 y DNMT3 (Figura 4). En cuanto a la catálisis, DNMT2 realiza la metilación de citosinas mediante el mismo mecanismo conservado de todas las ADN C5-MeTfs y lleva a cabo la reacción mayoritariamente fuera de contexto CpG. DNMT2 es una citosina-C5-metiltransferasa con alta especificidad para metilar ARN; los residuos C79 (motivo IV), E119 (motivo VI), R160 y R162 (ambos del motivo VIII) son absolutamente requeridos para la metilación del ARN, mientras que el residuo C292 del dominio TRD es importante pero no absolutamente necesario. (Jurkowski y Jeltsch 2011; Jeltsch, Nellen, y Lyko 2006; Raddatz et al. 2013).

Figura 4. Estructura de DNMT2



Figura 4. Representación esquemática de DNMT2 y los motivos prototipo de las ADN metiltransferasas en números romanos (I, II, IV, V, VI, VII, VIII, CFT, IX y X)

BLANCOS DE METILACIÓN

Parte sustancial del estudio de DNMT2 se ha realizado en *Drosophila melanogaster*, el insecto modelo preponderante. En *Drosophila*, los blancos predominantes de metilación genómica son los sitios CpA y CpT de regiones distales a promotores y de las secuencias codificantes. La mayor actividad catalítica de DNMT2 sobre ADN en *Drosophila* es en retroelementos (Phalke et al. 2009). En mamíferos, DNMT2 no participa en la metilación genómica, pero metila ARN con una especificidad muy alta (Jurkowski et al. 2012a). DNMT2 metila ARN empleando el mecanismo catalítico típico de las DNMTs, que es claramente diferente al mecanismo de otras ARN metiltransferasas (Jurkowski et al. 2012b). En este mismo sentido, análisis filogenéticos detallados sugieren que el ancestro de DNMT2 fue una ADN metiltransferasa que incorporó al ARNt como sustrato (Jurkowski y Jeltsch 2011). DNMT2 metila ARN mensajeros (ARNm), ARN no codificantes largos (ARNnl), ARN ribosomal (ARNr) y especialmente ARN de transferencia (ARNt), entre los que destacan el del aspártico (ARNtAsp-GTC), el de la valina (ARNtVal-AAC) y el de la glicina (ARNtGly-GCC). En *Drosophila*, estos ARNt aparecen altamente metilados (Kaiser et al. 2017; Jeltsch, Nellen, y Lyko 2006).

LOCALIZACIÓN SUBCELULAR

DNMT2 se localiza principalmente en el núcleo (Kunert et al. 2003), aunque se ha encontrado en el citoplasma y en otros componentes celulares como los gránulos citoplásmicos de estrés (Schaefer et al. 2010; Durdevic, Mobin, et al. 2013) y en el nucleosoma (Schaefer, Steringer, y Lyko 2008). En embriones de *Drosophila*, la mayoría de la DNMT2 inmunorreactiva se detecta en la fracción citoplasmática, sin embargo, también hay una cantidad significativa en la fracción nuclear, en donde se asocia a la matriz nuclear (Schaefer, Steringer, y Lyko 2008). DNMT2 se distribuye dinámicamente durante el ciclo celular; durante la fase S, la distribución de DNMT2 es ubicua pero al inicio de la mitosis se concentra rápidamente en los núcleos.

EXPRESIÓN EN TEJIDOS Y SU TEMPORALIDAD

DNMT2 es detectable en todas las etapas de vida de *Drosophila*. La expresión máxima de *dnmt2* se observa en el embrión de 8 h (Lyko, Ramsahoye, y Jaenisch 2000; Hung et al. 1999; Schaefer et al. 2010) y en las moscas adultas se expresa más activamente en ovarios y testículos (Lyko, Ramsahoye, y Jaenisch 2000). En larvas, *dnmt2* se expresa en glándulas salivales, en la tráquea y en el cerebro, en donde se localiza principalmente en neuroblastos en división. Al interferir la expresión de *dnmt2* mediante iARN, se interrumpe el desarrollo normal del ojo. En adultos se ha detectado una expresión baja en cerebro y en la carcasa. DNMT2 tiene el pico de abundancia en embriones de 18 a 20 h y va disminuyendo en larva y pupa en oleadas hasta alcanzar los menores niveles en adulto (Lyko, Ramsahoye, y Jaenisch 2000; Hung et al. 1999; Schaefer et al. 2010).

PROCESOS EN LOS QUE PARTICIPA LA DNMT2

DNMT2 es una metiltransferasa cuya función enzimática y de unión ácidos nucleicos ha sido probada. Los procesos biológicos en los que participa DNMT2 son: 1) mantenimiento del tiempo de vida de moscas adultas (Lin et al. 2005); 2) metilación del ADN (Tang et al. 2003); 3) la metilación del ADN relacionado con el desarrollo embrionario (Phalke et al. 2009; Kunert et al. 2003); 4) el silenciamiento génico (Phalke et al. 2009); 5) la regulación positiva de la respuesta de defensa contra virus (Durdevic, Hanna, et al. 2013); 6) la regulación positiva de la respuesta inmune innata (Durdevic, Mobin, et al. 2013); 7) la regulación de la estabilidad de ARNt (Genencher et al. 2018); 8) la respuesta al estrés inducido por choque térmico (Genencher et al. 2018; Schaefer et al. 2010); 9) la respuesta al estrés oxidativo (Schaefer et al. 2010); 10) el mantenimiento telomérico (Phalke et al. 2009) y 11) la metilación del ARNt (Genencher et al. 2018; Schaefer et al. 2010; Goll et al. 2006).

LA METILACIÓN DEL ADN ES INDUCIDA POR FACTORES AMBIENTALES

A pesar de que la metilación en el ADN es una marca estable, no es definitiva y ocurren cambios fisiológicos en el perfil de metilación durante el desarrollo, la metamorfosis y el envejecimiento. En insectos, factores como la nutrición, el estrés nutricional, el estrés térmico y las infecciones son importantes inductores de cambios en la metilación (Cridge et al. 2017; Vilcinskas 2017).

La regulación de la biodisponibilidad y el destino de los metabolitos compartidos entre los procesos metabólicos y epigenéticos resultan particularmente importantes durante la respuesta celular a estímulos estresantes. Tal es el caso del mantenimiento del estado redox y la disponibilidad de los sustratos para las reacciones de metilación, debido a que están vinculados a través de la síntesis de glutatión y el metabolismo de la metionina (Locasale 2013). Primeramente, el glutatión es un tripéptido formado por glutamato, cisteína y glicina, y es responsable en gran medida de mantener el estado redox celular. Luego, la síntesis de glutatión es fuertemente regulada por la biodisponibilidad de la cisteína, pues es el sustrato limitante para su síntesis. Después, la metionina es una fuente importante de carbono para la síntesis del donador SAM y es, además, una fuente potencial de cisteína a través de series de reacciones de múltiples pasos que involucran a los intermediarios SAM, SAH, homocisteína y cistationina. Finalmente, la síntesis de metionina y de glutatión están vinculadas a través de la vía de la transulfuración, en la que la síntesis de *novo* de cisteína puede provenir de la metionina a través de dicha vía (Cyr y Domann 2011; Locasale 2013).

Un segundo ejemplo de la influencia de los factores ambientales sobre la metilación del ADN, son los cambios epigenéticos inducidos por la dieta. Los nutrientes como la metionina influyen directamente el metabolismo de SAM/SAH y afectan la expresión génica a través de mecanismos epigenéticos. Variaciones en la ingesta dietética de metionina, pueden alterar los niveles de SAH y producir cambios en la expresión génica que son dependientes de metilación del ADN. El remodelado del perfil de metilación es particularmente vulnerable a factores nutricionales durante los periodos prenatal y postnatal temprano de los animales, con marcados efectos en el crecimiento y desarrollo. (Zhang 2018).

Otros factores estresantes como las infecciones y el estrés térmico han sido evaluados en la mosca. En *Drosophila*, la función de DNMT2 es indispensable para el control de los virus de ARN mediante la vía de ARN interferentes y dependientes de Dicer-2 (Durdevic, Mobin, et al. 2013). En lo que se refiere al choque térmico en *Drosophila*, éste induce la expresión de *dnmt2* y su correlación positiva con la expresión de *hsp22*, *hsp23* y *hsp26*. La sobreexpresión de estas chaperonas junto con *dnmt2* en respuesta al estrés térmico, incrementan la vida media útil de la mosca, así como la metilación de los ARNt dependientes de DNMT2 que los protege de la degradación inducida por el estrés. (Schaefer et al. 2010).

METILACIÓN DEL ADN EN INSECTOS

En *Drosophila*, la cantidad de 5mC global es tan baja como el 0.1-0.6% de todas las citosinas genómicas (Gowher, Leismann, y Jeltsch 2000; Lyko, Ramsahoye, y Jaenisch 2000; Phalke et al. 2009; Lin et al. 2005) y la mutación nula del gen *dnmt2* no mostró anomalías aparentes en el desarrollo (Lin et al. 2005). Estos niveles bajos de metilación en el ADN de los dípteros han generado controversia con respecto a su importancia biológica e incluso, han sido considerados como sutiles o nulos (Regev, Lamb, y Jablonka 1998; Bewick et al. 2016).

Otros insectos como las abejas, avispas y moscas de sierra tienen sistemas de metilación más complejos que comprenden a DNMT1, DNMT2 y DNMT3 (Bewick et al. 2016). Por ejemplo, *Apis mellifera* tiene aproximadamente 1.4% de sus citosinas genómicas totales metiladas (Feng et al. 2010) y su sistema de metilación ha sido estudiado en relación con la actividad transcripcional y la plasticidad fenotípica (Sarda et al. 2012; Feng et al. 2010; Flores et al. 2012; Zeng y Yi 2010). En otros insectos como los escarabajos con cuernos, *Tribolium castaneum* y *Galleria mellonella*, se ha demostrado que la metilación de su ADN desempeña un papel en la generación de diferentes fenotipos, cambios en la plasticidad conductual y nutricional, así como en las respuestas al estrés inducidas por el calor o las infecciones (Snell-Rood, Troth, y Moczek 2013; Vilcinskas 2016; Maleszka 2016).

En los mosquitos, no se entiende bien si la metilación del ADN juega un papel esencial en su desarrollo, nutrición o respuesta inmune (Adams et al. 1979; Bianchi, Vidal-Rioja, y Cleaver 1986; Marhold et al. 2004; Ye et al. 2013; Falckenhayn et al. 2016; G. Zhang et al. 2013). Adams y McKay reportaron niveles bajos pero medibles en mosquitos *Aedes*; a través de cromatografía de intercambio iónico lograron una detección global de 5mC de 0.036% del total de citosinas en ADN de células de *Aedes albopictus*. (Adams, McKay, Craig, & Burdon, 1979) Casi una década después, Bianchi y Vidal-Rioja buscaron la presencia de 5mC en cromosomas *Aedes albopictus* a través de un abordaje indirecto: mediante el uso los isoesquizómeros *HpaII* y *MspI*, encontrando resistencia a la digestión de las regiones centroméricas. Al tratar a las células de *Aedes* con azacitidina, encontraron que los cromosomas se hacen susceptibles a la digestión por la enzima de restricción sensible a metilación *HpaII*. (Bianchi, Vidal-Rioja, & Cleaver, 1986). Más tarde, Marhold y cols., detectaron la presencia de 5mC genómica mediante la técnica *slot blot*, en ADN embrionario de *Drosophila melanogaster*, *pseudoobscura* y en el mosquito *Anopheles gambiae*. (Marhold et al. 2004)

METILACIÓN DEL ADN E INFECCIONES

La metilación del DNA regula la expresión de genes inducibles por retos inmunológicos. Fallas en el adecuado establecimiento o mantenimiento de los patrones de metilación en el DNA llevan a la disfunción celular y a condiciones de susceptibilidad o desarrollo de infecciones recurrentes. Actualmente se han estudiado los cambios en los patrones de metilación del ADN en las enfermedades infecciosas humanas causadas por los virus VIH, hepatitis B, papiloma humano, influenza, retrovirus y Epstein-Barr, seguidas de las causadas por bacterias como *Salmonella sp*, *H. pylori*, *P. aeruginosa* y *M. tuberculosis* (Tost 2010). No obstante al amplio campo de estudio de la metilación del ADN, se tiene poca información sobre la función de la 5mC en infecciones causadas por protozoarios como la malaria.

MOSQUITOS *ANOPHELES* Y SU INFECCIÓN CON *PLASMODIUM*

La malaria es un problema de salud mundial que produjo 228 millones de casos y 405 000 muertes en 2018 (OMS, 2020; <https://www.who.int/malaria/en/>). La malaria humana se transmite por la picadura de mosquitos hembra del género *Anopheles* infectadas con parásitos del género *Plasmodium*.

Cuando una hembra *Anopheles* se alimenta con sangre de un hospedero infectado con *Plasmodium*, los parásitos ingeridos en la sangre (~10 000 eritrocitos infectados) inician el proceso de fertilización y diferenciación dentro del lumen intestinal (Figura 5). En un lapso de 10 a 25 h, alrededor de 1000 de los parásitos ingeridos logran diferenciarse a la forma invasiva del parásito; el oocineto. Transcurridas las primeras 24 h, sólo 100 de los oocinetos logran invadir y atravesar el epitelio intestinal. Menos de 10 de los oocinetos lograrán alojarse en la lámina basal del intestino para continuar su desarrollo y transformarse en ooquistes. Después de ~10 días, cada ooquiste maduro liberará cientos o miles de esporozoitos hacia la cavidad hemocélica, a través de la cual, decenas o cientos, llegarán hasta las glándulas salivales. Finalmente, miles de esporozoitos establecen la infección de las glándulas salivales del mosquito, donde serán inoculados junto con la saliva en alimentaciones posteriores. (Angrisano et al. 2012; Vlachou et al. 2004; Phillips et al. 2017).

Figura 5. Dinámica de infección parasitaria en mosquitos

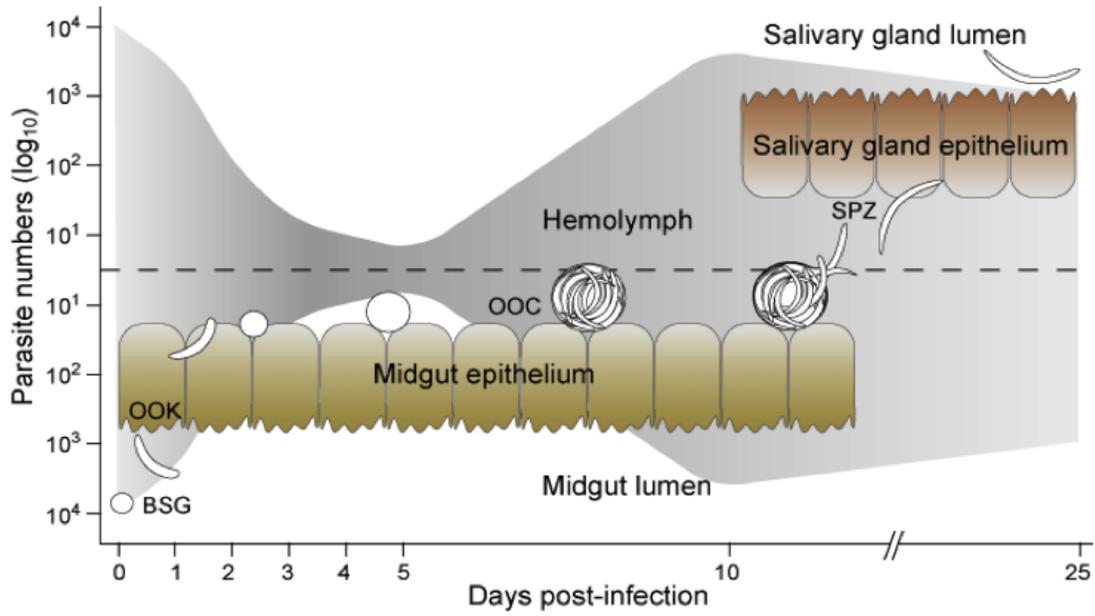


Figura 5. Establecimiento de la infección parasitaria en mosquitos *Anopheles*. Se representan las variaciones en la carga parasitaria y el establecimiento de la infección del intestino y las glándulas salivales de *Anopheles*, en relación al tiempo desde la alimentación sanguínea de un hospedero vertebrado infectado con *Plasmodium*. Están representadas las diferentes estadios del desarrollo de *Plasmodium*: gametocitos intra-eritrocíticos (BSG), oocinetos (OOK), ooquistes (OOC) y esporozoitos (SPZ). En gris degradado se esquematiza el cambio en el número de parásitos con respecto al tiempo. Tomado de Christophides 2005.

RESPUESTA INMUNE Y RESISTENCIA DE ANOPHELES CONTRA PLASMODIUM

La respuesta inmune innata de los anophelinos es el principal mecanismo de defensa y resistencia contra *Plasmodium*. La respuesta inmune contra el parásito se produce en el intestino, en la cavidad hemocélica, en el cuerpo graso y en las glándulas salivales del mosquito (Clayton, Dong, y Dimopoulos 2014). El sitio crítico para el establecimiento de la infección en mosquito es el intestino, donde los parásitos deben diferenciarse en oocinetos invasivos capaces de colonizar el intestino y formar ooquistes (Angrisano et al. 2012; Phillips et al. 2017).

A lo largo de su trayecto por los hospederos, la mayor reducción del número de parásitos *Plasmodium* ocurre en el intestino medio del mosquito. El ambiente digestivo del intestino, la formación de la matriz peritrófica y la rápida respuesta inmune contra el parásito, producen el mayor *cuello de botella* de la población parasitaria. Por lo anterior, el intestino medio de los mosquitos es un blanco de intervención prometedor para bloquear la transmisión (Whitten, Shiao, y Levashina 2006; Vinetz 2005; Churcher et al. 2012).

El entendimiento de las bases moleculares de la resistencia contra *Plasmodium* de cepas anophelinas ha sido crucial en el desarrollo de estrategias para el control de la transmisión de la Malaria y para el entendimiento de la inmunología en insectos (Sinden, Alavi, y Raine 2004). Las diferencias en la intensidad de la infección que ocurre naturalmente en mosquitos vectores de la misma especie han sido de gran interés y objeto de estudio desde mediados del siglo pasado (Jeffery, G M. et al., 1950). (Warren et al. 1979; W. Collins et al. 1979S.; Adams, D; Underhill, A; Eggleston 2005; A. Blandin et al. 2009; Shinzawa et al. 2013; Hurd, H; Taylor, P.J Eldering et al. 2016) En mosquitos resistentes, los mecanismos de eliminación del parásito son la encapsulación melanótica y la lisis (S. A. Blandin et al. 2009; Fraiture et al. 2009; Eldering et al. 2016; Le et al. 2012).

Actualmente se han identificado múltiples marcadores de la respuesta inmune de mosquitos que están relacionados con diferentes grados de resistencia a *Plasmodium* (Osta, Christophides, y Kafatos 2004; S. Blandin et al. 2004; Sinden, Alavi, y Raine

2004; Fraiture et al. 2009). Éstos marcadores inmunes participan en las fases de reconocimiento, regulación, transducción de señal, o son efectores o mediadores de la lisis, la melanización y la fagocitosis de *Plasmodium* (Martínez-Barnetche et al. 2012; Christophides et al. 2002; Osta, Christophides, y Kafatos 2004). Tal es el caso de la inmunolectina con dominio de fibrinógeno 3 (FREP3) que ha sido implicada en el reconocimiento y el fenómeno de lisis en respuesta a la infección con *Plasmodium* (Ghosh et al. 2011).

Se han estudiado dos proteínas de unión a carbohidratos dependientes de calcio que tienen efectos antagónicos en la infección de los mosquitos con *Plasmodium*: la lectina tipo C 6 (CTL6) y la lectina tipo C 4 (CTL4). CTL6 media la respuesta de opsonización y melanización en *Anopheles*, mientras que CTL4 inhibe la melanización del oocineto de *P. berghei*, por lo que es considerada como un factor agonista de la infección. (Osta, Christophides, y Kafatos 2004; Volz et al. 2006). Por su parte, la proteína con enlace tioéster 1 (TEP1) es el efector más estudiado en la actualidad; estudios en *A. gambiae* y *A. stephensi* muestran que los grados de resistencia están relacionados con la participación de TEP1 (S. Blandin et al. 2004; Le et al. 2012; S. A. Blandin et al. 2009; Eldering et al. 2016). TEP1 posee un dominio de factor de complemento C3/C4/C5 y está implicada en el reconocimiento, la melanización y lisis de *Plasmodium*. (S. Blandin et al. 2004). TEP1 forma un complejo ternario con la proteína con repetidos ricos en leucina 1 (LRIM1) y la proteína APLC1, que estabilizan la conformación de TEP1 durante la melanización y la lisis del parásito *Plasmodium*. (Le et al. 2012). Otros efectores ampliamente estudiados son las oxidasas duales (DUOX) y las fenol-oxidasas (PO). Las proteínas DUOX son un grupo de enzimas hemoperoxidasas con un dominio NADPH, presentes en los epitelios y que participan en las respuestas de defensa local produciendo especies reactivas de oxígeno. (Donko et al. 2005). En cuanto a las PO, son un grupo de enzimas que hidroxilan monofenoles a catecoles y oxidan catecoles para formar quinonas que al polimerizarse forman melanina. (An et al. 2011). En el caso particular de la pro-PO1, es una pro-enzima esencial que se produce en todas las etapas del desarrollo del mosquito y participa en la melanización.

ANOPHELES ALBIMANUS

En México, las especies de mosquitos vectores de *Plasmodium* más importantes son: *A. pseudopuntipennis*, *A. albimanus*, *A. vestitipennis*, *A. cruzians* y *A. darlingi* (Secretaría de Salud et al. 2011). *A. albimanus* es uno de los principales vectores de la malaria en América Central, la región norte de América del Sur y el Caribe. Este vector neotropical habita en la costa atlántica (desde Texas hasta Venezuela) y la del pacífico (desde México al norte de Perú), así como en la mayoría de las islas del Caribe (Conn, Quiñones, y Póvoa 2016).

El hábitat del mosquito *A. albimanus* puede ser natural o artificial, cuyos sitios larvales son abiertos, soleados y con agua clara. Las larvas toleran una amplia variación química del agua y son capaces de explotar diversas fuentes de alimento que les permite sobrevivir en agua dulce (canales de riego, estanques, pantanos, márgenes de ríos) y salobre (manglares).

El desarrollo de *A. albimanus* tiene una duración de 14 días en promedio y consta de cuatro etapas: huevo, larva (L1, L2, L3 y L4), pupa y adulto. Como adultos, los machos se alimentan de néctares y tienen una longevidad de 14 días, mientras que la dieta de las hembras consta de sangre y néctares, y su longevidad es de 30 días. El mosquito tiene un comportamiento predominantemente exófago y exofílico, con tendencia zoofílica y actividad antropofílica. Tras la hemoalimentación, las hembras oviponen de 50 a 200 huevos por individuo.

FENOTIPOS. *A. albimanus* presenta durante la etapa de larva y pupa al menos dos fenotipos que se distinguen entre sí por la presencia de un marcador morfológico denominado franja (st, del inglés *stripe*) (Georghiou, Gidden, y Cameron 1967) (Figura 6). El fenotipo blanco (B) exhibe una capa de pigmento blanco visible debajo de la cutícula del dorso del abdomen y el tórax, dispuesta en menor densidad en las regiones intersegmentales y mayor hacia la línea media, delineando una franja blanca (Benedict et al. 1986). Por su parte, el fenotipo sin franja o Café (C) muestra una coloración homogénea en todo el dorso sin coloración blanca visible. En etapa adulta, el marcador morfológico ya no es visible y los fenotipos son indistinguibles. *A. albimanus*

naturalmente presenta estas variantes fenotípicas durante su desarrollo, que se asocian con distintos niveles de infección por *Plasmodium* en la etapa de adulto. *A. albimanus* fenotipo Blanco es significativamente más susceptible a la infección con *Plasmodium vivax* que el fenotipo Café (Fenotipo Blanco: prevalencia 57%; 446.7 parásitos/intestino) (Fenotipo Café: prevalencia del 38,8%; 115.4 parásitos/intestino) (Chan et al. 1994).

Figura 6. Ontogenia de *Anopheles albimanus*

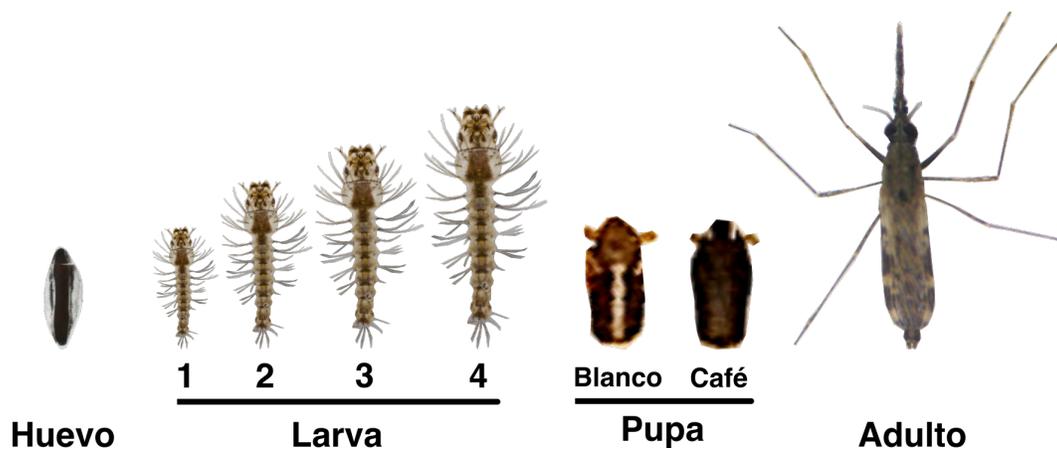


Figura 6. Etapas del desarrollo de *Anopheles albimanus* y los fenotipos blanco y café en etapa de pupa.

GENOMA. El genoma de *A. albimanus* fue secuenciado y publicado en 2014, como parte del proyecto de 16 genomas anophelinos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/11556>). El tamaño del genoma es de 170 508 315 pb y se encuentra organizado en tres pares de cromosomas ($2n=6$): dos autosomas metacéntricos denominados con el número 2 y 3, y un par de cromosomas sexuales X y Y (Figura 7). El genoma contiene 12 431 genes, de los cuales 12 109 genes son codificantes para proteínas, 320 genes pequeños no codificantes (~200 bases que son transcritos, pero no traducidos y que incluyen a ARNmi, ARNmisc, ARNr, ARNsc, ARNsnl, ARNsno y ARNsn) y dos ARNln. El genoma de *A. albimanus* está compuesto por el 49% de CG y el 51% de AT, tiene un contenido de repetidos pequeño (<2%). En glándulas salivales de larva, el genoma es altamente politenizado (Faran 1980; Artemov et al. 2016; Hobbs, 1962).

TRANSCRIPTOMA. En 2012 se ensambló el transcriptoma del intestino de la hembra adulta (16,669 transcritos) e infectada con *Plasmodium vivax* (Martínez-Barnetche et al. 2012). Se reportó que el intestino expresa diferencialmente 385 genes relacionados con la inmunidad. Estos genes se agruparon en 27 familias implicadas en las fases de: reconocimiento, regulación, transducción de la señal y los efectores.

Figura 7. Panorama genómico de *Anopheles albimanus*

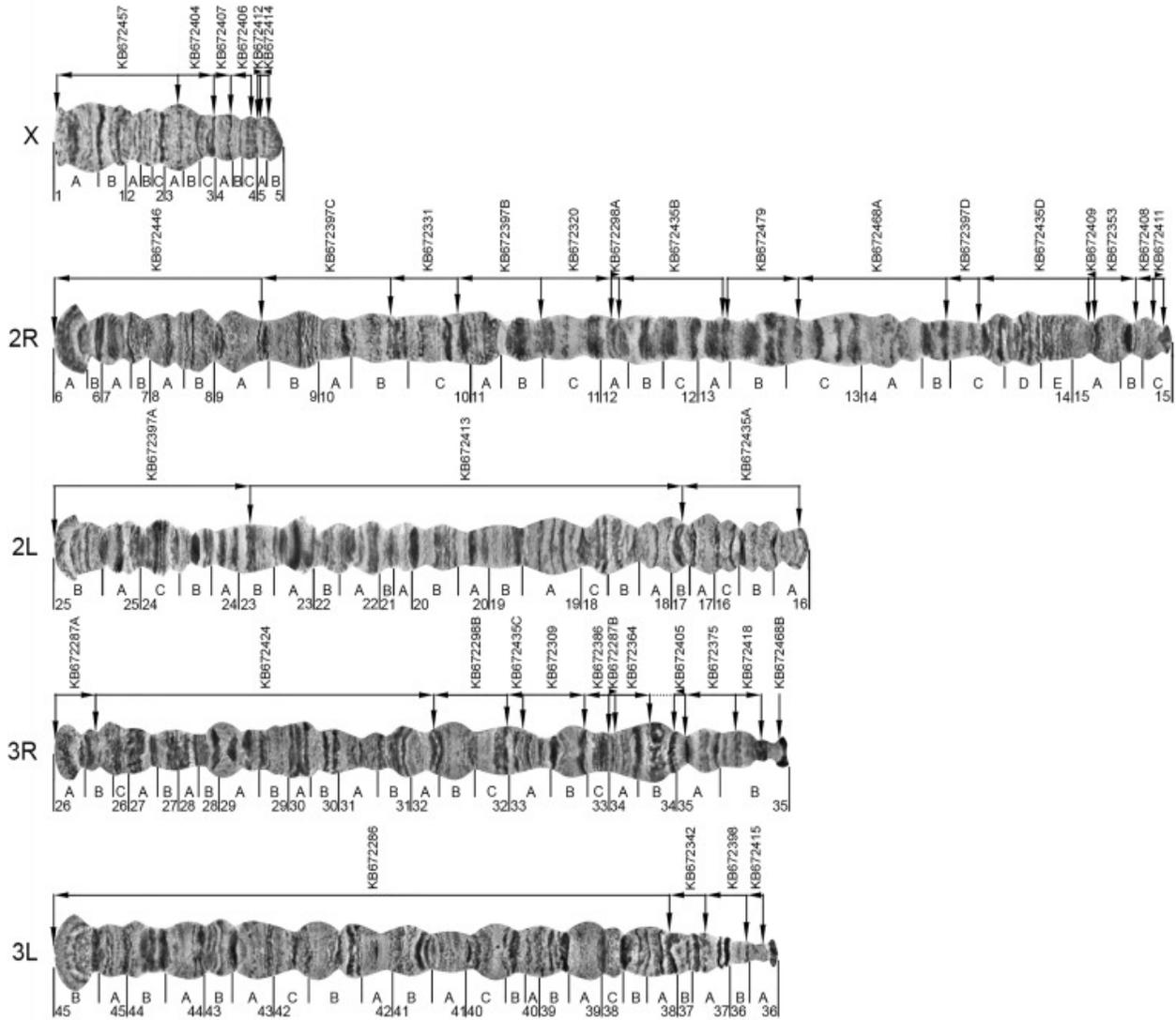


Figura 7. Fotomapa citogenético de *Anopheles albimanus*. Se muestran las divisiones cromosómicas numeradas y las subdivisiones con letras debajo de las imágenes cromosómicas. Las líneas horizontales y las flechas indican el orden y la orientación genómica. Tomado de Artemov et al. 2016.

PROPUESTA

El intestino medio de *Anopheles* es un modelo apropiado para estudiar mecanismos de regulación epigenética en conjunto con la respuesta inmune de mosquitos vectores, al ser el sitio de convergencia de señales nutricionales, endócrinas, neuronales e inmunológicas. En insectos, el intestino es una barrera fundamental contra la invasión de patógenos y es un órgano que despliega una rápida respuesta inmune local contra parásitos como *Plasmodium*. Por su naturaleza inducible, los efectores de la respuesta inmune son buenos candidatos para ser regulados por los mecanismos epigenéticos, al requerir de un programa que permita coordinar respuestas rápidas de activación, represión y reversibilidad ante estímulos. En este trabajo de investigación se propuso analizar la relación entre la metilación del ADN y la expresión de genes de la respuesta inmune intestinal en dos fenotipos de *A. albimanus* en el contexto de la infección con *P. berghei*.

SEGUNDA PARTE
RESULTADOS

RESULTADOS

I. A. *ALBIMANUS* POSEE UN SISTEMA DE METILACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS FUNCIONAL Y NECESARIO PARA EL DESARROLLO DEL MOSQUITO

Para determinar la presencia de los componentes necesarios para el establecimiento y remodelado de patrones de metilación de ácidos nucleicos en *A. albimanus*, se buscaron bioinformáticamente las secuencias de ADN codificantes para las proteínas involucradas en su metilación (Figura 8A y Figuras S1-S3). Se identificaron tres genes únicos que codifican para tres componentes del sistema de metilación: una ADN (citosina-C5)-metiltransferasa 2 (*dnmt2*), una desmetilasa de metilcitosina *tet2* (*tet2*) y una proteína con dominio de unión a CpG metilado (*mbd*). Se corroboró la identidad de las tres secuencias a través su análisis y clasificación de dominios en InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) (Figura 8A y Figuras S1-S3). La presencia de *dnmt2* (AALB003610), *tet2* (AALB005657) y *mbd* (AALB005086) en el genoma de *A. albimanus* indican que este organismo tiene todos los componentes necesarios para la regulación génica por metilación de ácidos nucleicos y un sistema de metilación claramente conservado.

El intestino de los mosquitos vectores es una barrera de defensa fundamental contra la invasión de patógenos como *Plasmodium* (Sinden 2004; Abraham y Jacobs-Lorena 2004). Por la gran importancia de este órgano en el establecimiento de la infección parasitaria en el vector, se buscó la presencia de la 5mC en ADN y ARN como evidencia de la funcionalidad de *dnmt2*, la única metiltransferasa presente en el mosquito capaz de metilar ADN. Se encontró la marca epigenética en el ADN genómico del intestino medio (Figura 8B; intensidad media de pixeles: intestino medio = 10.26 ± 2.3 ; C+ = 44.2 ± 3.2) y en ARN total (Figura S4; 5mC% = 0.73 ± 0.11 ; después del tratamiento con azacitidina 5mc% = 0.48 ± 0.16) (Figura 8B y Figura S4).

Con el objetivo de poner a prueba el papel biológico de la metilación y, con base en el carácter indispensable de la marca epigenética durante la ontogenia, se determinó su funcionalidad durante el desarrollo del mosquito. Primero, se evaluó el perfil

transcripcional de *dnmt2* y *tet2* en las cinco etapas de desarrollo: larva 1 (L1), larva 2 (L2), larva 3 (L3), larva 4 (L4) y pupa (P). Ambos genes se transcribieron durante todo el desarrollo del mosquito y durante la etapa de adulto (Figura 8C). Posteriormente se evaluó el efecto de la inhibición de la metilación en las primeras etapas del desarrollo larvario. El tratamiento inhibidor de la metilación afectó sustancialmente el desarrollo de *Anopheles*; la inhibición de la metilación fue incompatible con la viabilidad larvaria y condujo a la muerte del organismo tempranamente (L1; día 4 post-eclosión) (Figura 8D). En contraste, la supervivencia de los mosquitos adultos y del parásito *P. berghei* no se afectaron por el tratamiento (Figura 8E). En conjunto, estos datos proporcionan una fuerte evidencia del funcionamiento del sistema de metilación y demuestran que la metilación de ácidos nucleicos es esencial durante la ontogenia del mosquito. Interesantemente, el tratamiento con azacitidina redujo significativamente los parámetros de la infección en los mosquitos; de 80% a 22% en la prevalencia; de 11 a 4 ooquistes/intestino de intensidad y de 8 a 0 ooquistes/intestino en la abundancia (Figura 8F), lo que sugiere que la metilación de los ácidos nucleicos es relevante durante la infección del vector.

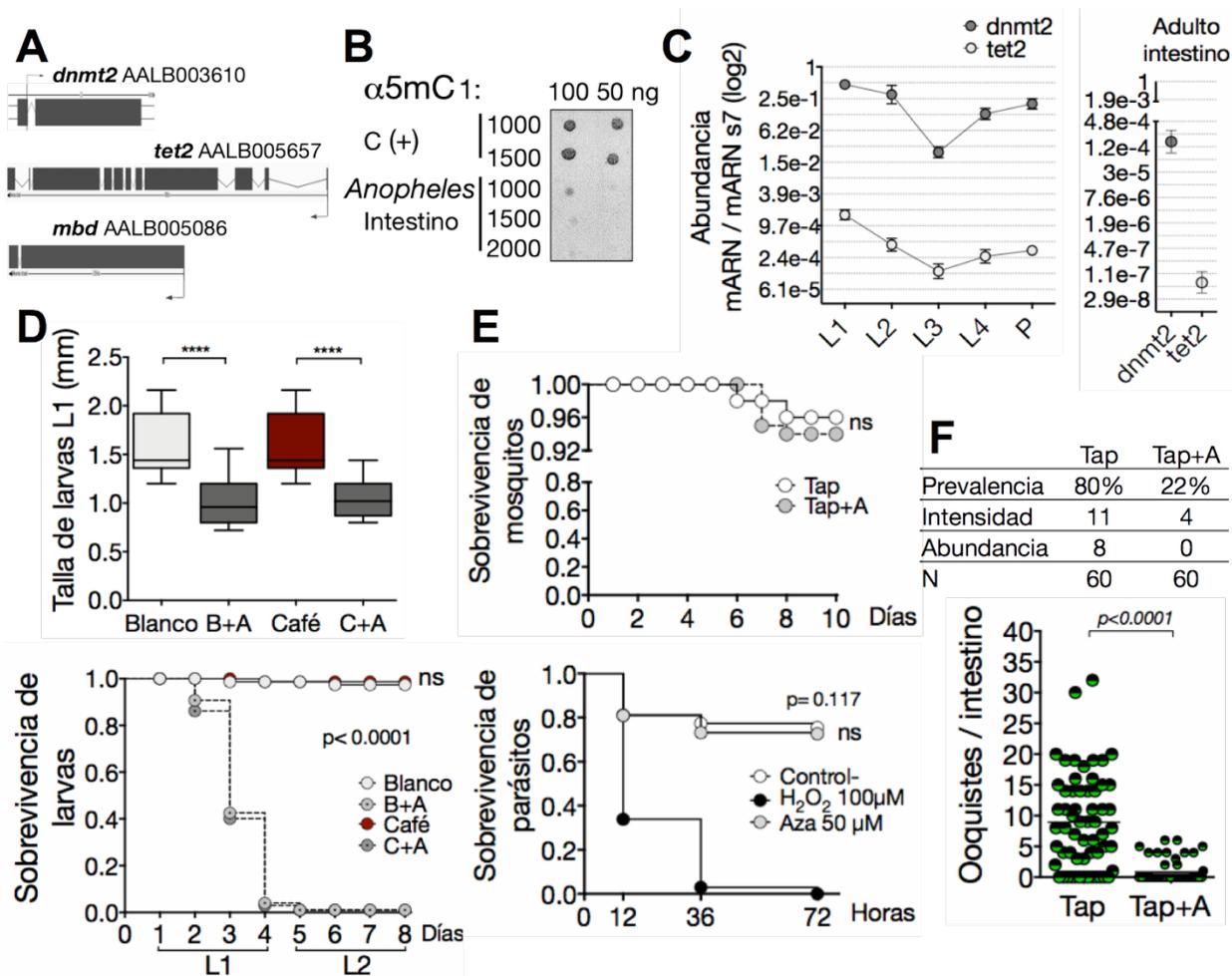


Figura 8. El sistema de metilación de ácidos nucleicos de *A. albimanus* es funcional e indispensable para el desarrollo del mosquito.

(A) Identificación *in silico* de candidatos del sistema de metilación de ácidos nucleicos en *A. albimanus*. Representación esquemática de los genes AALB-*dnmt2*, AALB005657-*tet2* y AALB005086-*mbd*.

(B) Inmunodetección de 5-metil-citosina (5mC) en ADN genómico de intestino de mosquitos adultos. Muestra de ADN humano comercial hipermetilado (C +); 1:1000, 1:1500 y 1:2000 denotan las diluciones del anticuerpo anti-5mC.

(C) Expresión de *dnmt2* y *tet2* durante el desarrollo y la etapa adulta de *A. albimanus*. Expresión relativa de *dnmt2* y *tet2* en larvas en etapa 1 (L1), etapa 2 (L2), etapa 3 (L3), etapa 4 (L4), pupa (P) e intestino de hembras adultas de 5 días post-emergencia (dpe) mediante qPCR. Normalización con ARNm s7 ribosomal y análisis mediante el método 2-DCT. Representación de la media \pm error estándar de la media (SEM; *standard error of the mean*) de dos a cinco experimentos independientes.

(D) Efecto del tratamiento inhibidor de la metilación sobre el desarrollo de *A. albimanus*. Larvas fenotipo blanco (Blanco) y fenotipo café (Café) en etapa L1 de 1h post-eclosión, fueron tratadas con azacitidina (50 μ M) (B+A; C+A).

Crecimiento larvario: representación de la media aritmética \pm SEM de la talla de larvas de 4 dpe. Dos experimentos independientes por triplicado con 30 larvas por grupo. **** $p < 0.0001$ Prueba de Kruskal-Wallis y comparación múltiple de Dunn.

Sobrevivencia larvaria: representación de la relación de larvas vivas entre el total de larvas cada 24 h durante 8 días. Dos experimentos independientes con 50 larvas por grupo y realizados por triplicado. **** $p < 0.0001$. Prueba de Mantel-Cox.

(E) Efecto del tratamiento inhibidor de la metilación en la sobrevivencia de mosquitos *A. albimanus* y *P. berghei*.

Sobrevivencia de mosquitos: mosquitos adultos de 2 dpe de la cepa parental Tapachula (Tap) fueron tratados con azacitidina (50 μ M) durante 72 h. Representación de la relación de mosquitos vivos entre el total de mosquitos cada 24 h durante 10 días. Tres experimentos independientes con 100 mosquitos por grupo. ns; no significativo. Prueba de Mantel-Cox.

Sobrevivencia de *P. berghei*: parásitos en etapa de oocineto fueron purificados y tratados *in vitro* con azacitidina (50 μ M), H₂O₂ (100 μ M; control positivo) y PBS (control negativo). Representación de la relación de parásitos vivos entre el total de parásitos cada 24 h durante 3 días. Tres experimentos independientes por duplicado. ns; no significativo. Prueba de Mantel-Cox.

(F) Efecto del tratamiento inhibidor de la metilación sobre la infección de *A. albimanus* con *P. berghei*. Mosquitos adultos de 2 dpe de la cepa parental Tap fueron tratados con azacitidina (50 μ M) durante 72 h y posteriormente fueron alimentados con 400

oocinetos/ μl de *P. berghei*. Tres días post-alimentación se determinó la carga de ooquistes intestinales mediante microscopia de fluorescencia. Prevalencia, intensidad y abundancia de la infección en *A. albimanus* retados con *P. berghei*. Los parámetros de infección fueron calculados como sigue: prevalencia, porcentaje de mosquitos infectados; intensidad, promedio del número de parásitos en los mosquitos infectados; abundancia, promedio del número de parásitos en el total de mosquitos. Dos experimentos independientes con 30 mosquitos por grupo. **** $p < 0.0001$. Prueba Mann-Whitney.

II. LOS FENOTIPOS BLANCO Y CAFÉ DE *A. ALBIMANUS* DIFIEREN EN EL PORCENTAJE DE METILACIÓN DEL ADN, EL PERFIL DE TRANSCRIPCIÓN DE GENES DE LA RESPUESTA INMUNE Y LA SUSCEPTIBILIDAD A LA INFECCIÓN POR *P. BERGHEI*

Anopheles albimanus Wiedemann originaria de Tapachula-México (en lo sucesivo denominada Tap) presenta naturalmente los fenotipos Blanco (B) y Café (C), sin embargo, el conocimiento actual sobre las características moleculares de estos fenotipos es escaso.

Para caracterizar a los dos fenotipos a nivel funcional y molecular, inicialmente se determinaron los patrones de infección inter-generacional de la cepa parental Tap y de los fenotipos Blanco y Café. Mosquitos hembra de cinco días post-emergencia (dpe) fueron alimentados con *P. berghei* (400 oocinetos/ μ l) y tres días después de la alimentación se cuantificó la intensidad y la prevalencia de la infección en intestinos, mediante microscopía de fluorescencia. El experimento se repitió durante siete generaciones para la cepa de los mosquitos parentales Tap (Tap₀₋₆) y durante 10 generaciones sucesivas para los mosquitos fenotipo Blanco y Café (Blanco₁₋₁₀ y Café₁₋₁₀). En cada generación de la cepa Tap y de los fenotipos derivados Blanco y Café, se destinaron mosquitos para las infecciones con el parásito, mientras que el resto se mantuvo para criar las próximas generaciones. Como se observa en la Figura 9A, los mosquitos fenotipo Blanco susceptibles a *P. vivax* también son más susceptibles a las infecciones por *P. berghei* en comparación con los mosquitos fenotipo Café; parámetros de infección Blanco vs Café: prevalencia (85% vs 52%), intensidad (8 vs 3 ooquistes/intestino) y abundancia (7 vs 1 ooquistes/intestino) (Figura 9B). Esto se observó en las 10 generaciones estudiadas, y los parámetros de infección obtenidos oscilaron dentro de la variación parental observada, indicando que el rasgo de susceptibilidad / resistencia no se diluye ni refuerza con la reproducción entre fenotipos o con el aislamiento de los mismos (Figura 9A y Figura S5).

Para caracterizar a los fenotipos a nivel funcional y molecular, se evaluó la producción basal de óxido nítrico (NO), la actividad de fenoloxidasa (PO), la cantidad de 5mC genómica y el perfil transcripcional de varios marcadores inmunes descritos previamente como moléculas importantes en la infección con *Plasmodium*. La

producción basal de NO y la actividad PO no fueron diferentes entre los fenotipos (Figura 9C). Las diferencias en susceptibilidad observadas entre los fenotipos no se correlacionan con la producción basal de NO o la actividad de PO, por lo que no son una característica fenotípica que condicione a la susceptibilidad o la resistencia a la infección.

A continuación, se analizó el perfil transcripcional de los genes del sistema de metilación y el contenido de 5mC en ambos fenotipos. La abundancia del transcrito de *dnmt2* fue 3.5 veces mayor en el fenotipo Café en comparación con el fenotipo Blanco, mientras que la abundancia de *tet2* no fue distinta entre los fenotipos (Figura 9D). Con una mayor transcripción de *dnmt2*, los mosquitos fenotipo Café tuvieron significativamente más metilación del ADN genómico que los mosquitos fenotipo Blanco ($1.73\% \pm 0.22$ vs $0.85\% \pm 0.17$) (Figura 9D). El tratamiento de inhibición de la metilación exclusiva sobre el ADN con decitabina, igualó la cantidad de 5-metil-2-desoxicitidina (5mdC) entre fenotipos Blanco y Café (% 5mdC : 0.53 ± 0.01 vs 0.67 ± 0.08); no obstante, la inhibición en el fenotipo Café fue del 61.45%, mientras que en el fenotipo Blanco fue 38% (Figura 9D). Así, la inhibición de la metilación en el fenotipo Café fue 23.45% más eficiente que en el fenotipo Blanco. El tratamiento con azacitidina también fue efectivo en la inhibición de la metilación del ADN en ambos fenotipos y también se observó una mayor reducción de la marca en los mosquitos fenotipo Café (diferencia de intensidad media de pixeles: 7.2) (Figura 9E y Figura 9F).

El uso de enzimas de restricción como sistema de evaluación de la metilación se basa en la sensibilidad a la 5mC de las enzimas. La endonucleasa *HpaII* reconoce el sitio de restricción 5'-CCGG-3' y corta entre las citosinas, sin embargo, la digestión del ADN es nula cuando la citosina interna está metilada (CmCGG), por lo que el ADN metilado en esta posición queda protegido de la digestión por *HpaII* (Waalwijk y Flavell 1978). Se observaron claras diferencias en los patrones de la digestión del ADN entre los fenotipos, mismas que se pierden con el tratamiento inhibitorio de la metilación. Después de la digestión del ADN con *HpaII*, el ADN de los mosquitos fenotipo Café mostraron mayor protección contra la digestión, misma que se perdió después del tratamiento con azacitidina (Figura 9F), confirmando así, un mayor grado de metilación en el ADN que el observado en los mosquitos fenotipo Blanco.

Posteriormente se evaluaron mediante qPCR, los niveles de transcripción basal de los marcadores inmunes en intestino de ambos fenotipos. Se encontraron diferencias fenotípicas en la expresión basal de los marcadores de respuesta inmune anti-*plasmodium* en *A. albimanus* fenotipo Café vs Blanco: *Irim1* (+6.3), *tep* (+4.1); *clt4* (+11.6); *ctl6* (+4.4); *frep3* (+2.8) (Figura 9G). Las diferencias observadas en los perfiles de transcripción entre los fenotipos son coherentes con sus diferencias en la susceptibilidad a la infección con *P. berghei* en fenotipo Blanco vs Café; prevalencia: 85% vs 52%; intensidad: 8 vs 3 ooquistes/intestino; y abundancia: 7 vs 1 ooquiste/intestino (Figura 9B). En *A. gambiae* y *A. stephensi*, la enzima DUAL oxidasa actúa como un modulador que previene una fuerte respuesta inmune (Kumar et al. 2010). Por lo tanto, la menor transcripción de *duox* (-3.1) en los mosquitos fenotipo Café, también podrían contribuir a su condición de resistencia (Figura 9G). No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de pro-fenoloxidasa 1 (*ppo1*) (Figura 9G).

Estos resultados muestran que hay diferencias substanciales entre los fenotipos a nivel molecular, que van de diferencias en la actividad transcripcional de fondo, en los niveles basales de metilación de los ácidos nucleicos, en las tasas de respuesta al tratamiento inhibitor de la metilación, hasta la susceptibilidad a la infección con *P. berghei*. Así, el fenotipo Café resistente tiene una mayor abundancia de 5mC genómica y actividad transcripcional de los marcadores inmunes, así como una menor prevalencia e intensidad de la infección en comparación con el fenotipo Blanco.

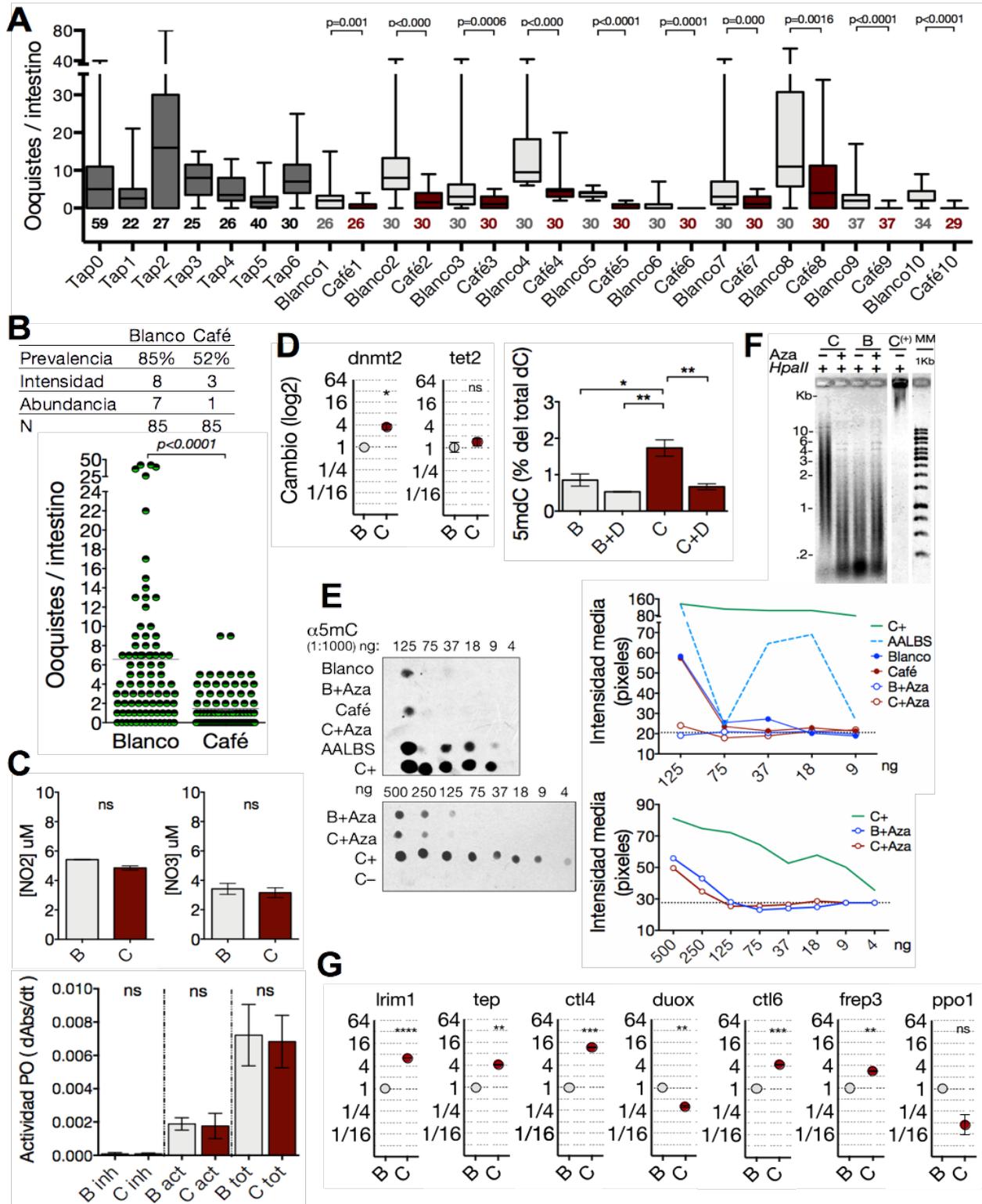


Figura 9. Los fenotipos Blanco y Café de *A. albimanus* difieren en los porcentajes de metilación del ADN, en los perfiles de transcripción de genes de la respuesta inmune y la susceptibilidad a la infección por *P. berghei*

(A-B) Parámetros de la infección parasitaria en *A. albimanus*. Hembras de 5 días post-emergencia (dpe) fueron alimentadas con 400 oocinetos/ μ l de *P. berghei* y tres días post-alimentación se determinó la carga de ooquistes intestinales mediante microscopia de fluorescencia.

(A) Prevalencia y abundancia de la infección con *P. berghei* en siete generaciones de *A. albimanus* cepa parental (Tap) y de 10 generaciones sucesivas de los fenotipos Blanco y Café. Representación de la media aritmética y del tamaño de la muestra (números debajo de las cajas). Los valores de p se incluyen en el gráfico. Prueba Mann-Whitney.

(B) Prevalencia, intensidad y abundancia de la infección en *A. albimanus* fenotipo Blanco y Café. Tres experimentos independientes con 30 mosquitos por grupo. **** $p < 0.0001$. Prueba de Mann-Whitney.

(C) Producción de Óxido nítrico y actividad de fenol oxidasa en *A. albimanus* fenotipo Blanco y Café. Mediciones en mosquitos completos de 5 dpe ambos fenotipos.

Producción de óxido nítrico: representación de la media aritmética \pm SEM de la concentración de nitritos (NO_2) y nitratos (NO_3) en mosquitos fenotipo Blanco (B) y fenotipo Café (C). Tres experimentos independientes con 30 mosquitos por grupo y realizado por duplicado. ns; no significativa. Prueba de t de dos colas.

Actividad de fenol oxidasa (PO): representación de la media aritmética \pm SEM de la actividad enzimática fenol oxidasa de mosquitos fenotipo Blanco (B) y fenotipo Café (C). La actividad de PO es expresada en cambio de la absorbancia/tiempo y los datos mostrados son el resultado de la sustracción de los valores de los controles de auto-oxidación (sólo L-DOPA) y blancos (mosquitos macerados). Enzima inhibida (inh), enzima activa (act) y enzima total (tot). Tres experimentos independientes con 30 mosquitos por grupo y realizado por duplicado. ns; no significativo. Prueba de t de dos colas.

(D) Diferencias en la expresión basal del sistema de metilación y en la abundancia de 5 metil-desoxicitosina (5mdC) en intestino de mosquitos fenotipo Blanco y Café.

Expresión relativa de *dnmt2* y *tet2* en intestino de hembras de 5 dpe mediante qPCR. Normalización con ARNm *s7* ribosomal y relativizado a la abundancia del fenotipo Blanco (B). Análisis mediante el método 2-DDCt. Representación de la media \pm SEM de cinco experimentos independientes. * $p < 0.05$; ns, no significativa. Prueba de t de dos colas.

Porcentaje genómico de 5mdC en ADN de intestino de hembras de 5 dpe fenotipo Blanco (B) y Café (C). Mosquitos adultos de 2 dpe de ambos fenotipos fueron tratados con decitabina (50 μ M) durante 72 h (B+D; C+D). 125 ng de ADNg fueron derivatizados con 2-bromoacetofenona y detectados fluorométricamente a 306/378 nm excitación/emisión mediante HPLC-FLD. Representación de la media aritmética \pm SEM del porcentaje 5mdC global. Tres experimentos independientes con 30 mosquitos por grupo. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. ANOVA y prueba de comparación múltiple de Tukey.

(E) Inhibición de la metilación del ADN en mosquitos *A. albimanus* fenotipo Blanco (B) y Café (C). Mosquitos de 2 dpe de ambos fenotipos fueron tratados con azacitidina (50 μ M) durante 72 h (B+Aza; C+Aza). La determinación del contenido de 5mC de ADN genómico de intestino se evaluó mediante el uso de un anticuerpo anti-5mC. Representación de la intensidad media de los pixeles del dot-blot (gráfico a la derecha). ADN humano comercial hipermetilado (control positivo; C +), ADN de *fago lambda* (control negativo; C-); ADNg de la línea celular de *A. albimanus* LSB-AA695BB (AALBS). Los números arriba de los dot-blots representan las diluciones de ADNg.

(F) Diferencias en la inhibición de la metilación del ADN de intestino de mosquitos *A. albimanus* fenotipo Blanco (B) y Café (C). Mosquitos adultos de 2 dpe de ambos fenotipos fueron tratados con azacitidina (50 μ M) durante 72 h. El ADNg (1 μ g) de intestinos de 30 mosquitos se digirió con 1 unidad de *HpaII* durante 1 h a 37°C. Se muestra un gel de agarosa representativo de los productos de digestión de ADN. ADN humano comercial hipermetilado (control positivo; C +).

(G). Expresión basal de marcadores inmunes anti-*Plasmodium* en intestino de mosquitos *A. albimanus* fenotipo Blanco (B) y Café (C). Expresión relativa de los

siguientes marcadores: *lrim1* (proteína con repetidos ricos en leucina 1), *tep* (proteína similar al complemento con enlace tioéster), *ctl4* (lectina tipo C 4), *duox* (enzima dual-oxidasa), *ctl6* (lectina tipo C 6), *fep3* (inmunolectina con dominio de fibrinógeno 3) y *ppo1* (profenotloxidasa 1) en intestino de hembras adultas de 5 dpe mediante qPCR. Normalización con ARNm *s7* ribosomal y relativizado a la abundancia del fenotipo Blanco. Análisis mediante el método 2- $\Delta\Delta C_t$. Representación de la media \pm SEM de cinco experimentos independientes. ns, no significativo; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. Prueba de t de dos colas.

III. A. ALBIMANUS FENOTIPO BLANCO Y CAFÉ DIFIEREN EN LA MODULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE MARCADORES DE LA RESPUESTA INMUNE POR METILACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Para investigar si la transcripción de los marcadores inmunes contra *Plasmodium* está modulada por la metilación de ADN o ARN, los mosquitos fenotipo Blanco y Café fueron tratados con los azanucleósidos decitabina o azacitidina, y se determinaron sus perfiles de transcripción.

El inhibidor de la metilación decitabina es un análogo de desoxicitidina que se incorpora exclusivamente al ADN, mientras que la azacitidina se incorpora al ADN y al ARN (Stresemann y Lyko 2008). En general, la inhibición de la metilación por los azanucleósidos tuvo efectos sobre la transcripción de *Irim1*, *tep*, *ctl4*, *duox*, *frep3* y *ppo1* que fueron específicos del fenotipo (Figura 10A), sin embargo, no produjo cambios en la expresión de *dnmt2* en ninguno de los mosquitos. A pesar de que el tratamiento con azacitidina tiene efectos globales sobre la metilación genómica, el cambio en los perfiles de transcripción en respuesta al tratamiento fueron diferenciales entre los fenotipos. Cada fenotipo desplegó un perfil transcripcional que fue dependiente del tratamiento desmetilante. Estos efectos particulares sobre los fenotipos podrían deberse a la diferencia en la deposición de las marcas epigenéticas entre ellos, que puede depender de las diferencias genéticas subyacentes (Anreiter, Kramer, y Sokolowski 2019); así, los perfiles de expresión génicos asociados a la perturbación del perfil de metilación resultarían particulares de cada fenotipo.

Interesantemente, la decitabina produjo cambios transcripcionales de mayor intensidad y en muchos casos, contrarios a los generados por la azacitidina. Se ha demostrado que la pérdida de 5mC en el ARN provoca alteraciones en procesos post-transcripcionales como el mantenimiento de integridad y la fidelidad de la traducción de los ARNt (Trixl y Lusser 2018), mientras que el efecto de la decitabina influye en procesos transcripcionales. La inhibición selectiva de la metilación del ADN afecta la abundancia de distintos transcritos entre los fenotipos. En el fenotipo Blanco, la decitabina tuvo efectos sobre *Irim1* y *ctl4*. Por su parte, en el fenotipo Café la decitabina afectó la abundancia de *frep3* y *tep* (Figura 10A). Además, en los mosquitos fenotipo Blanco, la abundancia de transcripción de *ctl6* y *ppo1* se afectó principalmente por la

inhibición de la metilación en el ADN; esto es, la inhibición de la metilación en el ARN por azacitidina no agregó efectos transcripcionales a los generados por la decitabina.

No se observaron cambios transcripcionales exclusivos de la inhibición de la metilación en el ARN; es decir, efectos producidos por la azacitidina pero no por la decitabina. En contraste, ambos inhibidores afectaron la transcripción de genes particulares en cada fenotipo: *tep* y *ppo1* en los mosquitos fenotipo Blanco y *lrim1* en los mosquitos fenotipo Café. En cambio, tanto la abundancia de *duox* como de *ctl6* se modificaron con ambos tratamientos y en ambos fenotipos. También se encontraron efectos opuestos entre los tratamientos: *tep* en el fenotipo Blanco y *lrim1*, *duox* y *ctl6* en el fenotipo Café (Figura 10A)

Por otro lado, la inhibición de la metilación no tuvo efectos a nivel post-traducciona l y no generó diferencias adicionales sobre la producción de NO, la actividad de PO (Figura 10B-C) o la sobrevivencia de los mosquitos adultos de ambos fenotipos (Figura 10D). Estos datos sugieren que la expresión de genes anti-*Plasmodium* en el intestino medio de *A. albimanus* está modulada epigenéticamente a través de la metilación del ADN.

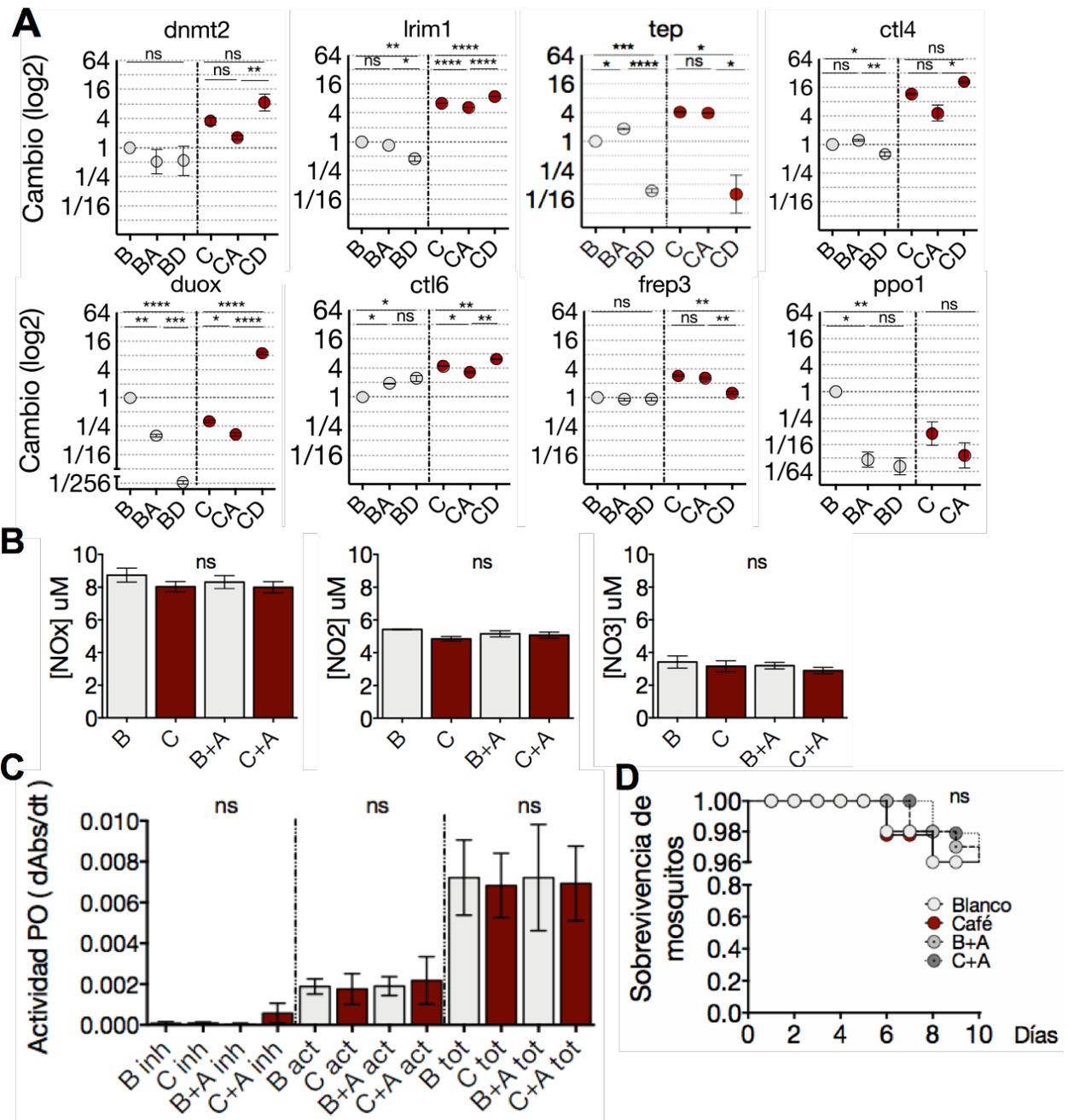


Figura 10. *A. albimanus* fenotipo Blanco y Café difieren en la modulación transcripcional de marcadores de la respuesta inmune por metilación de ácidos nucleicos.

(A-D) Efecto del tratamiento inhibidor de la metilación sobre la expresión de marcadores inmunes, producción de óxido nítrico, actividad de fenol oxidasa y sobrevivencia de mosquitos *A. albimanus* fenotipo Blanco y Café. Mosquitos adultos de 2 días post-emergencia (dpe) de ambos fenotipos fueron tratados con azacitidina (50 μ M; BA y CA) o decitabina (50 μ M; BD y CD) durante 72 h.

(A) Expresión relativa de marcadores inmunes en intestino de mosquitos *A. albimanus* fenotipo Blanco y Café tratados con inhibidores de la metilación. Expresión relativa de *dnmt2*, *lrim1*, *tep*, *ctl4*, *duox*, *ctl6*, *frep3* y *ppo1* en intestino de hembras adultas de 5 dpe mediante qPCR. Normalización con ARNm *s7* ribosomal y relativizado a la abundancia del fenotipo Blanco (B). Análisis mediante el método 2–DDCt. Representación de la media \pm SEM de tres experimentos independientes. ns, no significativo; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. ANOVA y prueba de comparación múltiple de Tukey.

(B) Medición de la producción de óxido nítrico. Representación de la media aritmética \pm SEM de la concentración de nitritos (NO_2), nitratos (NO_3) y nitritos + nitratos (NO_x), de mosquitos completos de 5 dpe fenotipo Blanco (B; B+A) y fenotipo Café (C; C+A). Tres experimentos independientes con 30 mosquitos por grupo y realizado por duplicado. ns; no significativo. ANOVA.

(C) Medición de la actividad de fenol oxidasa. Representación de la media aritmética \pm SEM de la actividad enzimática fenol oxidasa (PO) de mosquitos completos de 5 dpe fenotipo Blanco (B; B+A) y fenotipo Café (C; C+A). La actividad de PO es expresada en cambio de la absorbancia/tiempo y los datos mostrados son el resultado de la sustracción de los valores de los controles de auto-oxidación (sólo L-DOPA) y blancos (mosquitos macerados). Enzima inhibida (inh), enzima activa (act) y enzima total (tot). Tres experimentos independientes con 30 mosquitos por grupo y realizado por duplicado. ns; no significativo. ANOVA.

(D) Sobrevivencia de *A. albimanus* fenotipo Blanco y Café tratados con azacitidina. Representación de la relación de mosquitos vivos entre el total cada 24 h durante 10 días. Tres experimentos independientes con 100 mosquitos por grupo. ns; no significativo. Prueba de Mantel-Cox.

IV. LOS FENOTIPOS BLANCO Y CAFÉ DE *A. ALBIMANUS* RESPONDEN DIFERENCIALMENTE AL RETO CON *P. BERGHEI* EN TÉRMINOS DE METILACIÓN DEL ADN Y TRANSCRIPCIÓN DE GENES DE LA RESPUESTA INMUNE

Los estímulos ambientales como el balance nutricional y la invasión por agentes patógenos son capaces de modular la dinámica de metilación del ADN (Cridge et al. 2017; Vilcinskas 2017; Cavalli y Heard 2019). Con base en lo anterior, se probó la funcionalidad del sistema de metilación en ambos fenotipos de mosquitos en el contexto de su interacción con del medio ambiente. Para explorar si hay un cambio en la abundancia de la metilación genómica en la misma ventana de tiempo en que se evaluaron los perfiles transcripcionales (invasión intestinal), se analizó el ADN genómico de mosquitos fenotipo Blanco y Café con 24 h post-reto con *Plasmodium* mediante el uso de la endonucleasa *HpaII*. El ADN del intestino medio de hembras retadas con *P. berghei* de cada fenotipo (BPb; CPb) mostró una menor sensibilidad a la digestión por *HpaII* (Figura 11A), revelando un nivel más alto de 5mC y un estado en el que los niveles de metilación cambian dinámicamente en respuesta al reto inmune.

En congruencia con la respuesta epigenética inducida por el reto inmune, se encontró que *dnmt2* y *tet2*, así como la mayoría de los genes anti-*Plasmodium*, contienen en su región promotora secuencias de unión predichas para la regulación por el factor nuclear kB (NF-kB), el factor de transcripción maestro de la respuesta inmune (Zakovic y Levashina 2017) (Tabla S1).

En respuesta al reto con *P. berghei*, los mosquitos fenotipo Café respondieron transcripcionalmente con el incremento de *dnmt2* (BPb / Bb: 21.3 veces) y una tendencia a la disminución de *tet2* (Bb / BPb: 1.2 veces), mientras que el fenotipo Blanco no mostró cambios transcripcionales (Figura 11B). El balance entre una mayor transcripción de *dnmt2* y una menor transcripción de *tet2*, sugiere una ganancia en la marca epigenética. Lo anterior es coherente con la ganancia de la marca observada previamente en el ADN de intestino de mosquitos retados con el parásito (Figura 11A). Además, la alimentación con sangre indujo un aumento sustancial en la transcripción de *dnmt2* (Bb: 372 veces; Cb 21 veces) y una disminución de *tet2* (Bb: 5.6 veces; Cb: 3.6 veces) (Figura 11B). Consecuentemente, tanto la hemoalimentación como la invasión parasitaria inducen una respuesta transcripcional que involucra a estos dos

componentes esenciales del sistema de metilación, sin embargo, sólo en el fenotipo Café se indujo una respuesta específica de *dnmt2* a la invasión parasitaria.

Los mosquitos anophelinos modulan su perfil transcripcional en respuesta a la infección con *Plasmodium* (Martínez-Barnette et al. 2012). La especificidad y cantidad de esta respuesta contribuyen a la resistencia o susceptibilidad a la infección parasitaria. Para caracterizar a nivel molecular la respuesta intestinal a la invasión parasitaria, se analizaron mediante qPCR la expresión de los marcadores de respuesta inmune anti-*plasmodium* en ambos fenotipos (Figura 11B). Las respuestas a la invasión en cada fenotipo son claramente distintas. *A. albimanus* fenotipo Blanco (BPb:Bb) se caracteriza transcripcionalmente por una respuesta marginal dada por el incremento de *ctl4* (7.7 veces), un receptor tipo lectina que favorece la sobrevivencia de *Plasmodium* durante su desarrollo a ooquiste (Osta, Christophides, y Kafatos 2004; Le et al. 2012), mientras que *irim1*, *tep*, *duox*, *ctl6*, *frep3* y *ppo1* no mostraron cambios en su abundancia ante la invasión (Figura 11B). En contraste, *A. albimanus* fenotipo Café (BPb:Bb) desarrolló una amplia respuesta transcripcional con incremento de *irim1* (104 veces), *ctl4* (260 veces), *duox* (37,8 veces), *ctl6* (47,6 veces) y *frep3* (4,9 veces). Las diferencias en los perfiles transcripcionales de los fenotipos concuerdan con sus respectivos estados de susceptibilidad/resistencia (Figura 11B). Mientras que el fenotipo Blanco prácticamente no produce una respuesta transcripcional ante la invasión parasitaria y desarrolla infecciones con alta prevalencia (85%) e intensidad de la infección (8 ooquistes/intestino), el fenotipo Café monta una fuerte respuesta transcripcional multigénica, con elevada expresión intestinal de genes anti-*Plasmodium* y exhibe una baja prevalencia (52%) e intensidad de la infección (3 ooquistes/intestino).

Para explorar la correspondencia entre la metilación de ácidos nucleicos y la susceptibilidad a la infección, se evaluó el efecto biológico del esquema de inhibición de la metilación sobre la abundancia, intensidad y prevalencia de la infección en los mosquitos susceptibles. Las hembras del fenotipo susceptible tratadas con azacitidina (B+A: 5 µM, 25 µM, 50 µM y 75 µM) exhibieron una menor abundancia (ooquistes/intestino: 5 vs 4; 2; 0.3; 0.3), intensidad (ooquistes/intestino: 6 vs 4; 3; 1; 1) y prevalencia (% Prev: 83 vs 83; 77; 20; 23) de la infección, que claramente fue dependiente de la concentración del inhibidor (Figura 11C). Existe una fuerte correlación

negativa entre el tratamiento inhibidor de la metilación y la prevalencia ($r = -0.8721$), la intensidad ($r = -0.9747$) y la abundancia ($r = -0.9747$) de la infección con *P. berghei*, que no se debe a un efecto directo del inhibidor en la sobrevivencia de *P. berghei* (Figura. 8E). Cabe destacar que el efecto de la inhibición sobre los parámetros de infección se saturó a una concentración de 50 μM de azacitidina, pues no se observó una disminución adicional en la carga de ooquistes.

Para evaluar si las diferencias en la metilación de los ácidos nucleicos entre los fenotipos podrían estar relacionadas con sus diferencias en la susceptibilidad a *P. berghei*, se determinó el efecto del esquema de inhibición con azacitidina sobre la infección de ambos fenotipos. El tratamiento con azacitidina redujo significativamente la infección en *A. albimanus*, tanto en el fenotipo Blanco (B vs B+A; Prevalencia: 80% vs 20%; Intensidad: 8 vs 2 ooquistes/intestino) como en el fenotipo Café (C vs C+A; Prevalencia: 57% vs 12%; Intensidad: 4 vs 1 ooquiste/intestino) y anuló sus diferencias fenotípicas de susceptibilidad (B+A vs C+A (ns); Prevalencia: 20% vs 12%; Intensidad: 2 vs 1 ooquistes/intestino). (Figura S6).

En conjunto, estos datos muestran que la metilación del ADN en *A. albimanus* es una marca dinámica. En respuesta al reto inmune con el parásito, ocurre una regulación positiva de *dnmt2* asociada a la regulación negativa de *tet2*, dos genes con secuencias de unión putativa de NF- κ B en su región promotora. Se incrementa significativamente el contenido de 5mC en el ADN y se producen diferencias transcripcionales entre los fenotipos. Los perfiles transcripcionales diferenciales pueden explicar parcialmente las diferencias de susceptibilidad al parásito y el rescate del fenotipo susceptible a la infección con *Plasmodium* a través del borrado farmacológico de la metilación, sugiere un papel importante de la metilación en este proceso. Interesantemente, la inhibición de la metilación previa al reto inmune con el parásito anula las diferencias fenotípicas de susceptibilidad.

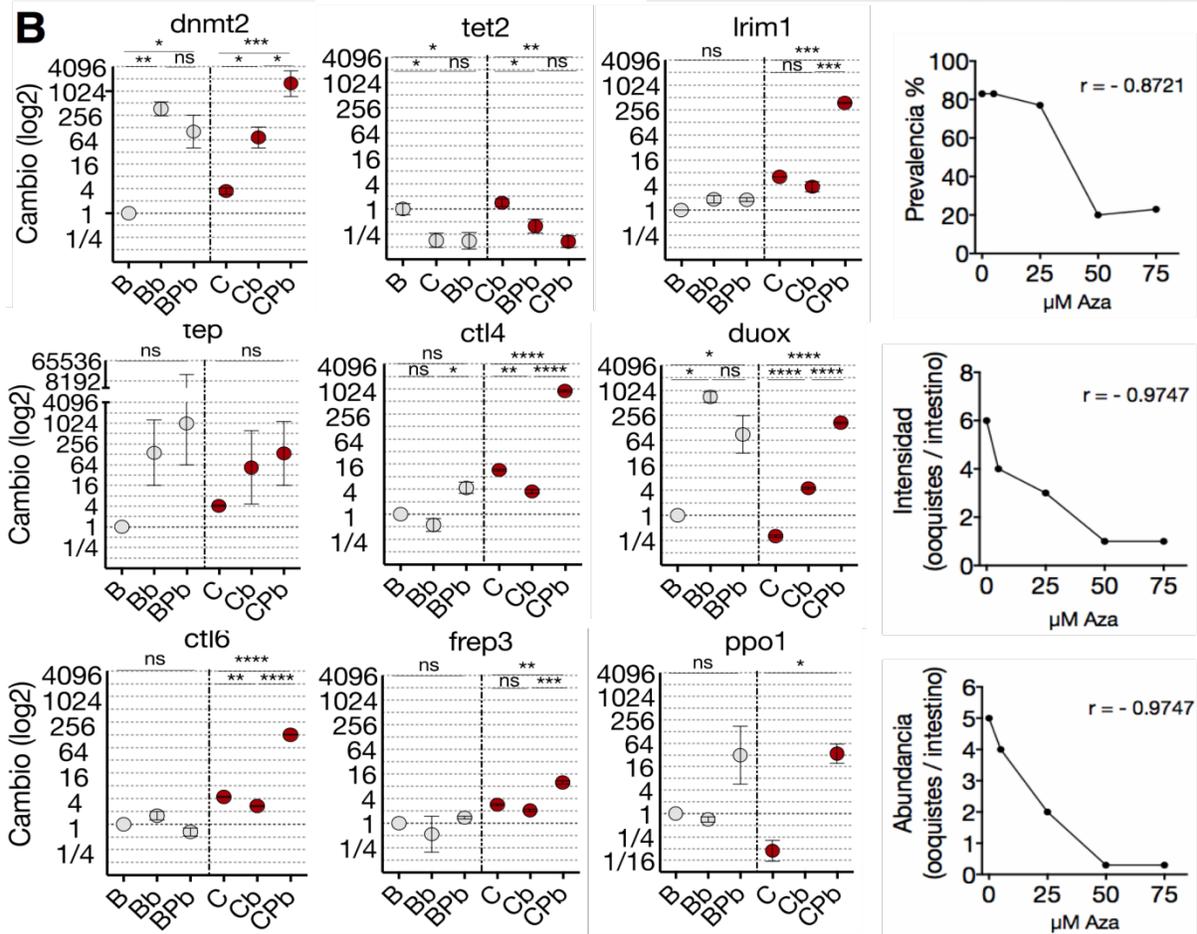
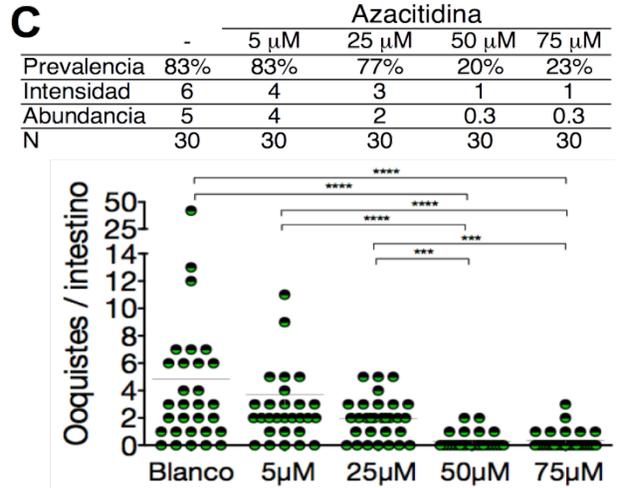
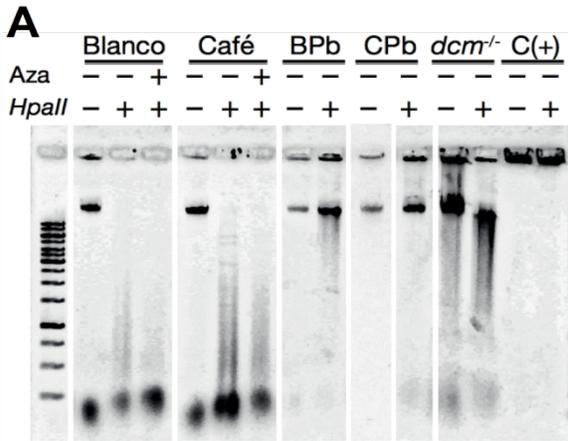


Figura 11. Los fenotipos Blanco y Café de *A. albimanus* responden diferencialmente al reto con *P. berghei* en términos de metilación del ADN y transcripción de genes de la respuesta inmune.

(A-B) Mosquitos *A. albimanus* fenotipo Blanco (B) y Café (C) de 5 días post-emergencia (dpe) fueron retados con *P. berghei* (400 oocinetos/ μ l) y 24 h posterior al reto se extrajo ADNg y ARNm de intestinos de 30 mosquitos por grupo.

(A) Diferencias en la metilación del ADN de intestino de mosquitos *A. albimanus* fenotipo Blanco y Café retados con *P. berghei* (BPb; CPb). El ADNg (1 μ g) se digirió con 1 unidad de *Hpa*II durante 1 h a 37 °C Se muestra un gel de agarosa representativo de los productos de digestión de ADN. Muestras de mosquitos fenotipo Blanco, Café y retados con *P. berghei* (BPb; CPb), ADN de *Escherichia coli* BL21 *dcm*^{-/-} (control hipometilado) y ADN humano comercial hipermetilado (control positivo; C +).

(B) Respuesta transcripcional de marcadores inmunes en intestino de *A. albimanus* fenotipo Blanco y Café retados con *P. berghei*. Expresión relativa de marcadores inmunes en mosquitos alimentados con sangre infectada (BPb; CPb) y sangre sin infectar (Bb y Cb). Normalización con ARNm *s7* ribosomal y relativizado a la abundancia del fenotipo Blanco (B). Análisis mediante el método 2- $\Delta\Delta$ Ct. Representación de la media \pm SEM de tres experimentos independientes. ns, no significativo; * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, **** p < 0.0001. ANOVA y prueba de comparación múltiple de Tukey.

(C) Efecto del tratamiento inhibidor de la metilación sobre la infección de mosquitos susceptibles con *P. berghei*. Mosquitos adultos de 2 dpe fueron tratados con 25 μ M, 50 μ M y 75 μ M de azacitidina durante 72 h y alimentados con *P. berghei* (400 oocinetos/ μ l). Tres días después del reto con *P. berghei* se determinó la carga de ooquistes intestinales en los mosquitos. Prevalencia, intensidad y abundancia de la infección en hembras susceptibles.

Correlación entre la concentración del tratamiento con azacitidina y la prevalencia, intensidad y abundancia de la infección. Tres experimentos independientes con 30 mosquitos por grupo. * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, **** p < 0.0001. Prueba de Kruskal-Wallis y prueba de comparación múltiple de Dunn. (r) Correlación de Spearman.

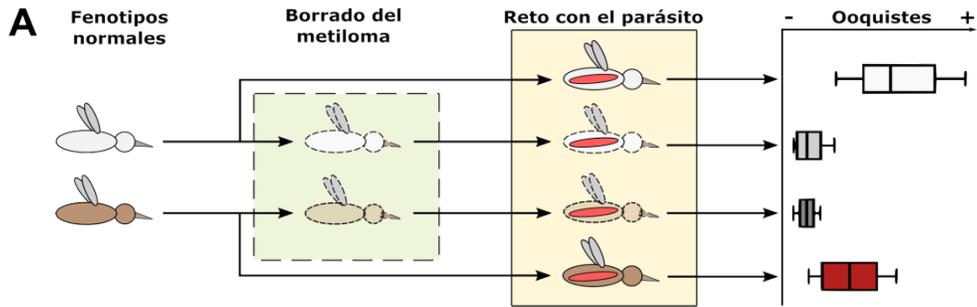
V. LA INHIBICIÓN DE LA METILACIÓN DEL ADN DIRIGE A LOS MOSQUITOS *A. ALBIMANUS* A UNA CONDICIÓN DE RESISTENCIA CONTRA *P. BERGHEI*

Para evaluar la respuesta transcripcional a la invasión de parásitos en un estado en donde la marca epigenética fue borrada globalmente (Figura 12A), se trataron a ambos fenotipos con los inhibidores de la metilación y se retaron con *P. berghei*. Se analizó mediante qPCR la expresión de los marcadores de respuesta inmune en el fenotipo Blanco y Café después de la exposición a azacitidina (A), Decitabina (D), al reto con *P. berghei* (Pb) y en la combinación del tratamiento con azacitidina y con el reto parasitario (A+Pb) o azacitidina con el cultivo de sangre no infectada (A+Mock). El estado epigenéticamente “ingenuo” inducido por el inhibidor, llevó a ambos fenotipos a responder de manera similar ante el reto con el parásito, produciendo *dnmt2*, *irim1* y *tep* (Figura 12B; A+Pb). TEP1 y LRIM1 se consideran los principales factores que controlan las cargas parasitarias en los mosquitos; su función es similar al sistema del complemento de mamíferos y promueven la lisis y la melanización de los parásitos (Osta, Christophides, y Kafatos 2004; S. Blandin et al. 2004; Fraiture et al. 2009). En ambos fenotipos retados con *Plasmodium*, la inhibición de la metilación aumentó la transcripción de *tep* (Figura 12B; Pb vs A+Pb). El incremento en la transcripción de *irim1* fue mayor en los mosquitos de fenotipo Blanco a lo observado en mosquitos del fenotipo Café. Además, *ctl4* disminuyó en ambos fenotipos retados cuando se trataron con azacitidina. Sin embargo, persistieron algunas diferencias transcripcionales, en particular *ppo1* que aumentó significativamente en el fenotipo Blanco, mientras que *ctl4* y *ctl6* sólo se expresaron en el fenotipo Café (Figura 12B; A+Pb).

El hecho de que los inhibidores disminuyeran la transcripción de la desmetilasa *tet2* a niveles indetectables, podría contribuir a la preservación de la 5mC incipientemente colocada en respuesta al reto con el parásito. Una explicación para las observaciones anteriores es que los patrones preexistentes de la metilación heredada en los fenotipos fue borrada con el tratamiento inhibitorio, así como la divergencia de la respuesta transcripcional, de tal forma que los mosquitos respondieron con lo que probablemente es relevante para contender con la infección, resultando en una menor carga parasitaria en ambos fenotipos (Figura 12C).

Para discriminar entre los efectos biológicos de la metilación del ADN y el ARN, se realizaron experimentos de infección en mosquitos tratados con azacitidina y decitabina y a partir de los datos de prevalencia e intensidad de infección se calculó, según Churcher, et al (2012), la eficacia en el bloqueo de la transmisión (por sus siglas en inglés TBIs; *Transmission blocking interventions*) (tabla superior; Figura 12C). En el fenotipo Blanco, el tamaño del efecto del bloqueo de la infección fue marcado con ambos tratamientos, pero ligeramente superior con decitabina (TBI: Prevalencia 88.1% ± 11.9; Intensidad 96.2% ± 3.8) que con azacitidina (TBI: Prevalencia 70.6% ± 7.2; Intensidad 76.4% ± 6.1). En *A. albimanus* fenotipo Café se observó un importante efecto de bloqueo con ambos tratamientos; decitabina (TBI: Prevalencia 85.6% ± 8.7; Intensidad 76.5% ± 11.8) y azacitidina (TBI: Prevalencia 81.35% ± 12.8; Intensidad 72.8% ± 10.7). La eficacia en el bloqueo de la transmisión fue contundente en *A. albimanus*, pero no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos (Azacitidina vs Decitabina) ni entre fenotipos (B+A vs C+A) (B+D vs C+D).

Finalmente, para explorar si las diferencias en las abundancias en la metilación entre los fenotipos se deben a aspectos genéticos de la *dnmt2*, se amplificó y secuenció el gen de ambos fenotipos (Figura 12D y Figura S7). Se realizó la traducción *in silico* y análisis de dominios conservados de los resultados de la secuenciación mediante CD-search. No se encontraron diferencias en la secuencia de *dnmt2* entre los fenotipos. El gen *dnmt2* (AALB003610) se encuentra ubicado en el cromosoma 2R y consta de dos exones codificantes que producen un transcrito de 1,236 pb. *Dnmt2* tiene un promotor de 50 pb de tamaño, localizado a 563 pb de distancia del ORF y una secuencia de unión putativa para NF-kB localizada a 548 pb río arriba del ORF (Figura 12E).



B Log2 Mean Diff. -22 0 22

	Blanco						Café					
	A	D	Pb	A+Pb	Mock	A+Mock	A	D	Pb	A+Pb	Mock	A+Mock
dnmt2	-	-	0,0277	0,0214	0,0006	-	0,019	-	0,0008	0,0069	0,0098	<0.0001
tet2	<0.0001	0,023	0,0184	-	0,0153	-	-	0,004	-	0,0244	0,0092	<0.0001
lrim1	<0.0001	0,023	0,0328	0,0412	-	-	0,0008	0,0004	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
tep	0,0057	0,0019	-	0,0196	-	0,01	-	0,0493	0,0006	-	-	0,024
ctl4	-	0,0451	0,0436	-	-	0,0003	-	0,0088	0,0003	0,0103	0,0103	0,0004
duox	0,0022	0,0014	0,0448	-	0,0021	-	0,0216	0,0006	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0,0002
ctl6	0,0048	0,028	-	-	-	-	0,0225	0,0118	<0.0001	0,0005	0,022	<0.0001
frep3	-	-	-	-	-	-	-	0,0071	0,005	-	0,0419	0,0009
ppo1	0,0128	0,00115	-	0,0436	-	0,0213	-	-	0,0206	-	-	0,0022

C

	Blanco	B+A	B+D	Café	C+A	C+D
Prevalencia	84.2 ± 8.3	27.5 ± 8.3	11.1 ± 1.1	57.5 ± 3.7	10 ± 6.8	8.9 ± 5.9
Intensidad	11.4 ± 1.3	2.9 ± 0.4	1.4 ± 0.2	5.8 ± 0.8	1.3 ± 0.2	1.4 ± 0.3
Abundancia	9.6 ± 1.2	0.8 ± 0.1	0.2 ± 0.1	3.4 ± 0.5	0.1 ± 0.04	0.1 ± 0.05
N =	4	4	3	4	4	3

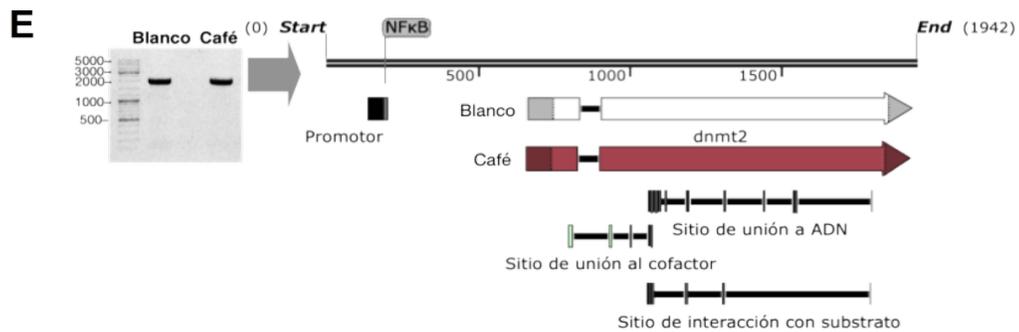
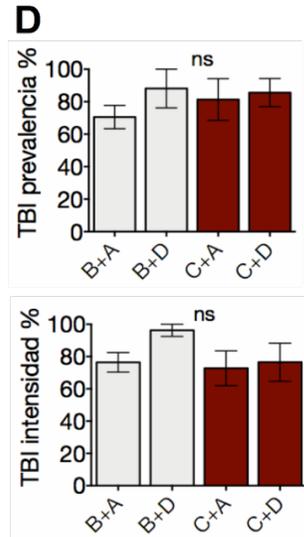
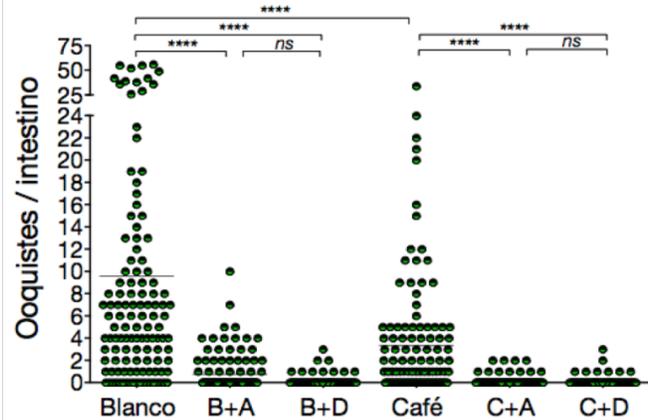


Figura 12. La inhibición de la metilación del ADN dirige a los mosquitos *A. albimanus* a una condición de resistencia contra *P. berghei*.

(A) Representación esquemática de la metodología. Se determinó la expresión relativa de los marcadores inmunes mediante qPCR de muestras de ARNm tomadas de cada grupo experimental (fenotipos normales, borrado del metiloma y reto con el parásito) y posterior determinación de la carga de ooquistes intestinales.

(B) Representación de la expresión génica por medio de mapa de calor de los marcadores inmunes en mosquitos fenotipo Blanco y Café después de la exposición a azacitidina (A), Decitabina (D) y al reto con *P. berghei* (Pb). Se incluye la combinación del tratamiento con azacitidina y con el reto parasitario (A+Pb) o azacitidina con el cultivo de sangre no infectada (A+Mock). El gradiente de color representa la diferencia media (\log_2) entre la expresión basal y la condición tratada. Sólo se representan con color los genes con diferencias significativas en su expresión. Las cajas blancas representan cambios en la expresión no significativos. Una línea representa que el transcrito no fue detectado por qPCR. Los números dentro de las cajas son los valores de *P* calculados por la prueba de t de dos colas entre el fenotipo control y el grupo tratado o alimentado.

(C) Efecto de la inhibición de la metilación por azacitidina (A) y decitabina (D) sobre los parámetros de infección. Representación de la media \pm SEM de la prevalencia, la intensidad y la abundancia de la infección en mosquitos fenotipo Blanco (B) y Café (C) retados con *P. berghei* (400 oocinetos/ μ l) (B+A, B+D; C+A, C+D respectivamente). Tres a cuatro experimentos independientes con 30 mosquitos por grupo. **** $p < 0.0001$, ns; no significativo. Prueba de Kruskal-Wallis y prueba de comparación múltiple de Dunn.

(D) Eficacia de las intervenciones de bloqueo de la transmisión (por sus siglas en inglés TBIs; *Transmission blocking interventions*) de azacitidina (A) o decitabina (D) sobre la prevalencia e intensidad de la infección en mosquitos fenotipo Blanco (B+A; B+D) y fenotipo Café (C+A; C+D).

(E) Amplificación del gen AALB*dnmt2* del fenotipo Blanco y Café de *A. albimanus* mediante PCR largo, secuenciación y representación esquemática de la

constitución génica de *dnmt2* fenotipo Blanco y fenotipo Café; Análisis de dominios conservados de las secuencias de *dnmt2* mediante CD-search.

TERCERA PARTE
DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

A. albimanus presenta naturalmente dos variantes fenotípicas distinguibles durante su ontogenia. Históricamente, las variaciones fenotípicas de los anophelinos se han asociado con diferencias en su competencia vectorial (Jeffery 1950; W. E. et al. Collins 1976; Billingsley y Sinden 1997). Reportes previos han asociado al fenotipo Blanco de *A. albimanus* con resistencia a insecticidas o mayor susceptibilidad a la infección por *P. vivax* que su contraparte Café (Georghiou, Gidden, y Cameron 1967; Davidson 1963; Chan et al. 1994). Sin embargo, no se habían caracterizado a nivel molecular las diferencias de la susceptibilidad a la infección con *Plasmodium*. Aunque estudios previos han sugerido la ausencia de un sistema de metilación de ADN funcional en dípteros, se han reportado evidencias de la presencia de la 5mC en anophelinos y aedinos. En esta investigación se empleó como modelo de estudio a *A. albimanus*-*P. berghei* para caracterizar las propiedades fenotípicas de la susceptibilidad/resistencia a la infección y poner a prueba la presencia e importancia biológica de la metilación del ADN en dos fenotipos funcionales. Este trabajo de investigación se centró en el análisis de un grupo de genes del sistema inmune que son cruciales para el establecimiento y desarrollo de la infección con *P. berghei* y se dirigió el interés en el estudio del intestino medio de los mosquitos por ser el principal órgano blanco de la invasión del parásito.

Durante la ontogenia de *A. albimanus*, *dnmt2* y *tet2* se expresan dinámicamente en todas las etapas del desarrollo del mosquito y la función de la 5mC es esencial a lo largo de este proceso. La inhibición temprana de la metilación en las larvas tiene efectos perjudiciales en su crecimiento y es totalmente incompatible con la viabilidad del organismo. De la misma manera, la metilación de ácidos nucleicos es funcional en la etapa adulta. En principio, se comprobó cuantitativamente la presencia de la 5mC en ADN de intestino de ambos fenotipos y se evaluó su participación en la modulación de la transcripción de marcadores inmunes relevantes en la infección con *Plasmodium*. El tratamiento inhibitor de la metilación produjo cambios en el perfil de expresión intestinal que fueron dependientes del tipo de inhibidor y particulares del fenotipo. En cambio, la

inhibición de la metilación del ADN no afectó la sobrevivencia de los mosquitos ni produjo cambios en la producción de NO ni la actividad de PO.

En la etapa adulta, los fenotipos ya no son distinguibles morfológicamente, pero están asociados a niveles intestinales de 5mC genómica distintos, así como en la respuesta transcripcional ante el reto parasitario y en la susceptibilidad a la infección con *P. berghei*.

Otro aspecto llamativo es la mayor inhibición de la metilación en el fenotipo Café, en comparación con lo observado en el fenotipo Blanco. La decitabina y la azacitidina tienen sus efectos inhibitorios de la metilación después de su incorporación en los ácidos nucleicos. La incorporación de los azanucleósidos ocurre durante los eventos de replicación, de reparación del ADN, en la transcripción o en la desmetilación con sustitución de base; que son procesos en los que ocurre la incorporación o reemplazo de nucleótidos. Luego, la enzima DNMT2 interactúa con los azanucleósidos y se une covalente e irreversiblemente a ellos durante la reacción catalítica. De esta forma, los inhibidores solo pueden inhibir la metilación en los lugares donde se incorporan y donde la DNMT2 puede acceder a ellos (Stresemann y Lyko 2008). Lo anterior queda ejemplificado en la diferencia observada en la eliminación de la marca entre los fenotipos. La mayor actividad transcripcional del fenotipo Café correlaciona con una reducción del 61.45% de la 5mC genómica; 23.45% más alta que la observada en el fenotipo Blanco. Por su parte, el fenotipo Blanco con una menor actividad transcripcional que la observada en el fenotipo Café, perdió el 38% de la 5mC total después del tratamiento con decitabina. La inaccesibilidad a los inhibidores o a la DNMT2 en ciertas regiones genómicas de baja actividad, también puede explicar por qué en ambos fenotipos la inhibición de 5mC alcanzó niveles similares sin disminuir más o alcanzar la eliminación total de la marca epigenética.

En general, se considera que la función de la metilación del ADN es de represión de la expresión génica; especialmente cuando se localiza en las regiones promotoras. Sin embargo, cuando se encuentra dentro del cuerpo del gen se ha asociado con una transcripción génica activa (Hunt et al. 2013b; Zilberman 2017). En los insectos, la metilación del ADN se localiza casi exclusivamente en los cuerpos génicos, lo que

explica en cierta medida la asociación observada entre el contenido de 5mC y la actividad transcripcional de los fenotipos. El fenotipo Café, con mayor contenido de 5mC tiene una transcripción relativa alta, mientras que el fenotipo Blanco con menor contenido de 5mC tiene una actividad transcripcional menor. Estudios en insectos indican que la metilación de su ADN es muy distinta a la de vertebrados y similar a la de plantas; tanto plantas como insectos presentan abundante metilación en el contexto CHH y una metilación preferencial de los cuerpos génicos (Zilberman 2017). Al igual que en las plantas, los patrones evolutivos de la metilación en insectos sugieren un tipo de función homeostática para la metilación del cuerpo del gen (Regev, Lamb, y Jablonka 1998; Sarda et al. 2012; Zilberman 2017). Se requieren de futuros trabajos que aclaren si la función de la 5mC en *A. albimanus* se asocia principalmente con perfiles transcripcionales más activos que represivos, así como su potencial contribución en el mantenimiento de la homeostasis. En mosquitos, la regulación de la respuesta inmune juega un papel crítico en el desarrollo de resistencia o susceptibilidad a las infecciones, en este sentido, el estudio de la asociación de la competencia vectorial y la regulación de la respuesta inmune mediante mecanismos conservados como la metilación del DNA son relevantes.

Las marcas epigenéticas son activamente colocadas y removidas en respuesta a señales nutricionales o por retos inmunológicos. Esta dinámica de la respuesta epigenética permite que marcas reguladoras de la expresión génica como la metilación del ADN, modulen la transición de un estado basal a un estado de respuesta transcripcional. En *A. albimanus*, la alimentación con sangre infectada con *Plasmodium* aumenta la cantidad de metilación en el ADN de ambos fenotipos de mosquitos (Figura 11A); aunque el aumento es mayor en el fenotipo de Café. El incremento de la marca en el ADN es congruente con la mayor transcripción de *dnmt2*, así como con la menor transcripción de *tet2* en los dos fenotipos.

Los mosquitos hembra requieren del aporte nutricional de aminoácidos y lípidos que provienen de la sangre de la que se alimentan para la formación y la puesta de los huevos. La necesidad de la hemoalimentación para la formación de huevos va acompañada de la inevitable exposición a agentes patógenos potencialmente contenidos en la sangre. Así, la premisa de la existencia de vías de señalización que

integren el estado nutricional, la regulación de la actividad de DNMT2 y la respuesta a estímulos estresantes es pertinente en el contexto de los mosquitos vectores de patógenos como *Anopheles*. En esta investigación queda incipientemente ilustrada la convergencia de estímulos provenientes de la dieta y la inducibilidad de la actividad de DNMT2 en respuesta a *P. berghei*.

El borrado farmacológico de la metilación en el fenotipo susceptible tuvo una clara correlación negativa con la prevalencia, intensidad y abundancia de la infección, de tal manera que la inhibición de la metilación revirtió el fenotipo de susceptibilidad en términos de carga de ooquistes y anuló las diferencias de susceptibilidad entre los fenotipos. Además, la inhibición de la metilación llevó a los fenotipos a un estado de mayor resistencia, haciéndolos considerablemente más capaces de controlar las cargas de infección, sin embargo, los mecanismos por los cuales se elimina el parásito no se comprenden completamente. Candidatos potenciales de la eliminación del parásito son LRIM1 y TEP, ya que la transcripción de ambos genes fue regulada positivamente y de manera similar entre los fenotipos (Figura 12A). La respuesta transcripcional a la infección del fenotipo susceptible Blanco (A+Pb) cambió a un perfil compatible con un estado de menor susceptibilidad, que consistió en el incremento significativo de la expresión de los antagonistas de la infección *lrin1* y *tep*, y reguló negativamente la respuesta transcripcional del agonista *ctl4* (Pb vs A+Pb). Este perfil transcripcional es coherente con la menor abundancia e intensidad de la infección observada con el tratamiento desmetilante (Figura 12C; B+A y B+D).

Interesantemente, el tratamiento con azacitidina impidió la transcripción de *duox* en mosquitos de ambos fenotipos retados con el parásito. Además de su actividad antimicrobiana a través de la producción de peróxido de hidrógeno, la enzima DUOX está asociada con mecanismos que reducen el daño a la microbiota del hospedero a través de disminuir la intensidad de la respuesta inmune después de la hemoalimentación (Kumar et al. 2010). En este mismo sentido, se ha demostrado que el silenciamiento de DUOX promueve respuestas inmunes efectivas que incluyen el incremento de TEP1, lo que conduce a menores cargas de infección (Kakani et al. 2019).

Por otra parte, la actividad de fenoloxidasa (y la transcripción del gen *ppo1*) probablemente no esté relacionada con la muerte del parásito en el modelo *A. albimanus-P. berghei*. El tratamiento con azacitidina que precedió al reto con el parásito aumentó la transcripción de *ppo1* únicamente en los mosquitos Blancos, mientras que en los mosquitos fenotipo Café no se observó cambio transcripcional. No obstante a lo anterior, ambos fenotipos redujeron efectivamente la carga de infección. El hecho de que no se observaron restos de parásitos o melanización, sugiere que el parásito se elimina por lisis.

A pesar de que el tratamiento con los inhibidores disminuyó la transcripción global, aumentó la transcripción de *lim1* y *tep* en ambos mosquitos y disminuyó la carga parasitaria lo que indica que la metilación del ADN juega un papel en el desarrollo de la infección. Lo anterior se puede interpretar como una respuesta transcripcional limitada, pero con mayor especificidad contra el parásito. Pese a lo anterior, persistieron algunas diferencias entre los fenotipos después de los tratamientos con inhibidores, lo que lleva a considerar a otros factores como los responsables de estas diferencias. En principio, se consideraron a las diferencias genéticas como la potencial causa. Se buscaron diferencias en el gen *dnmt2*; sin embargo, resultó ser idéntico en ambos fenotipos al realizar la secuenciación.

Una segunda posibilidad podría radicar en el factor de transcripción NF- κ B, con base en que todos los genes evaluados en este estudio tienen sitios de unión predichos para esta familia de factores de transcripción, incluidos *dnmt2* y *tet2*. La excepción es *frep3* que no tiene sitios de unión putativos para NF- κ B y no mostró cambios transcripcionales significativos en ninguna condición probada en el fenotipo Blanco (Tabla S1). Una tercera posibilidad es la regulación a través de otros mecanismos epigenéticos. Se sabe que la regulación génica por metilación del ADN depende del contexto, tanto de los genes circundantes (Jones 2012; Kumar et al. 2010; Ambrosi, Manzo, y Baubec 2017) como de otras marcas epigenéticas asociadas, como la acetilación de histonas y la organización nucleosómica (Hunt et al. 2013a; Ruiz et al. 2019; Jenkins y Muskavitch 2015; Coleman-Derr y Zilberman 2012).

A la fecha, existen varios ejemplos de la estrecha relación entre la metilación del ADN y modificaciones epigenéticas en las histonas (Hunt et al. 2013a; Cho et al. 2005), en particular la desacetilación. La proteína 2 de unión a CpG metilado (MeCP2) y otras proteínas MBD, reclutan histona desacetilasas que crean un ambiente dominante de cromatina represiva en respuesta a los cambios en el estado de metilación del ADN (Kass, Landsberger, y Wolffe 1997; Zhu et al. 2017). Teniendo en cuenta el escaso conocimiento del panorama epigenético en este insecto y la alta complejidad de la regulación, no se espera necesariamente una relación directa entre la metilación del ADN y una respuesta transcripcional particular, sobre todo porque los diferentes mecanismos epigenéticos están entrelazados. En este sentido, el genoma de *A. albimanus* tiene varios genes de histona desacetilasas entre otros elementos epigenéticos que deben tenerse en cuenta (Tabla S2).

El tránsito del parásito de la malaria a través del intestino medio del mosquito produce un cuello de botella que a menudo reduce la población de parásitos a un número de un solo dígito (Angrisano et al. 2012). Por lo tanto, las intervenciones de bloqueo de la transmisión deberían ser más efectivas en esta etapa de la infección. El tratamiento de los mosquitos con los azanucleósidos en el presente estudio constituyó un TBI eficiente, con una efectividad que oscila entre 70% y 96% (Figura 12D), por lo que la metilación del ADN podría modular la competencia vectorial.

CUARTA PARTE
OBSERVACIONES FINALES

OBSERVACIONES FINALES

Con el propósito de que las observaciones derivadas de esta investigación sean fuente para nuevos cuestionamientos en futuros estudios, se enumeran a continuación las observaciones finales de este trabajo:

1. El gen *dnmt2* está conservado como única copia en el mosquito *A. albimanus*.
2. *A. albimanus* posee todos los componentes necesarios para la regulación de la expresión génica por metilación de ácidos nucleicos.
3. El ADN genómico de intestino de mosquitos adultos contiene 5mC, por lo que DNMT2 es funcional en *A. albimanus*.
4. Los genes *dnmt2* y *tet2* se transcriben durante todo el desarrollo del mosquito y en mosquitos adultos.
5. La función de *dnmt2* es esencial para el desarrollo y viabilidad larvaria de *A. albimanus*.
6. El tratamiento inhibidor de la metilación no afecta la sobrevivencia de mosquitos adultos ni la sobrevivencia del parásito *P. berghei*.
7. La inhibición de la metilación en *A. albimanus* reduce la carga intestinal de ooquistes de *P. berghei*.
8. En *A. albimanus* fenotipo Blanco es más susceptible a la infección con *P. berghei* que el fenotipo Café.
9. En *A. albimanus*, la producción basal de óxido nítrico y la actividad de la enzima fenol-oxidasa no son características fenotípicas que condicionen a la susceptibilidad o resistencia a la infección con *P. berghei*.
10. La expresión de *dnmt2* y el porcentaje de 5mC en ADN genómico de intestino es diferencial entre los fenotipos Blanco y Café de *A. albimanus*; la abundancia del

transcrito *dnmt2* es 3.5 veces mayor en el fenotipo Café y su porcentaje de 5mC genómica es de $1.73\% \pm 0.22$, mientras que en el fenotipo Blanco es de $0.85\% \pm 0.17$.

11. El perfil de transcripción de genes de la respuesta inmune en intestino de mosquitos *A. albimanus* es diferencial entre los fenotipos. Abundancia de transcritos entre fenotipo Café vs fenotipo Blanco: *Irim1* (+6.3), *tep* (+4.1); *ctl4* (+11.6); *ctl6* (+4.4); *frep3* (+2.8).
12. La metilación del ADN en *A. albimanus* modula la transcripción de genes de la respuesta inmune.
13. El mosquito *A. albimanus* contiene 5mC en su ARN intestinal.
14. La Inhibición de la metilación no tiene efectos post-transcripcionales sobre la producción de óxido nítrico ni en la actividad de fenol-oxidasa. La Inhibición de la metilación no afecta la sobrevivencia de mosquitos adultos de ambos fenotipos.
15. En mosquitos *A. albimanus*, la alimentación con sangre y sangre infectada con *Plasmodium* aumentan la cantidad de metilación en el ADN de ambos fenotipos de mosquitos, por lo que el sistema de metilación de *A. albimanus* es un elemento de respuesta al reto inmune con *P. berghei*.
16. *A. albimanus* fenotipo Café responde transcripcionalmente al reto con *P. berghei* incrementando 21.3 veces la expresión de *dnmt2* y 1.2 veces la expresión de *tet2*.
17. Las regiones promotoras de *dnmt2* y *tet2* tienen sitios de unión putativos para la familia NF- κ B, los factores de transcripción maestros de la respuesta inmune.
18. La respuesta transcripcional de *A. albimanus* a la invasión parasitaria es diferencial entre los fenotipos: en el fenotipo Café-resistente la respuesta es intensa y robusta, la cual consiste en el incremento de *Irim1* (104 veces), *ctl4* (260 veces), *duox* (37,8 veces), *ctl6* (47,6 veces) y *frep3* (4,9 veces). En el fenotipo Blanco-susceptible su respuesta transcripcional se limita a la expresión de *ctl4*, con un incremento de 7.7 veces.

19. El tratamiento inhibidor de la metilación reduce significativamente la infección en el fenotipo Blanco-susceptible y es dependiente de la concentración.
20. La inhibición de la metilación en los fenotipos Blanco y Café de *A. albimanus*, elimina las diferencias de susceptibilidad a la infección por *P. berghei* entre los fenotipos.
21. El borrado farmacológico de la metilación en los fenotipos Blanco y Café de *A. albimanus*, reduce las diferencias transcripcionales entre los fenotipos en respuesta a la invasión del parásito.
22. En mosquitos *A. albimanus*, el tratamiento inhibidor de la metilación bloquea entre el 70% - 96% de las infecciones por el parásito de la malaria *P. berghei*.
23. Las diferencias fenotípicas entre *A. albimanus* Blanco y Café no radican en la secuencia génica de *dnmt2*.
24. *A. albimanus* posee genes codificantes para múltiples elementos de regulación epigenética que son potencialmente relevantes en la competencia vectorial de este mosquito.

QUINTA PARTE
PERSPECTIVAS

PERSPECTIVAS

Este informe muestra una visión general del papel del sistema de metilación del ADN en los mosquitos y agrega información sobre los cambios en la competencia del vector dentro de una especie de mosquito. Las direcciones potenciales para el trabajo futuro son en primera instancia: la determinación del patrón de metilación dentro de las diferentes regiones génicas, la regulación de la marca epigenética por TET2 y MDB, y la conexión entre la DNMT2 y el metabolismo de un carbono. Las vías de señalización de la metilación del ADN y su integración a los circuitos epigenéticos son aspectos esenciales que requieren ser definidos para tener una comprensión más completa de este fenómeno. Además, al considerar posibles interacciones con otros mecanismos epigenéticos se podrían aclarar aspectos de la regulación de la respuesta inmune, principalmente porque aún no está claro cómo *A. albimanus* se deshace del parásito de la malaria.

Para concluir, es necesario mencionar con cierto énfasis, las razones por las que el estudio de la metilación en insectos vectores es pertinente en México y en el mundo. Insectos como *Anopheles* y *Aedes* son vectores primarios de malaria y dengue respectivamente, enfermedades humanas catalogadas como problemas de salud pública en México y en el mundo. El estudio del efecto biológico de la metilación en el contexto de la infección o la resistencia de mosquitos vectores es pertinente, así como la vinculación con parámetros de impacto ecológico y de prevención de enfermedades transmitidas por vector, como lo son la supervivencia, la tasa de crecimiento, la fecundidad, la fertilidad, la oviposición, la eclosión de huevos y viabilidad de la descendencia de ambos géneros.

Este trabajo doctoral es el primer análisis de la relación entre la metilación del ADN, la expresión génica de la respuesta inmune y el estado de susceptibilidad/resistencia a la infección en dos fenotipos funcionales. Se requiere de futura investigación más detallada y profunda para una mejor comprensión de la epigenética y su impacto en la competencia vectorial, así como posteriores abordajes encaminados a interrumpir la transmisión de la enfermedad más devastadora transmitida por vectores.

SEXTA PARTE
MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

IDENTIFICACIÓN *IN SILICO* DE LOS GENES *DNMT2*, *TET2* Y *MBD*

Los genes homólogos para ADN C5-metiltransferasa (*dnmt*), la metil-citosina dioxigenasa tet (*tet*) y la proteína de unión a metilo (*mbp*) se identificaron en el banco de datos del genoma de *A. albimanus* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/11556>) y en la base de datos de vectores (<https://www.vectorbase.org/>) (Figs. S1-S3). El análisis de secuencia y la determinación del dominio de proteínas se realizaron utilizando InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>).

ANOPHELES ALBIMANUS WEDEMANN (1820)

El manejo de *Anopheles albimanus* se realizó con base en la metodología de Benedict (2010) y Foggie y Achee (2009) (Benedict 2010; Foggie y Achee 2009), con adaptaciones y modificaciones en el insectario del Centro de Investigaciones sobre Enfermedades Infecciosas (CISEI) del Instituto Nacional De Salud Pública (INSP) sede Cuernavaca, Morelos (Anexo 1; manejo de *A. albimanus*).

PLASMODIUM BERGHEI

CRECIMIENTO DE LAS FASES MEROGÓNICAS EN EL RATÓN

La cepa *Plasmodium berghei* Antwerpen-Katanga-GFP (*P. berghei* ANKA-GFP) (amablemente donada por el Dr. R. Sinden, Imperial College London) se utilizó a lo largo de los experimentos. La cepa *P. berghei* ANKA-GFP (Rodríguez et al. 2002) que expresa constitutivamente la proteína verde fluorescente, fue mantenida en ratones BALB/c machos de 6 a 8 semanas de edad mediante pases por inoculaciones intraperitoneales a partir de un criopreservado en nitrógeno líquido (sangre de ratón infectada y diluida 1:1 con una solución criopreservante; 28% v/v de glicerol, 4.2% p/v de

sorbito y 111.22 mM de NaCl). Los parásitos se propagaron hasta el pase ocho y hasta por 15 días en cada ratón, para evitar la pérdida de la capacidad de formar gametocitos. La parasitemia se monitoreó mediante extendidos de sangre finos teñidos con Giemsa al 30% en agua por 10 min. Los pases se realizaron mediante la extracción de la sangre vía punción cardíaca con una jeringa heparinizada a una concentración final de 2.5 UI/ml con la sangre de un ratón infectado, previamente sacrificado en una cámara de CO₂ (cumpliendo con los criterios del Comité de Bioética).

CULTIVO DE OOCINETOS

Los oocinetos *P. berghei* ANKA-GFP fueron cultivados según lo descrito por Rodríguez et al. (2002) (Rodríguez et al. 2002). Ratones BALB/c machos de 6 a 8 semanas de edad fueron tratados intraperitonealmente con fenilhidrazina (6 mg / ml en solución salina al 0,8%; en un volumen final de 200 μ l) dos días antes de la inoculación de 2 a 4 x 10⁸ parásitos por la misma ruta. Ratones con parasitemia del 15-25% y con viabilidad de los gametocitos verificada, fueron sacrificados con CO₂ para la preparación del cultivo. Se extrajo la sangre infectada de los ratones por punción cardíaca con una jeringa heparinizada y posteriormente se incubó a 19-20°C durante 20-24 h en medio RPMI-Ook (1 : 4, sangre : medio) para permitir la formación de los oocinetos. El medio RPMI-Ook consiste en medio RPMI-1640 a pH 8,3 suplementado con 23,81 mM de bicarbonato de sodio, 0,37 mM de hipoxantina, 25 mM de HEPES, PSN (0,05 mg / ml de penicilina, estreptomina 0,05 mg / ml y neomicina 0,1 mg / ml) y 20% v / v de suero fetal bovino inactivado por calor al (FBS). Los oocinetos se cuantificaron en un hemocitómetro con una cuadrícula de Neubauer mejorada.

ENSAYOS DE INHIBICIÓN DE LA METILACIÓN

Para inhibir la metilación de los ácidos nucleicos, se utilizó el inhibidor de metilación de ADN / ARN azacitidina (aza-C; 5-azacitidina), y el inhibidor de metilación exclusivo de ADN decitabina (aza-dC; 5-Aza-2'-desoxicitidina). Las larvas y los mosquitos se mantuvieron en condiciones experimentales óptimas para el desarrollo de *Plasmodium* (ver Anexo 1; manejo de *A. albimanus*).

INHIBICIÓN DE LA METILACIÓN EN LA ONTOGENIA DE *A. ALBIMANUS*

Para evaluar el impacto de la metilación en ácidos nucleicos durante el desarrollo, se seleccionaron y trataron a 100 larvas de una hora post-eclosión con azacitidina ($50 \mu\text{M}$) en placas de cultivo de 6 pozos en un volumen de 10 ml (ver Anexo 1; inhibición de la metilación en la ontogenia). Para evitar la acumulación de los compuestos, el tratamiento se repuso cada 48 h moviendo las larvas a un pozo adyacente que contenía un tratamiento nuevo. Cada 24 h se evaluó la supervivencia de las larvas y se midió el crecimiento tomando la longitud cefálico-caudal. Las etapas de desarrollo se evaluaron mediante la recolección y observación de exuvias con un microscopio estereoscópico (Carton DSZ 44). Los volúmenes de agua y alimento se calcularon con base en los requerimientos de cada estadio de desarrollo y se repusieron cada 24 h. Los cadáveres se retiraron diariamente hasta concluidos los ensayos.

INHIBICIÓN DE LA METILACIÓN EN MOSQUITOS *A. ALBIMANUS*

Todos los tratamientos tuvieron una duración de 72 h retirándose 6 h previas a la hemoalimentación o alimentación con parásitos (ver Anexo 1; adultos, preparación de mosquitos). Hembras *A. albimanus* de 2 días posteriores a la emergencia (dpe) fueron alimentadas durante 2 h con **solución preparativa** que consiste en sacarosa al 8%, PABA al 0.05% (p/v) y PSN. Posteriormente se sustituyó la solución preparativa y se iniciaron los tratamientos de inhibición de la metilación mediante la alimentación *ad libitum* en almohadillas de algodón humedecidas con azacitidina ($50 \mu\text{M}$) o decitabina ($50 \mu\text{M}$) en 10 ml de solución preparativa. Se reemplazaron las almohadillas de algodón con el tratamiento cada 24 h. Cumplidas las 72 h de tratamiento, se tomaron muestras de intestino para la evaluación de los efectos del tratamiento de inhibición (ver Anexo 1; toma de muestras). En todos los experimentos se retiraron los cadáveres y se cuantificó la supervivencia cada 24 h hasta su conclusión.

EFFECTO DE AZACITIDINA EN LA SOBREVIVENCIA Y DESARROLLO DE *P. BERGHEI*

Los cultivos de ooquistes se realizaron con base en la metodología de Recio-Tótoro (Recio-Tótoro 2015). Para determinar si la azacitidina afecta la supervivencia o el desarrollo del parásito, los oocinetos se purificaron para cultivarse en presencia de azacitidina (50 μ M).

Se utilizaron PBS y H₂O₂ 1 mM de como controles. Los oocinetos se purificaron mediante su adhesión a un gel de matriz extracelular (gel ECM) y posterior eliminación de las células contaminantes en el cultivo (i. e. eritrocitos y otras etapas de parásitos) con lavados de PBS. Las purificaciones se realizaron en cubreobjetos recubiertos con 20 μ l de gel ECM diluido 1/3 con medio MEM. Los cubreobjetos se colocaron en placas de cultivo de 24 pozos y se añadió 500 μ l de cultivo de oocinetos *P. berghei* ANKA-GFP con 400 oocinetos / μ l. Después de 4 h de incubación a 19-20°C, los cubreobjetos se lavaron con 2 ml de PBS y se colocaron en pozos para su posterior cultivo (27). Para permitir la formación de ooquistes, los parásitos se cultivaron a 19-20°C en medio Schn-Ooq que consiste en medio para insectos de Schneider a pH 6.8 suplementado con 23.8 mM de bicarbonato de sodio, 3.68 mM de hipoxantina, PSN, 44 μ M de PABA, 0.2% de lípidos / colesterol y 15% de FBS (28). Posteriormente se realizaron los conteos totales de oocinetos por pozo (tiempo cero) en un microscopio de epifluorescencia (Nikon ECLIPSE TS 100) y se inició el tratamiento con azacitidina (50 μ M). La supervivencia y el desarrollo del parásito se determinaron con microscopía de fluorescencia a las 0, 12, 36 y 72 h de cultivo.

INFECCIONES DE MOSQUITOS *A. ALBIMANUS* CON *P. BERGHEI*

INFECCIONES

Las infecciones se realizaron con la metodología de alimentación de membrana estándar (Churcher et al. 2012). Todos los experimentos se realizaron con *P.berghei* ANKA-GFP propagado en ratón BALB/C (<8 pases), con parasitemias entre el 15-25% y > 7 centros de exflagelación por campo de visión a 400X. Los oocinetos se contaron en una cámara de Neubauer y el cultivo se centrifugó a 2000 rpm durante 5 min a 19°C. El sedimento de oocinetos se resuspendió a una concentración *P.berghei* ANKA-GFP final

de 400 oocinetos / μ l con SFBdc para las alimentaciones. Como control, se prepararon cultivos simulados bajo las mismas condiciones con la sangre de ratones no infectados. Los mosquitos hembra de 5 dpe permanecieron en ayuno durante 6 h y posteriormente se alimentaron durante 30-60 min con *P.berghei* ANKA-GFP (400 oocinetos / μ l) o cultivo control, a una temperatura de 37°C en un recirculador. Hembras alimentadas parcialmente o sin alimentar, fueron excluidas de los experimentos (ver Anexo 1; preparación de mosquitos y manejo de mosquitos infectados).

PREVALENCIA, ABUNDANCIA, INTENSIDAD Y EFICIENCIA DE LAS INTERVENCIONES EN EL BLOQUEO DE LA TRANSMISIÓN DE LA INFECCIÓN

La evaluación de la infección se midió 3 días posteriores a la infección (dpi). Se disecaron intestinos medios en PBS de 30 mosquitos hembra y se observaron los ooquistes *P.berghei* ANKA-GFP por microscopía de fluorescencia (microscopio Leica DM1000 con una lámpara de mercurio y el filtro Leica H3) (ver Anexo I). Se determinaron la prevalencia, la abundancia y la intensidad de las infecciones de tres experimentos independientes. La eficiencia del bloqueo de la transmisión (por sus siglas en inglés TBIs; *Transmission blocking interventions*) se calculó con la siguiente fórmula de Churcher, et al. (2012)(Churcher et al. 2012):

$$Eficiencia = \frac{C - E}{C} \times 100$$

donde C es la media de la prevalencia (o la intensidad de infección) en el grupo control y E es la media de la prevalencia (o la intensidad de infección) en el grupo experimental.

ADN GENÓMICO Y ARN

EXTRACCIÓN

El ADN genómico se extrajo de 30 intestinos por muestra (ver Anexo 1; toma de muestras). Las muestras se incubaron en 744 μ l de solución de lisis (10mM de Tris.CL a pH 8.0, 0.1M de EDTA a pH 8.0 y 0,5% de SDS) y 13 μ l de proteinasa K (20 mg/ml)

toda la noche a 55 °C. Después de agregar 13 μ l de RNAasa (4 mg/ml) y mezclar por inversión 20 s, las muestras se incubaron durante 15 minutos a 37°C. Las proteínas se precipitaron con 248 μ l de acetato de amonio 3 M durante 10 min a 4°C y se centrifugó a 13000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se colectó la fase acuosa para colocarla en un tubo nuevo y el ADN se precipitó con un volumen de isopropanol e incubación durante 10 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 13000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Las muestras se lavaron con dos volúmenes de etanol al 75% y se centrifugaron a 13000 rpm durante 5 minutos a 4°C. El ADN se resuspendió en agua desionizada pura de alta calidad (dpac).

El ARN se extrajo empleando el protocolo TRIzol (Thermo Fisher Scientific). Se colectaron 30 intestinos por muestra y se incubaron en 500 μ l de TRIzol durante 5 minutos a temperatura ambiente. Después de agregar 100 μ l de cloroformo y mezclar por inversión 20 s, las muestras se incubaron 3 min a temperatura ambiente para centrifugarse posteriormente a 13000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Se colectó la fase acuosa y trasladó a un tubo nuevo. El ARN se precipitó con un volumen de isopropanol durante 5 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 13000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Las muestras se lavaron con dos volúmenes de etanol al 75% y se centrifugaron a 13000 rpm durante 5 minutos a 4°C. El ARN se resuspendió en agua dpac.

La concentración de ADN y ARN se determinó a través de una absorbancia de 260/280 nm y 260/230 nm (NanoDrop 2000, Thermo Fisher Scientific). La integridad del ADN y el ARN se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Alícuotas de las muestras se almacenaron a -20 ° C hasta su posterior uso.

SÍNTESIS DE ADN COMPLEMENTARIO Y PCR

TRATAMIENTO CON ADNSA. A extractos de ARN (1 μ g en 8 μ l de agua dpac) se adicionó 1 μ l de tampón para ADNSa 10X y se trataron con 1 unidad de ADNSa I. La reacción se incubó durante 30 min / 37°C y posteriormente se adicionando 1 μ l de EDTA 50 mM.

SÍNTESIS DE ADNc. A 1 μg de ARN tratado con ADNsa I se le adicionó 1 μl de Oligo dT (500 ng/ μl) e incubó durante 10 min/70° C. Posteriormente se agregaron 10 μl de la mezcla maestra (10 mM de dNTP's; 0.1 mM de DTT; 20U de inhibidor de ARNsa; tampon de transcriptasa reversa 5X y agua libre de ARNsas) y se mezcló por pipeteo. Se agregó 1 μl de M-MLVRT (200U/ μl) e inició y mantuvo la reacción durante 1 h / 42°C. La reacción se detuvo colocándola a 4°C.

PCR. Los genes *dnmt2*, *tet2* y *s7* se amplificaron en reacciones de 12.5 μl con 10 ng de ADNc, 0.5 μM de cada oligonucleótido (Tabla S1), 1 μM de dNTP, 1.25 mM de MgCl_2 , tampón DreamTaq Green (con 2 mM MgCl_2) y 1.25 U de enzima DreamTaq Green DNA pol. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador B100-RAD T100™ utilizando el siguiente programa: 95°C / 2 min; (95°C / 30 s; 60°C / 30 s; 72°C / 40 s) 35 X; 72°C / 5 min. Los productos de PCR (*dnmt2*: 100 pb; *tet2*: 113 pb; *s7*: 105 pb) se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% en TBE.

qPCR. Los genes *dnmt2*, *tet2*, *ctl4*, *ctl6*, *lrim1*, *tep15*, *duox*, *ppo1*, *frep3* y *s7* se amplificaron en reacciones de 10 μl , de la siguiente manera: las mezclas de 5 ng de cADN, 0.25 μM de cada oligonucleótido (Tabla S1), agua y MasterMix SYBR Green (con 2.5 mM de MgCl_2) se cargaron en placas de 96 pozos en un termociclador ViiA™ 7 (Applied Biosystems). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 95°C / 2 min; (95 °C / 30 s; 60 °C / 30 s; 72 °C / 30 s) 40 X; 72 °C / 5 min. Los productos de PCR se visualizaron en gel de agarosa al 2% en TBE. La eficiencia de amplificación se determinó con LinRegPCR. Los datos se normalizaron a la amplificación del gen S7.

PCR LARGO Y SECUENCIACIÓN DEL GEN DNMT2. El gen *dnmt2*, incluidas las regiones promotora y UTR 5' y 3', se amplificó a partir de ADN genómico de intestino medio de mosquitos. La amplificación de *dnmt2* se realizó en mezclas de 50 μl con 100 ng de cADN, 0.5 μM de cada oligo (Tabla S2), 1 μM dNTP's, 2.5 mM de MgCl_2 , tampón Long PCR y 2 U de Long PCR Enzyme. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador T100™ (BIO-RAD) en las siguientes condiciones: 95°C / 2 min, (95 °C / 20 s, 58 °C / 20 s, 72 °C / 2 min) 40 X; 72 °C / 5 min. El producto de PCR de *dnmt2* (2067 pb) se visualizó por electroforesis en un gel de agarosa al 1% en TBE. La banda de PCR se purificó del gel siguiendo las especificaciones del kit de extracción GeneJET. Después de la purificación, se cuantificó el amplicón en un NanoDrop 2000 y

se secuenció en la Unidad de síntesis y secuenciación del Instituto de Biotecnología-UNAM.

DIGESTIÓN CON LA ENZIMA DE RESTRICCIÓN *HPAII*

El ADN genómico del intestino (1 μ g) de mosquitos hembra (ver Anexo I; toma de muestras) se digirió con 1 unidad de *HpaII* en tampón Fast Digest durante 1 h a 37 °C en un baño seco (Corning LSE Digital Dry Bath). Los productos de digestión de ADN se visualizaron en electroforesis en gel de agarosa al 1% en TBE.

DOT BLOT

Se inmunodetectó 5mC en ADN genómico de intestino de mosquitos hembra mediante con un anticuerpo anti-5^mC (Zymo research, A3001-200). Se incubaron diluciones en serie (1 μ g, 500 ng, 250 ng, 125 ng, 75 ng y 37.5 ng) de ADN en citrato de sodio salino (SSC) 6X en un volumen final 10 μ l de durante 10 minutos a 100 °C. La mezcla resultante se clarificó por centrifugación a 13 000 rpm durante 30 s a temperatura ambiente y se complementó con 10 μ l de de SSC 20X. Las muestras se colocaron gota a gota en una membrana de nitrocelulosa humedecida con SSC 20X y se incubaron 10 min a temperatura ambiente. La membrana se transfirió a 1,5 M de NaCl / 0,5 M de NaOH durante 10 minutos a temperatura ambiente, y se neutralizó con 1,5 M de NaCl / 0,5 M de Tris-Cl pH 7 durante 10 min a temperatura ambiente. La membrana se secó y el ADN se fijó con luz UV (254 nm) durante 45 s. Después de lavar la membrana tres veces con PBS / Tween20 al 0,1% (4 ml / cm²) durante 10 minutos a temperatura ambiente, se bloqueó con leche en polvo sin grasa al 5% en PBS / Tween20 al 0,5% a 4°C en agitación horizontal durante toda la noche. La membrana se lavó tres veces en agitación con PBS / Tween20 al 0,1% durante 10 min y se incubó con anticuerpo anti-5mC (Zymo research, A3001-200) en solución de bloqueo con leche en polvo sin grasa al 1% en PBS / Tween20 al 0,5% durante 2 h en agitación a temperatura ambiente. Después de cuatro lavados más con PBS / Tween20 al 0,1%, la membrana se incubó con α PRP (1:1000; GERPN2108 - ECL™ Western Blotting Analysis System) en

solución de bloqueo con leche en polvo sin grasa al 1% en PBS / Tween20 al 0,5% durante 2 h en agitación a temperatura ambiente. Después de cuatro lavados con PBS / Tween20 al 0,1%, se reveló por quimioluminiscencia siguiendo las especificaciones del proveedor de GERPN2108 - ECL™ Western Blotting Analysis System en una película KODAK BioMax Light.

HPLC-FLD

La metilación en ADN y ARN se cuantificó por HPLC con base en la metodología de Lopez-Torres, et al (2011) (Lopez Torres et al. 2011) con modificaciones menores. **HIDRÓLISIS.** El ADN genómico de intestino de mosquito hembra fue digerido con ADNsa I y nucleasa S1 en 50 μ l con las siguientes concentraciones finales: 2 μ g de ADN genómico; 20 mM de CH₃COOH, 20 mM de glicina; 5 mM MgCl₂; 0.5 mM de ClZn; 0.2 mM ClCa; 2U de ADNsa I; 0.2 U de Nucleasa S1. Las reacciones se mantuvieron durante toda la noche a 37°C. El ADN digerido se calentó durante 5 min a 95°C y se enfrió rápidamente a 4°C. Se adicionó NaOH (final 10 mM) y fosfatasa alcalina (final 0.2 U) y se incubó durante 2 h a 37°C. Para la digestión de ARN, se usaron ARNasa H y nucleasa P1.

DERIVATIZACIÓN. Las muestras de ADN y ARN se aforaron a un volumen de 60 μ l con agua desionizada y se evaporaron en un SpeedVac SC110 (Savant) ajustado en calentamiento durante 30 minutos. Las muestras se reconstituyeron en 130 μ l dimetilformamida (DMF) y 5 μ l de CH₃COOH al 100%. Los nucleósidos se derivatizaron con 20 μ l de bromoacetofenona (0.5 M en DMF) y Na₂SO₄ durante 90 minutos a 80°C en oscuridad.

CROMATOGRAFÍA. El análisis por HPLC se realizó en un equipo Agilent Series 1100 utilizando una columna Agilent Sorbax C18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m) y una precolumna Supelco. Las muestras se diluyeron 1 : 1 en agua y el volumen de inyección fue de 20 μ l. La temperatura de la columna se mantuvo a 28°C y se utilizaron cuatro fases móviles diferentes: acetonitrilo (A), 0.4% m/v de TFA (B), metanol (C) y agua (D). La separación se llevó a cabo a un flujo de 0,4 ml / min con el siguiente programa: 0-2 min 5% A, 13% B, 20% C y 62% D; 4-12 min 10% de A, 13% B, 28% C y 49% D; 14-19 min 12% A, 13%

B, 28% C y 47% D; 20-23 min 15% A, 13% B, 60% C y 12% D; 25 min 5% A, 13% B 20% C y 62% D. Los nucleósidos derivatizados se detectaron fluorométricamente a longitudes de onda de excitación / emisión de 306 / 378 nm.

ACTIVIDAD DE FENOLOXIDASA

La actividad de fenol oxidasa (PO) se midió siguiendo la metodología de Li, et al. (2012) (X. Li et al. 2012) con adaptaciones. Se maceraron 30 mosquitos hembra en 500 μ l PBS frío durante 1 min a 4°C y se centrifugaron a 10000 g durante 10 minutos a 4°C. Se colectaron los supernadantes y se colocaron 20 μ l en placas de 96 pozos por duplicado para evaluar la enzima activa, la enzima total, la inhibición enzimática, así como los controles de auto-oxidación y los blancos correspondientes. Para cuantificar la actividad de enzima total, se activó pro-fenol oxidasa (PPO) con 10 μ l de isopropanol al 100%. Para inhibir la enzima, se añadieron 10 μ l de feniltiourea 1 mM y se usaron 10 μ l de PBS para medir la actividad de enzima activa basal. Las muestras se incubaron 5 min a temperatura ambiente para activar o inhibir a la PPO. Para iniciar el ensayo, se añadieron 80 μ l de L-DOPA 10 mM y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Se incluyeron controles de auto-oxidación (solo L-DOPA) y blancos (mosquitos macerados). La actividad de PO se midió cada minuto durante 30 minutos a 490 nm en un lector de microplacas (ELISA iMark™, BIO-RAD).

CUANTIFICACIÓN DE NITRITOS Y NITRATOS

Los nitritos y nitratos se evaluaron mediante el ensayo de Griess siguiendo la metodología de Miranda et al. (2001) (Miranda, Espey, y Wink 2001). Se maceraron 30 mosquitos hembra en 500 μ l PBS frío durante 1 min a 4°C y se centrifugaron a 10000 g durante 10 minutos a 4°C. Se colectaron los supernadantes y se centrifugaron nuevamente a 10000 g durante 10 minutos a 4°C. Las proteínas se eliminaron de 250 μ l de cada muestra mediante la adición de 1/10 del volumen de ZnSO₄ (0.15 g / mL en 0.055 N de NaOH) y la agitación vigorosa durante 1 min. Las muestras se centrifugaron a 10000 g durante 10 minutos a 4°C y se colocaron 30 μ l del supernadante en placas

de 96 pozos para el ensayo de Griess. La concentración de proteína se cuantificó antes y después de la desproteínización en un espectrofotómetro NanoDrop 2000.

NITRITOS Y ESTÁNDAR. Se agregaron 30 μ l de PBS e inmediatamente se adicionaron 30 μ l de Sulfanilamida (1% m/v en 2.5% H_3PO_4 v/v) y 30 μ l de NED (0.1% m/v en 2.5% H_3PO_4 v/v).

NITRATOS. Se agregaron 30 μ l de VCl_3 (8 mg/ml en 1 N de HCl;) e inmediatamente se adicionaron 30 μ l de Sulfanilamida (1% m/v en 2.5% H_3PO_4 v/v) y 30 μ l de NED (0.1% m/v en 2.5% H_3PO_4 v/v).

Se realizó una curva estándar con $NaNO_2$ de 0 a 50 μ M en un volumen de 30 μ l. Las reacciones se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente. Se realizó la lectura a 490 nm y 630 nm en un lector de microplacas (ELISA iMark™, BIO-RAD).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se analizaron con el software estadístico Prism 6. La supervivencia de larvas, adultos y parásitos se analizó mediante la prueba Mantel-Cox. El crecimiento de las larvas se analizó con la prueba de Kruskal-Wallis y de comparación múltiple de Dunns. Los parámetros de infección se analizaron mediante las pruebas de Mann-Whitney, Kruskal-Wallis y de comparaciones múltiples de Dunn. Los resultados de PCR, cromatografía, PO y NO se analizaron mediante la realización de una prueba t de dos colas o ANOVA, seguida de una prueba de comparación múltiple de Tukey.

DISEÑO EXPERIMENTAL Y DATOS ADICIONALES

Para detalles de selección, manejo y toma de muestras de mosquitos ver Anexo I. Para especificaciones de materiales y reactivos ver Anexo II. Para preparación de soluciones de trabajo y de almacenamiento ver Anexo III.

SÉPTIMA PARTE
FIGURAS

FIGURA S1

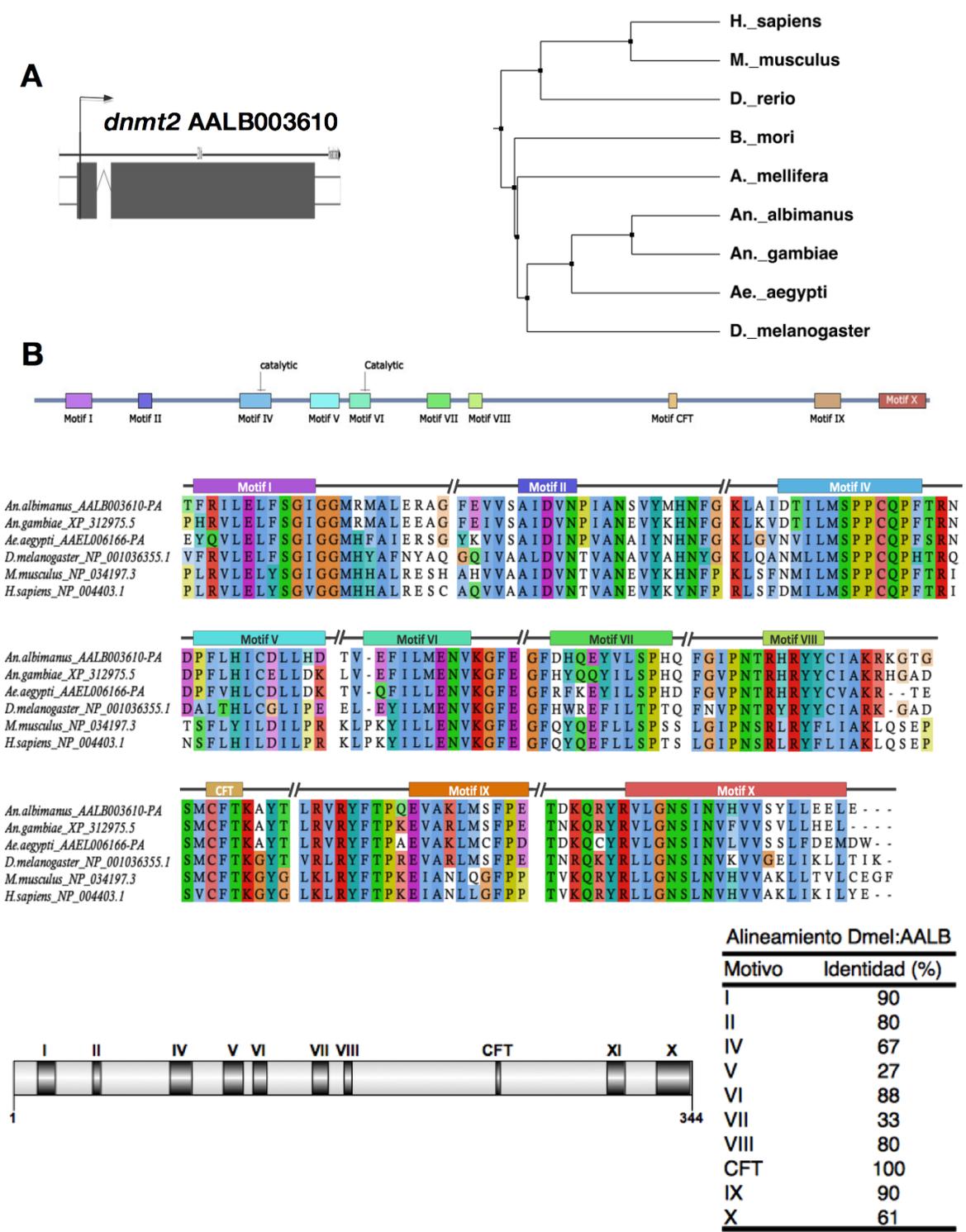


Figura S1. Identificación *in silico* del gen candidato *dnmt2*.

(A) Representación esquemática del gen *dnmt2*. El gen *dnmt2* está localizado en el SuperContig KB672468: 4,759,720 - 4,761,021; anotado como AALB003610. Este gen está constituido por dos exones que forman un transcrito final de 1.236 pb que codifica una proteína de 344 aminoácidos. La región carboxilo terminal de la proteína presenta un dominio de (citosina-C5)-metiltransferasa (IPR001525).

(B) Múltiples alineamientos de las proteínas de la familia DNMT2. Se analizaron los motivos conservados de DNMT2 (I, II, IV, V, VI, VII, VIII, CFT, IX y X) en *Anopheles albimanus*, *Anopheles gambiae*, *Aedes aegypti*, *Drosophila melanogaster*, *Mus musculus* y *Homo sapiens*. Los aminoácidos están marcados en color de acuerdo a sus propiedades en ClustalW, Los números de acceso están anotados después de la anotación de la especie.

FIGURA S2

A

tet2 AALB005657



B

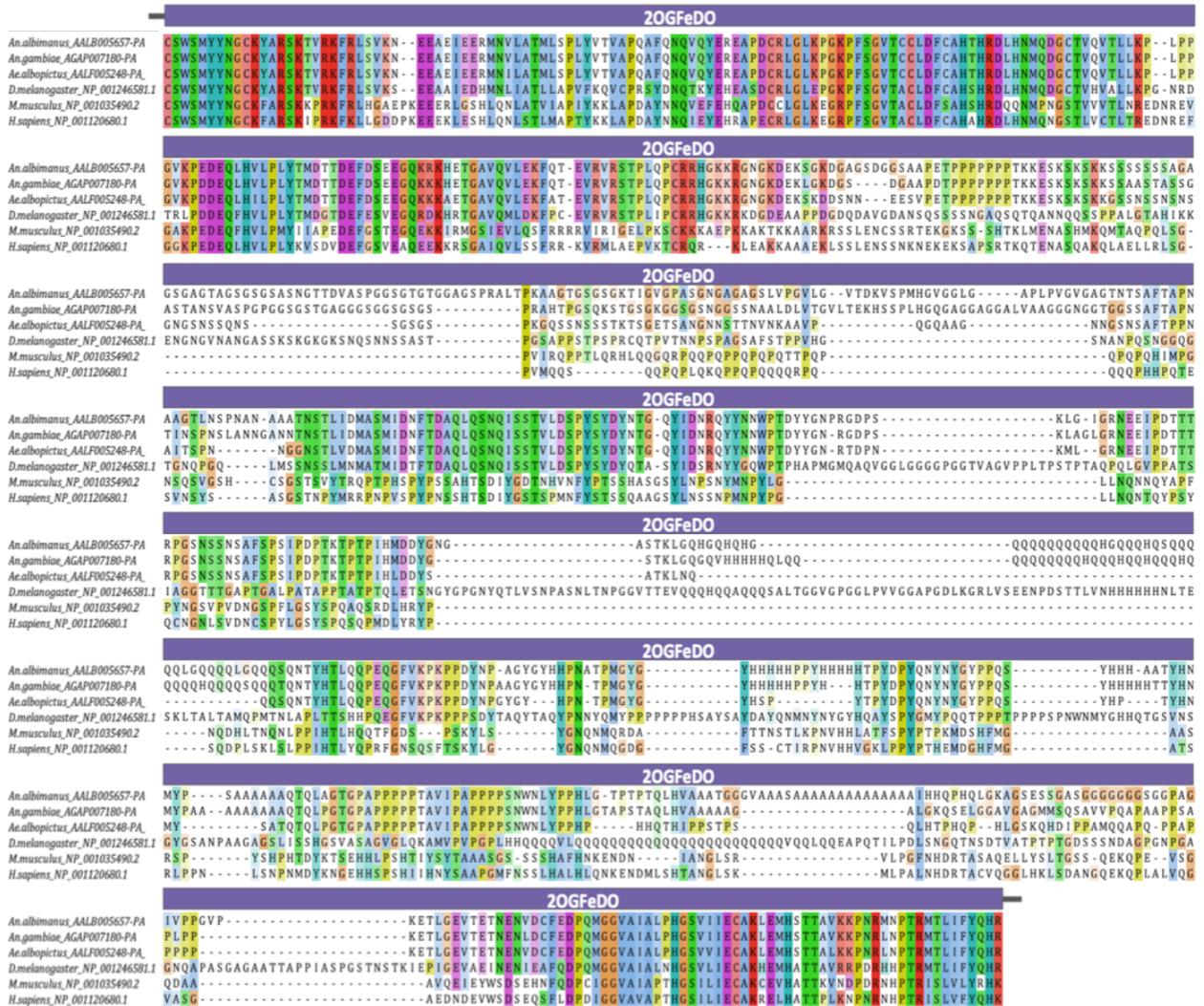


Figura. S2. Identificación *in silico* del gen candidato *tet2*.

(A) Representación esquemática del gen *tet2*. El gen *tet2* está localizado en el SuperContig KB672286; identificado como AALB005657. Está constituido por 11 exones que produce un ARNm de 6.153 pb que codifica una proteína de 2.050 aminoácidos. La proteína putativa muestra el motivo catalítico canónico de dioxigenasa 2-oxoglutarato (2OG) dependiente de Fe(II) (2OGFeDO) (IPR024779) (Fig. 2A.2 y Fig. S4). El dominio catalítico de las enzimas TET realiza la modificación del ácido nucleico a través de oxidaciones que conducen a la eliminación de la 5mC y la generación concomitante de hidroximetil-citosina (5hmC), o la oxidación adicional y formación de 5-formilcitosina (5fC) y 5-carboxilcitosina (5caC).

(B) Múltiples alineamientos de las proteínas de la familia TET2. Se analizó el motivo conservado 2OGFeDO en *Anopheles albimanus*, *Anopheles gambiae*, *Aedes albopictus*, *Drosophila melanogaster*, *Mus musculus* y *Homo sapiens*. Los aminoácidos están marcados en color de acuerdo a sus propiedades en ClustalW, Los números de acceso están anotados después de la anotación de la especie.

FIGURA S3

A

mbd AALB005086



B

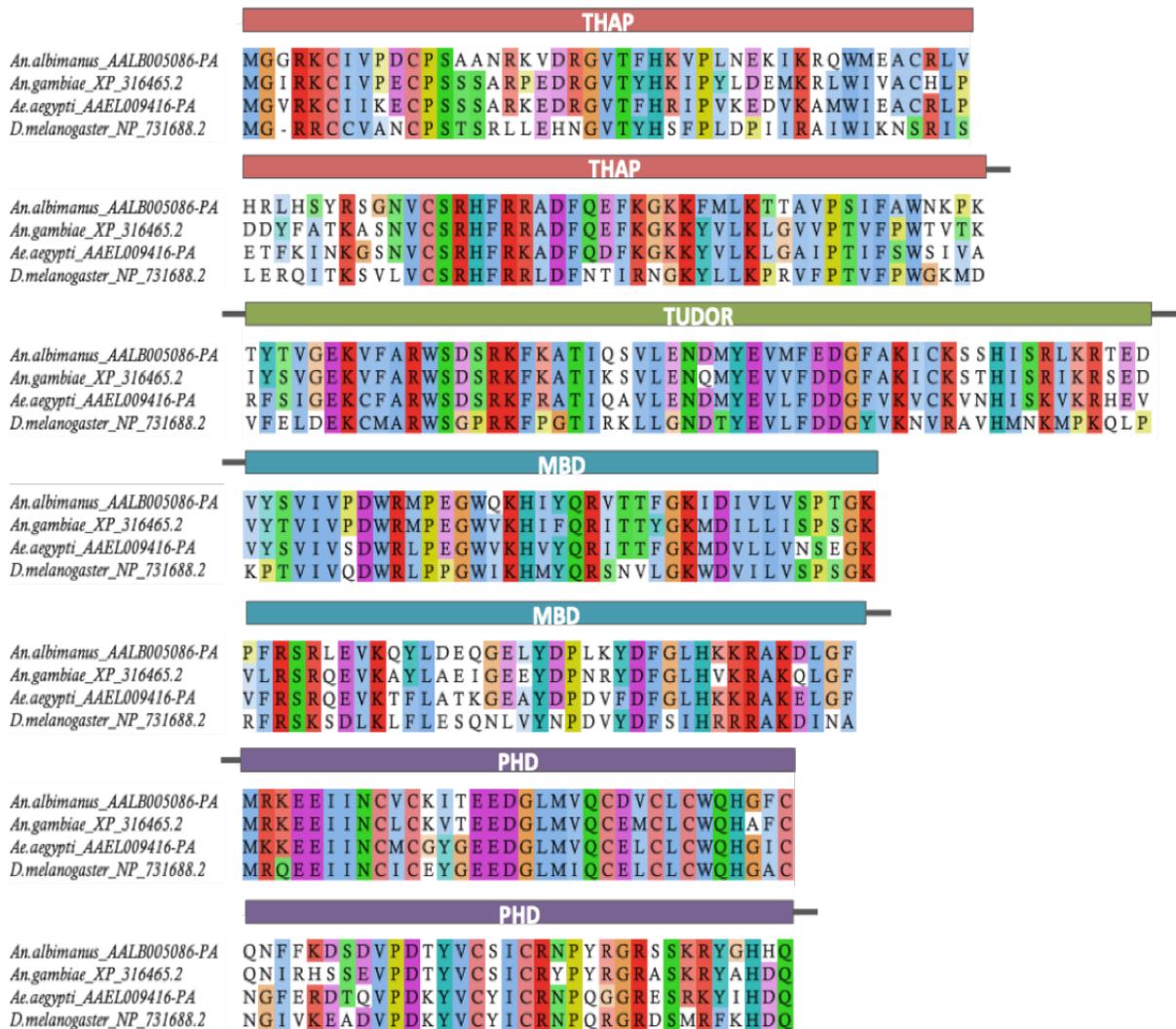


Figura S3. Identificación *in silico* del gen candidato *mbd*.

(A) Representación esquemática del gen *mbd*. El gen *mbd* está localizado en el SuperContig KB672286 de 16,080,137 - 16,083,522 e identificado como AALB005086. Contiene 2 exones que generan un ARNm de 3,324 bp codificante para una proteína de 1,107 aa. El gen contiene la secuencia del dominio específico de la familia de proteínas de unión a metil-CpG en el ADN (MBD) de alrededor de 70 aminoácidos (IPR001739) así como un dominio de dedo de Zinc de tipo C2CH (IPR006612) y un dominio de dedo de zinc de tipo PHD (IPR001965) (Fig1A; fig 1S.3) Las proteínas MBD contienen un dominio de unión a metil CpG que les confiere gran afinidad por sitios CpG metilados y poseen un dominio de represión transcripcional (TRD) que les permite unirse a una variedad de complejos represores.

(B) Múltiples alineamientos de las proteínas de la familia MBD. Se analizaron los motivos conservados de MBD (THAP, TUDOR, MBD, PHD) en *Anopheles albimanus*, *Anopheles gambiae*, *Aedes aegypti* y *Drosophila melanogaster*. Los aminoácidos están marcados en color de acuerdo a sus propiedades en ClustalW, Los números de acceso están anotados después de la anotación de la especie.

FIGURA S4

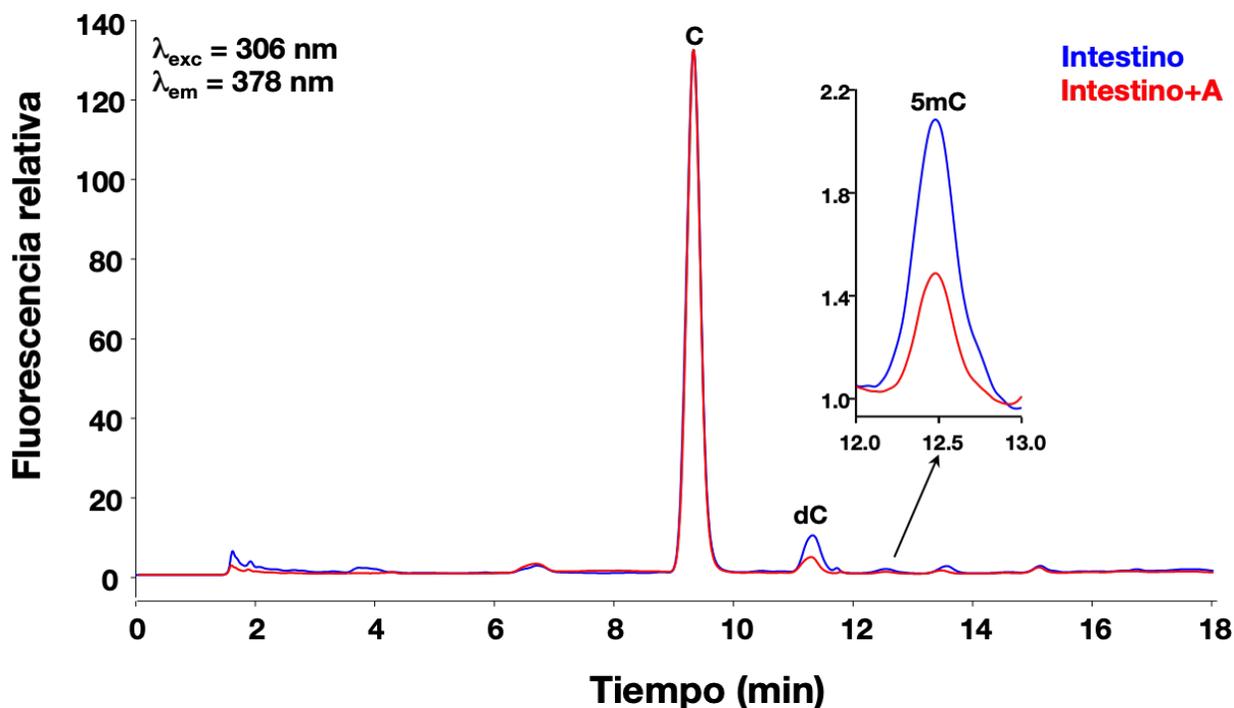


Figura S4. Detección de 5mC en ARN de intestinos de mosquitos tratados con azacitidina.

Mosquitos adultos de 2 dpe de de la cepa parental Tapachula fueron tratados con azacitidina (50 μM) durante 72 h. 1 μg de ARN total de intestino de 30 mosquitos por grupo fue derivatizado con 2-bromoacetofenona y detectado fluorométricamente a 306/378 nm excitación/emisión mediante HPLC-FLD.

FIGURA S5

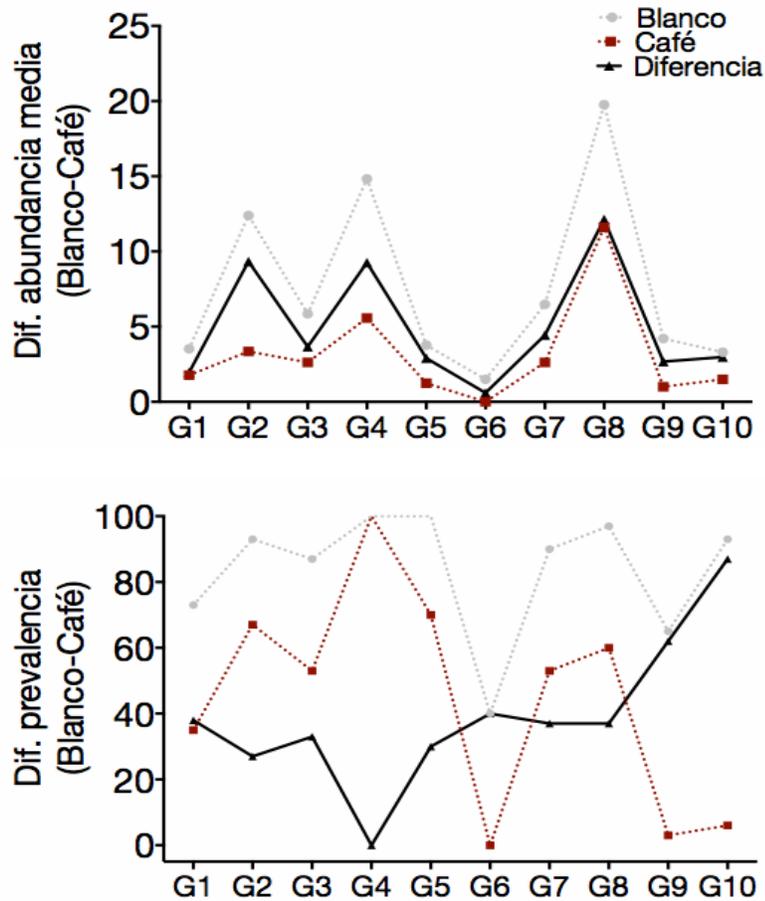


Figura S5. Diferencias en la abundancia media y en la prevalencia de la infección parasitaria entre los fenotipos Blanco y Café a través de diez generaciones.

Representación de la diferencia media de la abundancia de la infección (línea negra sólida) y de la diferencia de la prevalencia de la infección (línea negra sólida) entre los fenotipos Blanco y Café en 10 generaciones sucesivas. Hembras de 5 días post-emergencia (dpe) fueron alimentadas con 400 oocinetos/ μ l y tres días post-alimentación se determinaron los parámetros de infección intestinal mediante microscopia de fluorescencia.

FIGURA S6

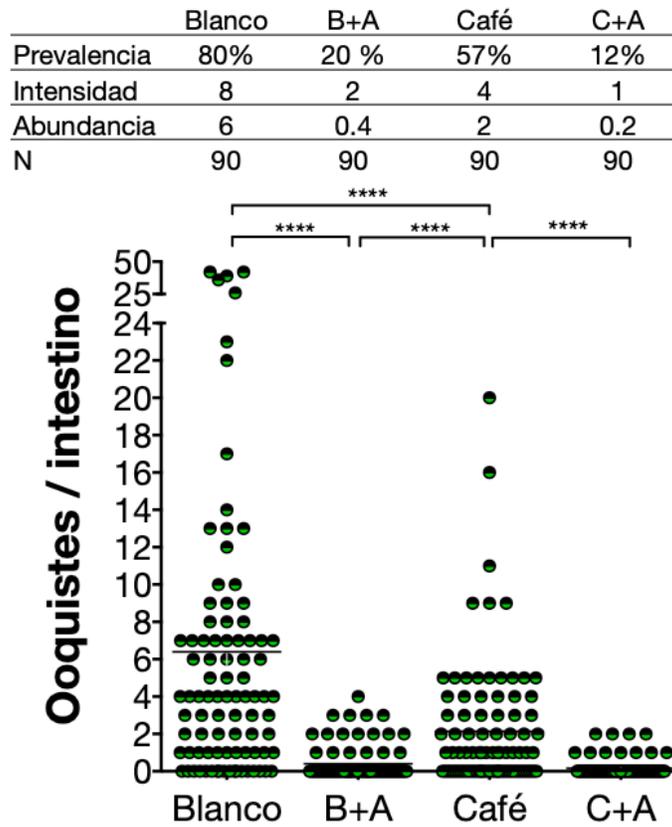


Figura S6. Efecto de la inhibición de la metilación sobre la carga de ooquistes de *Plasmodium* en los fenotipos Blanco y Café.

Mosquitos adultos de 2 dpe de ambos fenotipos fueron tratados con azacitidina (50 μ M) durante 72 h y alimentados con 400 oocinetos/ μ l. Tres días después del reto con *P. berghei* se determinó la carga de ooquistes intestinales en los mosquitos tratados fenotipo Blanco (B+A) y fenotipo Café (C+A). Prevalencia, intensidad y abundancia de la infección con *P. berghei*. Tres experimentos independientes con 30 mosquitos por grupo. **** $p < 0.0001$. Prueba de Kruskal-Wallis y prueba de comparación múltiple de Dunn.

FIGURA S7

*An. albimanus*_White CGGCTTTGATTTGCTTTAACTCTGGATTTAAAGACATTTTGCAATTTGTTTTTACCGCGTCTAACGAAGATACTTACTGCA
*An. albimanus*_Brown CGGCTTTGATTTGCTTTAACTCTGGATTTAAAGACATTTTGCAATTTGTTTTTACCGCGTCTAACGAAGATACTTACTGCA
*An. albimanus*_AALB003610 CGGCTTTGATTTGCTTTAACTCTGGATTTAAAGACATTTTGCAATTTGTTTTTACCGCGTCTAACGAAGATACTTACTGCA

*An. albimanus*_White CGGACGGAAAATGTTCCCGATTTCCAGCTGTTCTGTTTGTGTTCAATCTATTGTTCTCCCTGGTATCTAAAAAGGCTATCCGT
*An. albimanus*_Brown CGGACGGAAAATGTTCCCGATTTCCAGCTGTTCTGTTTGTGTTCAATCTATTGTTCTCCCTGGTATCTAAAAAGGCTATCCGT
*An. albimanus*_AALB003610 CGGACGGAAAATGTTCCCGATTTCCAGCTGTTCTGTTTGTGTTCAATCTATTGTTCTCCCTGGTATCTAAAAAGGCTATCCGT

*An. albimanus*_White AATTGCAGGAGGTGTGCGCGTATGATGACTGAAAGGAGATTTTCATCGTTAAAGCAAGATCTTTGCAGATCTTTGAATCTT
*An. albimanus*_Brown AATTGCAGGAGGTGTGCGCGTATGATGACTGAAAGGAGATTTTCATCGTTAAAGCAAGATCTTTGCAGATCTTTGAATCTT
*An. albimanus*_AALB003610 AATTGCAGGAGGTGTGCGCGTATGATGACTGAAAGGAGATTTTCATCGTTAAAGCAAGATCTTTGCAGATCTTTGAATCTT

*An. albimanus*_White TCTACTTGCCTGTCGGTTCCTCGATGTTTCTATGCTCTCAGCAGTTGATGGGAGTCCGGTGGTGGTCCCAAAGCGTTG
*An. albimanus*_Brown TCTACTTGCCTGTCGGTTCCTCGATGTTTCTATGCTCTCAGCAGTTGATGGGAGTCCGGTGGTGGTCCCAAAGCGTTG
*An. albimanus*_AALB003610 TCTACTTGCCTGTCGGTTCCTCGATGTTTCTATGCTCTCAGCAGTTGATGGGAGTCCGGTGGTGGTCCCAAAGCGTTG

*An. albimanus*_White TAAAAGGATTTGCAATCCTTTCCGTTGTTTTCCGCTCGTGTCTTTGTGAATCGTTCAGATACACTTGGTATCGAGGCTCT
*An. albimanus*_Brown TAAAAGGATTTGCAATCCTTTCCGTTGTTTTCCGCTCGTGTCTTTGTGAATCGTTCAGATACACTTGGTATCGAGGCTCT
*An. albimanus*_AALB003610 TAAAAGGATTTGCAATCCTTTCCGTTGTTTTCCGCTCGTGTCTTTGTGAATCGTTCAGATACACTTGGTATCGAGGCTCT

*An. albimanus*_White CCAAGTTCCTTACAGTTCTCCGAGCTACTTTTCCAAAGGGCAAAAGCGGCGGGAGTTGGAGTCAAACTTGAGTTCACCTCT
*An. albimanus*_Brown CCAAGTTCCTTACAGTTCTCCGAGCTACTTTTCCAAAGGGCAAAAGCGGCGGGAGTTGGAGTCAAACTTGAGTTCACCTCT
*An. albimanus*_AALB003610 CCAAGTTCCTTACAGTTCTCCGAGCTACTTTTCCAAAGGGCAAAAGCGGCGGGAGTTGGAGTCAAACTTGAGTTCACCTCT

*An. albimanus*_White ATCGCCTTTATCCAGATCTTTATCGTCCAAAAGGCTAAAAATATTCCATTTTAAACCGGATTTTAAAGGAACGTAGCTGTAA
*An. albimanus*_Brown ATCGCCTTTATCCAGATCTTTATCGTCCAAAAGGCTAAAAATATTCCATTTTAAACCGGATTTTAAAGGAACGTAGCTGTAA
*An. albimanus*_AALB003610 ATCGCCTTTATCCAGATCTTTATCGTCCAAAAGGCTAAAAATATTCCATTTTAAACCGGATTTTAAAGGAACGTAGCTGTAA

*An. albimanus*_White GTGGAAAAGTATACAGAAATGACCAATTAACGATAATAATGCTCACAAAAAGAAAACAAACGAAAAATCGATAAGCACA
*An. albimanus*_Brown GTGGAAAAGTATACAGAAATGACCAATTAACGATAATAATGCTCACAAAAAGAAAACAAACGAAAAATCGATAAGCACA
*An. albimanus*_AALB003610 GTGGAAAAGTATACAGAAATGACCAATTAACGATAATAATGCTCACAAAAAGAAAACAAACGAAAAATCGATAAGCACA

*An. albimanus*_White CGCTATAATAAAGCGATACCTGTTATGACATAAAGCGATATTAGTTTGGTTCGAGTTCGAGTTGGTTCGTTGCGGAAAACAAAACCC
*An. albimanus*_Brown CGCTATAATAAAGCGATACCTGTTATGACATAAAGCGATATTAGTTTGGTTCGAGTTCGAGTTGGTTCGTTGCGGAAAACAAAACCC
*An. albimanus*_AALB003610 CGCTATAATAAAGCGATACCTGTTATGACATAAAGCGATATTAGTTTGGTTCGAGTTCGAGTTGGTTCGTTGCGGAAAACAAAACCC

*An. albimanus*_White GTGAGCGGAAAATGGAAAAGCGGAAAAGCGAGAATGCGCGTGA AAAACGTTCCGCAATCTAGAGCTTTTTCAGCGGAAATCGGTTGG
*An. albimanus*_Brown GTGAGCGGAAAATGGAAAAGCGGAAAAGCGAGAATGCGCGTGA AAAACGTTCCGCAATCTAGAGCTTTTTCAGCGGAAATCGGTTGG
*An. albimanus*_AALB003610 GTGAGCGGAAAATGGAAAAGCGGAAAAGCGAGAATGCGCGTGA AAAACGTTCCGCAATCTAGAGCTTTTTCAGCGGAAATCGGTTGG

*An. albimanus*_White CATGCGGATGGCCCTCGAGCGTAAGAAATGTGACGAATGCTATTTAATGGAAACATTTATGTCAATTAACCTGTCCTTTAACCA
*An. albimanus*_Brown CATGCGGATGGCCCTCGAGCGTAAGAAATGTGACGAATGCTATTTAATGGAAACATTTATGTCAATTAACCTGTCCTTTAACCA
*An. albimanus*_AALB003610 CATGCGGATGGCCCTCGAGCGTAAGAAATGTGACGAATGCTATTTAATGGAAACATTTATGTCAATTAACCTGTCCTTTAACCA

*An. albimanus*_White CGAGGACCGGCAAAAGCGTTTCGAGGTCGTTTCAGCTATAGATGTGAATCCCATCGCCAACTCGGTGTACATGCACAACTTTG
*An. albimanus*_Brown CGAGGACCGGCAAAAGCGTTTCGAGGTCGTTTCAGCTATAGATGTGAATCCCATCGCCAACTCGGTGTACATGCACAACTTTG
*An. albimanus*_AALB003610 CGAGGACCGGCAAAAGCGTTTCGAGGTCGTTTCAGCTATAGATGTGAATCCCATCGCCAACTCGGTGTACATGCACAACTTTG

*An. albimanus*_White GAGAGAAGCAGCTCGCAACGGCAACATATTGAGTCTTACGGCGAAAGCCATTTCCAAACTGGCCATCGATACGATTTCTCAT
*An. albimanus*_Brown GAGAGAAGCAGCTCGCAACGGCAACATATTGAGTCTTACGGCGAAAGCCATTTCCAAACTGGCCATCGATACGATTTCTCAT
*An. albimanus*_AALB003610 GAGAGAAGCAGCTCGCAACGGCAACATATTGAGTCTTACGGCGAAAGCCATTTCCAAACTGGCCATCGATACGATTTCTCAT

*An. albimanus*_White GTGCCCCCGTGTCAACCGTTTACACCGCAATGGGAAGTTCAACGATATCCAGATCGCCGTCGGATCCGTTCCCTGTGCAATT
*An. albimanus*_Brown GTGCCCCCGTGTCAACCGTTTACACCGCAATGGGAAGTTCAACGATATCCAGATCGCCGTCGGATCCGTTCCCTGTGCAATT
*An. albimanus*_AALB003610 GTGCCCCCGTGTCAACCGTTTACACCGCAATGGGAAGTTCAACGATATCCAGATCGCCGTCGGATCCGTTCCCTGTGCAATT

*An. albimanus*_White TCGCATCTCTTGACGATATCCCGACCGTGGAGTTTACTGATGGAAAAATGTGAAGGGGTTGCAAGGATCGCAAGCCTGTG
*An. albimanus*_Brown TCGCATCTCTTGACGATATCCCGACCGTGGAGTTTACTGATGGAAAAATGTGAAGGGGTTGCAAGGATCGCAAGCCTGTG
*An. albimanus*_AALB003610 TCGCATCTCTTGACGATATCCCGACCGTGGAGTTTACTGATGGAAAAATGTGAAGGGGTTGCAAGGATCGCAAGCCTGTG

*An. albimanus*_White CCCTGTACAAAGCGCGTTTGAAGGAGGCGGATTCGATCATCAGGAGTATGTGCTCTCTCCACATCAGTTCCGCATACCGAA
*An. albimanus*_Brown CCCTGTACAAAGCGCGTTTGAAGGAGGCGGATTCGATCATCAGGAGTATGTGCTCTCTCCACATCAGTTCCGCATACCGAA
*An. albimanus*_AALB003610 CCCTGTACAAAGCGCGTTTGAAGGAGGCGGATTCGATCATCAGGAGTATGTGCTCTCTCCACATCAGTTCCGCATACCGAA

*An. albimanus*_White CACTCGCCATCGGTACTACTGTATTGCAAAAGCGGAAAGGCA CAGGATTCAAGCGGAAAGGGGATGGAACCATCATACACAT
*An. albimanus*_Brown CACTCGCCATCGGTACTACTGTATTGCAAAAGCGGAAAGGCA CAGGATTCAAGCGGAAAGGGGATGGAACCATCATACACAT
*An. albimanus*_AALB003610 CACTCGCCATCGGTACTACTGTATTGCAAAAGCGGAAAGGCA CAGGATTCAAGCGGAAAGGGGATGGAACCATCATACACAT

*An. albimanus*_White CCCAGTGACGATGGTGGCACGATTCCGGTCTTGGAGTTGGTGACATAGTTCGATGCTGGCGAGAACGCAAAAAATATTGCG
*An. albimanus*_Brown CCCAGTGACGATGGTGGCACGATTCCGGTCTTGGAGTTGGTGACATAGTTCGATGCTGGCGAGAACGCAAAAAATATTGCG
*An. albimanus*_AALB003610 CCCAGTGACGATGGTGGCACGATTCCGGTCTTGGAGTTGGTGACATAGTTCGATGCTGGCGAGAACGCAAAAAATATTGCG

*An. albimanus*_White TGAAGAGGCGGCAATTAAGAAAACATTTGCCATTTATGGATGTCTGCAACGCGGGAATCCAGTAACTCGATGTGCTTCAACAA
*An. albimanus*_Brown TGAAGAGGCGGCAATTAAGAAAACATTTGCCATTTATGGATGTCTGCAACGCGGGAATCCAGTAACTCGATGTGCTTCAACAA
*An. albimanus*_AALB003610 TGAAGAGGCGGCAATTAAGAAAACATTTGCCATTTATGGATGTCTGCAACGCGGGAATCCAGTAACTCGATGTGCTTCAACAA

*An. albimanus*_White GGCCTACACGCACTATGCGGAAAGGTAACCGGATCAGTGTTCACACCACTCCAAAGGAAGAGTTTGAATAAGTTTATCAGAGC
*An. albimanus*_Brown GGCCTACACGCACTATGCGGAAAGGTAACCGGATCAGTGTTCACACCACTCCAAAGGAAGAGTTTGAATAAGTTTATCAGAGC
*An. albimanus*_AALB003610 GGCCTACACGCACTATGCGGAAAGGTAACCGGATCAGTGTTCACACCACTCCAAAGGAAGAGTTTGAATAAGTTTATCAGAGC

*An. albimanus*_White GCATCCCTCGTGACGGAAGCAATCGGAAAAGATGGCTCTTCTGGGATCTTTGCGCGTTCCGGTATTTTCAACCGCAGGAGGTTGG
*An. albimanus*_Brown GCATCCCTCGTGACGGAAGCAATCGGAAAAGATGGCTCTTCTGGGATCTTTGCGCGTTCCGGTATTTTCAACCGCAGGAGGTTGG
*An. albimanus*_AALB003610 GCATCCCTCGTGACGGAAGCAATCGGAAAAGATGGCTCTTCTGGGATCTTTGCGCGTTCCGGTATTTTCAACCGCAGGAGGTTGG

*An. albimanus*_White CTAAGCTAATGAGCTTTCCCGAAAAATTTCAAATTTCCCGACAGCGTAAACAGATAAGCAGCGGTAACCGAGTCTGGGCAACAG
*An. albimanus*_Brown CTAAGCTAATGAGCTTTCCCGAAAAATTTCAAATTTCCCGACAGCGTAAACAGATAAGCAGCGGTAACCGAGTCTGGGCAACAG
*An. albimanus*_AALB003610 CTAAGCTAATGAGCTTTCCCGAAAAATTTCAAATTTCCCGACAGCGTAAACAGATAAGCAGCGGTAACCGAGTCTGGGCAACAG

*An. albimanus*_White CATCAATGTTTATGATGTTAGTTATTTGCTGGAGGAACTACAATAAAGCATAGAAAAGCAAGCAATTTGGCGCTCAGCATACT
*An. albimanus*_Brown CATCAATGTTTATGATGTTAGTTATTTGCTGGAGGAACTACAATAAAGCATAGAAAAGCAAGCAATTTGGCGCTCAGCATACT
*An. albimanus*_AALB003610 CATCAATGTTTATGATGTTAGTTATTTGCTGGAGGAACTACAATAAAGCATAGAAAAGCAAGCAATTTGGCGCTCAGCATACT

*An. albimanus*_White TTTATTTTAAATGAAAATAAATAACAGTGTATGGTAGAACAAAG
*An. albimanus*_Brown TTTATTTTAAATGAAAATAAATAACAGTGTATGGTAGAACAAAG
*An. albimanus*_AALB003610 TTTATTTTAAATGAAAATAAATAACAGTGTATGGTAGAACAAAG

Fig. S10. Alineamientos múltiples de las secuencias de *dnmt2* de los fenotipos Blanco y Café comparados con la secuencia de referencia de *A. albimanus*.

El fondo coloreado denota una identidad $\leq 66\%$.

OCTAVA PARTE
TABLAS

TABLA 1

Sitios de unión predichos

4.1.1.0 familia (NF-kB)

Gen	Factor	Localización al TS	Secuencia
dnmt2 AALB003610	DI	seq (-737.. -746)	CTTTCGATTT
tet2 AALB005657	NF-kappa NF-kappaB	seq (-1148.. -1157) seq (-1150.. -1159)	GAGGAAAATT GGAAAATTCA
lrim1 AALB005865	DI	seq (-103.. -112)	GGTTTTCCCC
tep AALB010457	NF-kappaB	seq (-1084.. -1093)	GTGATTTCT
ctl4 AALB014534	NF-kappaB1	seq (-689.. -698)	GGAAATTCCA
	c-Rel1	seq (-766.. -775)	GGAAAATTCC
	DI	seq (-933.. -942)	TGGGAAATTC
	NF-kappa	seq (-992.. -1001)	AGCGATTCCC
duox AALB000205	NF-kappa	seq (-1093.. -1103)	GGGAAAGTCG
	DI	seq (-138.. -147)	TGGGATTTCA
ctl6 AALB003258	c-Rel1	seq (-453.. -462)	CGGGCTTCCC
	NF-kappaB	seq (-865.. -874)	GGAAAATCCT
frep3 AALB007405	-----	-----	-----
ppo1 AALB002317	DI	seq (-1183.. -1192)	GTGGAAATTC

TABLA 2

**Genes epigenéticos en *A. albimanus*
ortólogos de *D. melanogaster***

Clase de descriptor Función epigenética	Número de genes en <i>A. albimanus</i>
Acetilación	17
Desacetilación	7
Metilación	24
Desmetilación	7
DNA metilación	3
Complejo Ino80	7
Complejo ACF	3
Complejo NURF	2
Complejo NuRD	4
Otros complejos	6
Heterocromatina	5
Heterocromatina centromérica	4
Heterocromatina intercalante	3
Heterocromatina nuclear	2
Otra heterocromatina	10
Ubiquitilación/fosforilación	10
Proteínas Set-N	18

Extendido de Jenkins et al., 2015

TABLA 3

Gen	Secuencia nucleotídica (5'→3')	Talla cDNA (pb)	Gen ID
<i>dnmt2</i>	F: GGA AGG TAC CGG ATC AGT GTT C R: GAG CCA TCT TTT CCG ATT CGT C	101	AALB003610
<i>tet2</i>	F: TCC TCC GAT CCG AAG GAT CAG GT R: GTA CCT TGC TGT TGC TGG GCA	114	AALB005657
<i>irim1</i>	F: CGT GCT CGC TAG CTA CGT T R: CGT AGT GCC TGT CCC AAA CT	115	AALB005865
<i>tep</i>	F: GTG AAC TTG CCG AGT GGC TA R: CAA CCA TAG TTC CGC CAT GAA GA	107	AALB010457
<i>ctl4</i>	F: CAA TCG CAA AAT ACA GCT CGT G R: CCA GTA GGA CGA GGA ACG AAG	151	AALB014534
<i>duox</i>	F: CTC TCT CTG TTG CAG AAT CCA G R: TGG TGT GAG ATG GTT ATC GAC T	111	AALB000205
<i>ctl6</i>	F: CTG GAT GCG TAC TTT GAA TGC R: CAA AGG TCC TCT TTG CGA TCA	117	AALB003258
<i>frep3</i>	F: CAG TGC GTG TCG TGC AAT R: AAC CGT TTG AGA ATC TGT AGC A	144	AALB007405
<i>ppo1</i>	F: GGC GGA CCA AAT CAA GCA G R: CGA TTG CCC GAT TCG TCA AC	101	AALB002317
<i>s7</i>	F: CGC TAT GGT TTT CGG ATC A R: GAG TTC ATC TCC AGC TCC AG	103	AALB010399

Tabla 3. Oligonucleótidos usados para las amplificaciones por qPCR.

TABLA 4

dnmt2 fragmento	Secuencia nucleotídica (5'→3')	Talla cDNA (pb)	Gen ID
1	F: TGG ATT TAA AGA YAT TTT GYA TTT G R: ACT TAC ARC TAC RTT CCT TAA AA	551	
2	F: GAG TTG GAG TAY AAY TTG AGT T R: CTT TCR CCR TAA RAC TCA ATA T	569	
3	F: GAA TGT GAY GAA TGY TAT TTA ATG GAA R: AAC CRT RCC ACC ATC RT	574	AALB003610
4	F: GGT TYA AGY GGA AAG GGG AT R: TCA CAT CCT TTR TTC TAC CAA TCA C	582	

Tabla 4. Oligonucleótidos usados para el PCR largo y secuenciación.

NOVENA PARTE
REFERENCIAS

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Abraham, Eappen G, and Marcelo Jacobs-Lorena. 2004. "Mosquito Midgut Barriers to Malaria Parasite Development." *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 34 (7): 667–71. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2004.03.019>.
- Adams, R L, E L McKay, L M Craig, and R H Burdon. 1979. "Methylation of Mosquito DNA." *Biochimica et Biophysica Acta* 563 (1): 72–81. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/497215>.
- Allis, C. David, and Thomas Jenuwein. 2016. "The Molecular Hallmarks of Epigenetic Control." *Nature Reviews Genetics* 17 (8): 487–500. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.59>.
- Ambrosi, Christina, Massimiliano Manzo, and Tuncay Baubec. 2017. "Dynamics and Context-Dependent Roles of DNA Methylation." *Journal of Molecular Biology* 429 (10): 1459–75. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.02.008>.
- An, Chunju, Aidan Budd, Michael R Kanost, and Kristin Michel. 2011. "Characterization of a Regulatory Unit That Controls Melanization and Affects Longevity of Mosquitoes." *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS* 68 (11): 1929–39. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0543-z>.
- Angrisano, Fiona, Yan-Hong Tan, Angelika Sturm, Geoffrey I McFadden, and Jake Baum. 2012. "Malaria Parasite Colonisation of the Mosquito Midgut-Placing the Plasmodium Ookinete Centre Stage." *International Journal for Parasitology* 42 (6): 519–27. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.02.004>.
- Anreiter, Ina, Jamie M. Kramer, and Marla B. Sokolowski. 2019. "Epigenetic Mechanisms Modulate Differences in Drosophila Foraging Behavior." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 116 (17): 8630–31. <https://doi.org/10.1073/pnas.1905223116>.
- Artemov, Gleb N, Ashley N Peery, Xiaofang Jiang, Vladimir N Stegny, Maria V Sharakhova, Igor V Sharakhov, and Igor V. Sharakhov. 2016. "The Physical Genome Mapping of Anopheles Albimanus Corrected Scaffold Misassemblies and

- Identified Inter-Arm Rearrangements in Genus *Anopheles*.” *G3 (Bethesda, Md.)* 7 (January): g3.116.034959. <https://doi.org/10.1534/g3.116.034959>.
- Ashapkin, V. V., L. I. Kutueva, and B. F. Vanyushin. 2016. “Dnmt2 Is the Most Evolutionary Conserved and Enigmatic Cytosine DNA Methyltransferase in Eukaryotes.” *Genetika* 52 (3): 269–82. <https://doi.org/10.1134/S1022795416030029>.
- Benedict, Mark Q., Allen Cohen, Anton J. Cornel, and Donald L. Brummett. 1986. “Uric Acid in *Anopheles* Mosquitoes (Diptera: Culicidae): Effects of Collarless, Stripe, and White Mutations.” *Annals of the Entomological Society of America* 89 (2): 261–65.
- Benedict, Mark Q. 2010. *Methods in Anopheles Research*. Edited by Mark Q. Benedict. 2th ed. Atlanta, USA: MR4.
- Bewick, Adam J, Kevin J Vogel, Allen J Moore, and Robert J Schmitz. 2016. “Evolution of DNA Methylation across Insects.” *Mol. Biol. Evol.* 34 (3): 654–65. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw264>.
- Bianchi, Néstor O, Lidia Vidal-Rioja, and James E Cleaver. 1986. “Direct Visualization of the Sites of DNA Methylation in Human, and Mosquito Chromosomes.” *Chromosoma* 94 (5): 362–66. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2881739>.
- Billingsley, P F, and R E Sinden. 1997. “Determinants of Malaria-Mosquito Specificity.” *Parasitology Today* 13 (8): 297–301.
- Blandin, Stephanie A, Rui Wang-Sattler, Marina Lamacchia, Julien Gagneur, Gareth Lycett, Ye Ning, Elena A Levashina, and Lars M Steinmetz. 2009. “Dissecting the Genetic Basis of Resistance to Malaria Parasites in *Anopheles Gambiae*.” *Science* 326 (April): 1–5.
- Blandin, Stephanie, Shin-Hong Shiao, Luis F Moita, Chris J Janse, Andrew P Waters, Fotis C Kafatos, and Elena A Levashina. 2004. “Complement-like Protein TEP1 Is a Determinant of Vectorial Capacity in the Malaria Vector *Anopheles Gambiae*.” *Cell* 116 (5): 661–70. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15006349>.
- Cassina, V., M. Manghi, D. Salerno, A. Tempestini, V. Iadarola, L. Nardo, S. Brioschi, and F. Mantegazza. 2016. “Effects of Cytosine Methylation on DNA Morphology: An Atomic Force Microscopy Study.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1860 (1): 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.10.006>.

- Cavalli, Giacomo, and Edith Heard. 2019. "Advances in Epigenetics Link Genetics to the Environment and Disease." *Nature* 571 (7766): 489–99. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1411-0>.
- Chan, Adeline ST, Mario H Rodríguez, Jorge A Torres, María del Carmen Rodríguez, and Cuauhtemoc Villarreal. 1994. "Susceptibility of Three Laboratory Strains of *Anopheles Albimanus* (Diptera: Culicidae) to Coindigenous *Plasmodium Vivax* in Southern Mexico." *Entomologica Society of America* 31 (3): 400–403.
- Cho, Younsook, Anthony Griswold, Catherine Campbell, and Kyung Tai Min. 2005. "Individual Histone Deacetylases in *Drosophila* Modulate Transcription of Distinct Genes." *Genomics* 86 (5): 606–17. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2005.07.007>.
- Christophides, George K, Evgeny Zdobnov, Carolina Barillas-Mury, Ewan Birney, Stephanie Blandin, Claudia Blass, Paul T Brey, et al. 2002. "Immunity-Related Genes and Gene Families in *Anopheles Gambiae*." *Science (New York, N.Y.)* 298 (5591): 159–65. <https://doi.org/10.1126/science.1077136>.
- Churcher, Thomas S, Andrew M Blagborough, Michael Delves, Chandra Ramakrishnan, Melissa C Kapulu, Andrew R Williams, Sumi Biswas, Dari F Da, Anna Cohuet, and Robert E Sinden. 2012. "Measuring the Blockade of Malaria Transmission – An Analysis of the Standard Membrane Feeding Assay." *International Journal for Parasitology* 42: 1037–44.
- Clayton, April M, Yuemei Dong, and George Dimopoulos. 2014. "The *Anopheles* Innate Immune System in the Defense against Malaria Infection." *Journal of Innate Immunity* 6 (2): 169–81. <https://doi.org/10.1159/000353602>.
- Coleman-Derr, Devin, and Daniel Zilberman. 2012. "Deposition of Histone Variant H2A.Z within Gene Bodies Regulates Responsive Genes." *PLoS Genetics* 8 (10): 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002988>.
- Collins, W E. et al. 1976. "Studies on Human Malaria in Aotus Monkeys. VII. Comparative Infectivity of Two Strains of *Plasmodium Vivax* to *Anopheles Freeborni*, *Anopheles Maculatus* and Four Strains of *Anopheles Albimanus*." *J. Parasitol.* 194: 1976.
- Collins, William, McWilson Warren, Bettye B Richardson, Jimmie C Skinner, and Thomas S. Kearse. 1979. "Selected Pupal Phenotypes of *Anopheles Freeborni* and Their

- Susceptibility to Plasmodium Falciparum and P. Vivax.” *Mosquito News* 39 (3): 466–72.
- Conn, Jan E, Martha L Quiñones, and Marianete M Póvoa. 2016. *Phylogeography, Vectors and Transmission in Latin America*. Edited by Sylvie Manguin. *Intech*. Rijeka, Croatia. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/57353>.
- Cridge, Andrew, Tom Harrop, Mackenzie Lovegrove, Emily Remnant, and Peter Dearden. 2017. “Chapter Two - Nutrition and Epigenetic Change in Insects: Evidence and Implications.” In *Insect Epigenetics*, edited by Heleen Verlinden, 1st ed., 53:31–54. London, United Kingdom: Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/bs.aiip.2017.06.001>.
- Cyr, Anthony R., and Frederick E. Domann. 2011. “The Redox Basis of Epigenetic Modifications: From Mechanisms to Functional Consequences.” *Antioxidants and Redox Signaling* 15 (2): 551–89. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3492>.
- Davidson, G. 1963. “DDT-Resistance and Dieldrin-Resistance in Anopheles Albimanus *.” *Bull Wld Hlth Org* 28: 25–33.
- Deplus, Rachel, Loïc Blanchon, Arumugam Rajavelu, Abdelhalim Boukaba, Matthieu Defrance, Judith Luciani, Françoise Rothé, et al. 2014. “Regulation of DNA Methylation Patterns by CK2-Mediated Phosphorylation of Dnmt3a.” *Cell Reports* 8 (3): 743–53. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.06.048>.
- Dev, Rachana Roshan, Rakesh Ganji, Satya Prakash Singh, Sundarasamy Mahalingam, Sharmistha Banerjee, and Sanjeev Khosla. 2017. “Cytosine Methylation by DNMT2 Facilitates Stability and Survival of HIV-1 RNA in the Host Cell during Infection.” *Biochemical Journal* 474 (12): 2009–26. <https://doi.org/10.1042/BCJ20170258>.
- Donko, A., Z. Peterfi, A. Sum, T. Leto, and M. Geiszt. 2005. “Dual Oxidases.” *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 360 (1464): 2301–8. <https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1767>.
- Durdevic, Zeljko, Katharina Hanna, Beth Gold, Tim Pollex, Sara Cherry, Frank Lyko, and Matthias Schaefer. 2013. “Efficient RNA Virus Control in Drosophila Requires the RNA Methyltransferase Dnmt2.” *EMBO Reports* 14 (3): 269–75. <https://doi.org/10.1038/embor.2013.3>.

Durdevic, Zeljko, Mehrpouya Balaghy Mobin, Katharina Hanna, Frank Lyko, and Matthias Schaefer. 2013. "The RNA Methyltransferase Dnmt2 Is Required for Efficient Dicer-2-Dependent siRNA Pathway Activity in Drosophila." *Cell Reports* 4 (5): 931–37. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.07.046>.

Durdevic, Zeljko, and Matthias Schaefer. 2013. "Dnmt2 Methyltransferases and Immunity: An Ancient Overlooked Connection between Nucleotide Modification and Host Defense?" *BioEssays* 35 (12): 1044–49. <https://doi.org/10.1002/bies.201300088>.

Eldering, Maarten, Isabelle Morlais, Geert Jan Van Gemert, Marga Van De Vegte-Bolmer, Wouter Graumans, Rianne Siebelink-Stoter, Martijn Vos, et al. 2016. "Variation in Susceptibility of African Plasmodium Falciparum Malaria Parasites to TEP1 Mediated Killing in Anopheles Gambiae Mosquitoes." *Scientific Reports* 6 (October 2015): 1–7. <https://doi.org/10.1038/srep20440>.

Estève, Pierre Olivier, Yanqi Chang, Mala Samaranayake, Anup K. Upadhyay, John R. Horton, George R. Feehery, Xiaodong Cheng, and Sriharsa Pradhan. 2011. "A Methylation and Phosphorylation Switch between an Adjacent Lysine and Serine Determines Human DNMT1 Stability." *Nature Structural and Molecular Biology* 18 (1): 42–49. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1939>.

Falckenhayn, Cassandra, Vitor Coutinho Carneiro, Anderson de Mendonça Amarante, Katharina Schmid, Katharina Hanna, Seokyoung Kang, Mark Helm, George Dimopoulos, Marcelo Rosado Fantappiè, and Frank Lyko. 2016. "Comprehensive DNA Methylation Analysis of the Aedes Aegypti Genome." *Scientific Reports* 6 (1): 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep36444>.

Faran, Michael E. 1980. "Mosquito Studies (Diptera, Culicidae) XXXIV. A Revision of the Albimanus Section of the Subgenus Nyssorhynchus of Anopheles." *Contributions of American the Entomological Institute* 15 (7): 214.

Feng, S., S. J. Cokus, X. Zhang, P.-Y. Chen, M. Bostick, M. G. Goll, J. Hetzel, et al. 2010. "Conservation and Divergence of Methylation Patterning in Plants and Animals." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (19): 8689–94. <https://doi.org/10.1073/pnas.1002720107>.

- Flores, Kevin, Florian Wolschin, Jason J Corneveaux, April N Allen, Matthew J Huentelman, and Gro V Amdam. 2012. "Genome-Wide Association between DNA Methylation and Alternative Splicing in an Invertebrate." *BMC Genomics* 13 (1): 480. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-480>.
- Foggie, Tarra, and Achee. Nicole. 2009. "Standard Operating Procedures : Rearing *Aedes Aegypti* for the HITSS and Box Laboratory Assays." <https://www.usuhs.edu/sites/default/files/media/pmb/pdf/insectarysop.pdf>.
- Fraiture, Malou, Richard H G Baxter, Stefanie Steinert, Yogarany Chelliah, Cécile Frolet, Wilber Quispe-Tintaya, Jules A. Hoffmann, Stéphanie A. Blandin, and Elena A. Levashina. 2009. "Two Mosquito LRR Proteins Function as Complement Control Factors in the TEP1-Mediated Killing of Plasmodium." *Cell Host and Microbe* 5 (1): 273–84. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.01.005>.
- Genencher, Bianca, Zeljko Durdevic, Katharina Hanna, Daniela Zinkl, Mehrpouya Balaghy Mobin, Nevcin Senturk, Bruno Da Silva, et al. 2018. "Mutations in Cytosine-5 TRNA Methyltransferases Impact Mobile Element Expression and Genome Stability at Specific DNA Repeats." *Cell Reports* 22 (7): 1861–74. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.01.061>.
- Georghiou, G. P., Frances E. Gidden, and J. W. Cameron. 1967. "A Stripe Character in *Anopheles Albimanus* (Diptera: Culicidae) and Its Linkage Relationships to Sex and Dieldrin Resistance." *Annals of the Entomological Society of America* 60 (2): 323–28. <https://doi.org/10.1093/aesa/60.2.323>.
- Ghosh, Julie, Cheng Man Lun, Audrey J. Majeske, Sandro Sacchi, Catherine S. Schrankel, and L. Courtney Smith. 2011. "Invertebrate Immune Diversity." *Developmental and Comparative Immunology* 35 (9): 959–74. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2010.12.009>.
- Glastad, K. M., B. G. Hunt, S. V. Yi, and M. A D Goodisman. 2011. "DNA Methylation in Insects: On the Brink of the Epigenomic Era." *Insect Molecular Biology* 20 (5): 553–65. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2011.01092.x>.
- Glastad, Karl M., Michael A. D. Goodisman, Soojin V. Yi, and Brendan G. Hunt. 2016. "Effects of DNA Methylation and Chromatin State on Rates of Molecular Evolution in

- Insects.” *G3* 6 (2): 357–63.
<https://doi.org/10.1534/g3.115.023499>.
- Glastad, Karl M., Brendan G. Hunt, and Michael AD. Goodisman. 2014. “Evolutionary Insights into DNA Methylation in Insects.” *Current Opinion in Insect Science* 1: 25–30. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2014.04.001>.
- Goll, Mary Grace, Finn Kirpekar, Keith A Maggart, Jeffrey A Yoder, Chih-Lin Hsieh, Xiaoyu Zhang, Kent G Golic, Steven E Jacobsen, and Timothy H Bestor. 2006. “Methylation of TRNA^{Asp} by the DNA Methyltransferase Homolog Dnmt2.” *Science (New York, N.Y.)* 311: 395–98. <https://doi.org/10.1126/science.1120976>.
- Gowher, Humaira, Oliver Leismann, and Albert Jeltsch. 2000. “DNA of *Drosophila Melanogaster* Contains 5-Methylcytosine.” *EMBO Journal* 19 (24): 6918–23. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.24.6918>.
- Hermann, Andrea, Sigrid Schmitt, and Albert Jeltsch. 2003. “The Human Dnmt2 Has Residual DNA-(Cytosine-C5) Methyltransferase Activity.” *Journal of Biological Chemistry* 278 (34): 31717–21. <https://doi.org/10.1074/jbc.M305448200>.
- Holliday R, and Pugh JE. 1975. “DNA Modification Mechanisms and Gene Activity during Development.” *Science, New Series* 187 (4173): 226–32.
- Hotchkiss, Rollin D. 1948. “The Quantitative Separation of Purines, Pyrimidines, and Nucleosides by Chromatography.” *J. Biol. Chem.* 175: 315–32.
- Hung, M S, N Karthikeyan, B Huang, H C Koo, J Kiger, and C J Shen. 1999. “*Drosophila* Proteins Related to Vertebrate DNA (5-Cytosine) Methyltransferases.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (21): 11940–45. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.21.11940>.
- Hunt, Brendan G., Karl M. Glastad, Soojin V. Yi, and Michael A D Goodisman. 2013a. “Patterning and Regulatory Associations of DNA Methylation Are Mirrored by Histone Modifications in Insects.” *Genome Biology and Evolution* 5 (3): 591–98. <https://doi.org/10.1093/gbe/evt030>.
- — —. 2013b. “The Function of Intragenic DNA Methylation: Insights from Insect Epigenomes.” *Integrative and Comparative Biology* 53 (2): 319–28. <https://doi.org/10.1093/icb/ict003>.

- Hurd, H; Taylor, P.J; Adams, D; Underhill, A; Eggleston, P. 2005. "Evaluating the Costs of Mosquito Resistance to Malaria Parasites." *Evolution* 59 (12): 2560–72.
- Jeffery, G M. et al. 1950. "The Comparative Susceptibility of Anopheles Quadrimaculatus and Two Strains of Anopheles Albimanus to a Panama Strain of Plasmodium Falciparum." . . *J. Nat. Malar. Soc.*, 1950.
- Jeltsch, Albert. 2002. "Beyond Watson and Crick: DNA Methylation and Molecular Enzymology of DNA Methyltransferases." *ChemInform* 33 (22): 274–93.
<https://doi.org/10.1002/chin.200222292>.
- Jeltsch, Albert, and Renata Z. Jurkowska. 2016a. "Allosteric Control of Mammalian DNA Methyltransferases - a New Regulatory Paradigm." *Nucleic Acids Research* 44 (18): 8556–75. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw723>.
- Jeltsch, Albert, and Renata Z Jurkowska. 2016b. *Methyltransferases – Role and Function*. Edited by Albert Jeltsch and Jurkowska Renata Z. 1st ed. Switzerland: Springer Nature.
- Jeltsch, Albert, Wolfgang Nellen, and Frank Lyko. 2006. "Two Substrates Are Better than One: Dual Specificities for Dnmt2 Methyltransferases." *Trends in Biochemical Sciences* 31 (6): 306–8. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2006.04.005>.
- Jenkins, Adam M., and Marc A T Muskavitch. 2015. "Evolution of an Epigenetic Gene Ensemble within the Genus Anopheles." *Genome Biology and Evolution* 7 (3): 901–15. <https://doi.org/10.1093/gbe/evv041>.
- Jones, Peter A. 2012. "Functions of DNA Methylation: Islands, Start Sites, Gene Bodies and Beyond." *Nature Reviews Genetics* 13 (7): 484–92.
<https://doi.org/10.1038/nrg3230>.
- Jurkowski, Tomasz P., and Albert Jeltsch. 2011. "On the Evolutionary Origin of Eukaryotic DNA Methyltransferases and Dnmt2." *PLoS ONE* 6 (11): 1–9.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028104>.
- Jurkowski, Tomasz P., Raghuvaran Shanmugam, Mark Helm, and Albert Jeltsch. 2012a. "Mapping the TRNA Binding Site on the Surface of Human DNMT2 Methyltransferase." *Biochemistry* 51 (22): 4438–44.
<https://doi.org/10.1021/bi3002659>.

- Jurkowski, Tomasz P, Raghuvaran Shanmugam, Mark Helm, and Albert Jeltsch. 2012b. "Mapping the tRNA Binding Site on the Surface of Human DNMT2 Methyltransferase." *Biochemistry* 51 (22): 4438–44. <https://doi.org/10.1021/bi3002659>.
- Kaiser, Steffen, Tomasz P. Jurkowski, Stefanie Kellner, Dirk Schneider, Albert Jeltsch, and Mark Helm. 2017. "The RNA Methyltransferase Dnmt2 Methylates DNA in the Structural Context of a tRNA." *RNA Biology* 14 (9): 1241–51. <https://doi.org/10.1080/15476286.2016.1236170>.
- Kakani, Parik, Mithilesh Kajla, Tania Pal Choudhury, Lalita Gupta, and Sanjeev Kumar. 2019. "Anopheles Stephensi Dual Oxidase Silencing Activates the Thioester-Containing Protein 1 Pathway to Suppress Plasmodium Development." *Journal of Innate Immunity* 127021: 1–10. <https://doi.org/10.1159/000497417>.
- Kass, Stefan U., Nicoletta Landsberger, and Alan P. Wolffe. 1997. "DNA Methylation Directs a Time-Dependent Repression of Transcription Initiation." *Current Biology* 7 (3): 157–65. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(97\)70086-1](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(97)70086-1).
- Kohli, Rahul M., and Yi Zhang. 2013. "TET Enzymes, TDG and the Dynamics of DNA Demethylation." *Nature* 502 (7472): 472–79. <https://doi.org/10.1038/nature12750>.
- Kumar, Sanjeev, Alvaro Molina-Cruz, Lalita Gupta, Janneth Rodrigues, and Carolina Barillas-Mury. 2010. "A Peroxidase/Dual Oxidase System Modulates Midgut Epithelial Immunity in Anopheles Gambiae." *Science* 327 (March): 1644–49.
- Kunert, Natascha., Joachim. Marhold, Jonas. Stanke, Dirk. Stach, and Frank. Lyko. 2003. "A Dnmt2-like Protein Mediates DNA Methylation in Drosophila." *Development* 130 (21): 5083–90. <https://doi.org/10.1242/dev.00716>.
- Le, Binh V., Marni Williams, Shankar Logarajah, and Richard H G Baxter. 2012. "Molecular Basis for Genetic Resistance of Anopheles Gambiae to Plasmodium: Structural Analysis of TEP1 Susceptible and Resistant Alleles." *PLoS Pathogens* 8 (10): 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002958>.
- Li, E, C Beard, and R Jaenisch. 1993. "Role for DNA Methylation in Genomic Imprinting." *Nature* 366: 362–65. <https://doi.org/10.1038/366362a0>.

- Li, Xuquan, Miaolian Ma, Fei Liu, Yang Chen, Anrui Lu, Qing Zhi Ling, Jianyong Li, et al. 2012. "Properties of *Drosophila Melanogaster* Prophenoloxidasases Expressed in *Escherichia Coli*." *Developmental and Comparative Immunology* 36 (4): 648–56. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.11.005>.
- Lin, Meng Jau., Lin Ya. Tang, M. Narsa. Reddy, and C. K. James. Shen. 2005. "DNA Methyltransferase Gene *DDnmt2* and Longevity of *Drosophila*." *Journal of Biological Chemistry* 280 (2): 861–64. <https://doi.org/10.1074/jbc.C400477200>.
- Locasale, Jason W. 2013. "Serine, Glycine and One-Carbon Units: Cancer Metabolism in Full Circle." *Nature Reviews. Cancer* 13 (8): 572–83. <https://doi.org/10.1038/nrc3557>.
- Lopez Torres, Adolfo, Eunice Yanez Barrientos, Katarzyna Wrobel, and Kazimierz Wrobel. 2011. "Selective Derivatization of Cytosine and Methylcytosine Moieties with 2-Bromoacetophenone for Submicrogram DNA Methylation Analysis by Reversed Phase HPLC with Spectrofluorimetric Detection." *Analytical Chemistry* 83 (20): 7999–8005. <https://doi.org/10.1021/ac2020799>.
- Lyko, Frank. 2018. "The DNA Methyltransferase Family: A Versatile Toolkit for Epigenetic Regulation." *Nature Reviews Genetics* 19 (2): 81–92. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.80>.
- Lyko, Frank, Bernard H Ramsahoye, and Rudolf Jaenisch. 2000. "DNA Methylation in *Drosophila Melanogaster*." *Nature* 408: 538–40. <https://doi.org/10.1080/15555270601041821>.
- Maleszka, Ryszard. 2016. "Epigenetic Code and Insect Behavioural Plasticity." *Current Opinion in Insect Science* 15: 45–52. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2016.03.003>.
- Marhold, J., N. Rothe, A. Pauli, C. Mund, K. Kuehle, B. Brueckner, and F. Lyko. 2004. "Conservation of DNA Methylation in Dipteran Insects." *Insect Molecular Biology* 13 (2): 117–23. <https://doi.org/10.1111/j.0962-1075.2004.00466.x>.
- Martínez-Barnetche, Jesús, Rosa E Gómez-Barreto, Marbella Ovilla-Muñoz, Juan Téllez-Sosa, David E López García, Rhoel R Dinglasan, Ceereena Ubaida Mohien, et al. 2012. "Transcriptome of the Adult Female Malaria Mosquito Vector *Anopheles Albimanus*." *BMC Genomics* 13 (207): 1–17.

- Miranda, Katrina M., Michael G. Espey, and David A. Wink. 2001. "A Rapid, Simple Spectrophotometric Method for Simultaneous Detection of Nitrate and Nitrite." *Nitric Oxide* 5 (1): 62–71. <https://doi.org/10.1006/niox.2000.0319>.
- Moore, Lisa D, Thuc Le, and Guoping Fan. 2012. "DNA Methylation and Its Basic Function." *Neuropsychopharmacology* 38 (1): 23–38. <https://doi.org/10.1038/npp.2012.112>.
- Okano, Masaki, Shaoping Xie, and En Li. 1998. "Dnmt2 Is Not Required for de Novo and Maintenance Methylation of Viral DNA in Embryonic Stem Cells." *Nucleic Acids Research* 26 (11): 2536–40. <https://doi.org/10.1093/nar/26.11.2536>.
- Osta, Mike A, George K Christophides, and Fotis C Kafatos. 2004. "Effects of Mosquito Genes on Plasmodium Development." *Science (New York, N. Y.)* 303 (5666): 2030–32. <https://doi.org/10.1126/science.1091789>.
- Phalke, Sameer, Olaf Nickel, Diana Walluscheck, Frank Hortig, Maria Cristina Onorati, and Gunter Reuter. 2009. "Retrotransposon Silencing and Telomere Integrity in Somatic Cells of Drosophila Depends on the Cytosine-5 Methyltransferase DNMT2." *Nature Genetics* 41 (6): 696–702. <https://doi.org/10.1038/ng.360>.
- Phillips, Margaret A, Jeremy N Burrows, Christine Manyando, Rob Hooft van Huijsduijnen, Wesley C Van Voorhis, and Timothy N C Wells. 2017. "Malaria." *Nature Reviews Disease Primers* 3: 1–24. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.50>.
- Ponts, Nadia, Lijuan Fu, Elena Y Harris, Jing Zhang, Duk-won D Chung, Michael C Cervantes, Jacques Prudhomme, et al. 2013. "Genome-Wide Mapping of DNA Methylation in the Human Malaria Parasite Plasmodium Falciparum." *Cell Host & Microbe* 14: 696–706.
- Raddatz, Günter, Paloma M. Guzzardo, Nelly Olova, Marcelo Rosado Fantappiè, Markus Rampp, Matthias Schaefer, Wolf Reik, Gregory J. Hannon, and Frank Lyko. 2013. "Dnmt2-Dependent Methylomes Lack Defined DNA Methylation Patterns." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (21): 8627–31. <https://doi.org/10.1073/pnas.1306723110>.
- Recio Totoro, Benito, "Desarrollo y optimización de un nuevo método de purificación de oocinetos de *Plasmodium berghei* basado en las propiedades adhesivas del oocineto" (2015) Universidad Nacional Autónoma de México.

- Regev, Aviv, Marion J Lamb, and Eva Jablonka. 1998. "The Role of DNA Methylation in Invertebrates: Developmental Regulation or Genome Defense?" *Mol. Biol. Evol.* 15 (7): 880–891.
- Riggs, A D X. 1975. "X Inactivation, Differentiation, and DNA Methylation." *Cytogenet. Cell Genet.* 14: 9–25.
- Rodríguez, María Del Carmen, G Margos, H Compton, M Ku, H Lanz, M H Rodríguez, and R E Sinden. 2002. "Plasmodium Berghei: Routine Production of Pure Gametocytes, Extracellular Gametes, Zygotes, and Ookinetes." *Experimental Parasitology* 101 (1): 73–76. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12243741>.
- Ruiz, José L., Rakiswendé S. Yerbanga, Thierry Lefèvre, Jean B. Ouedraogo, Victor G. Corces, and Elena Gómez-Díaz. 2019. "Chromatin Changes in Anopheles Gambiae Induced by Plasmodium Falciparum Infection." *Epigenetics and Chromatin* 12 (1): 1–18. <https://doi.org/10.1186/s13072-018-0250-9>.
- Salud, Secretaria De, Secretaria Nacional De Defensa, Secretaria De Marina, Secretaria De Desarrollo Social, Secretaria De Medio, Ambiente Y Recursos, Secretaria De Economia, et al. 2011. "NOM-032-SSA2-2010, Para La Vigilancia Epidemiológica, Prevención y Control de Las Enfermedades Transmitidas Por Vector." *Diario Oficial De La Federacion Mexicana*.
- Santos, Ana, Liliana Ferreira, and M. Oliveira. 2017. "Concerted Flexibility of Chromatin Structure, Methylome, and Histone Modifications along with Plant Stress Responses." *Biology* 6 (1): 3. <https://doi.org/10.3390/biology6010003>.
- Sarda, Shrutii, Jia Zeng, Brendan G. Hunt, and Soojin V. Yi. 2012. "The Evolution of Invertebrate Gene Body Methylation." *Molecular Biology and Evolution* 29 (8): 1907–16. <https://doi.org/10.1093/molbev/mss062>.
- Schaefer, Matthias, Tim Pollex, Katharina Hanna, Francesca Tuorto, Madeleine Meusburger, Mark Helm, and Frank Lyko. 2010. "RNA Methylation by Dnmt2 Protects Transfer RNAs against Stress-Induced Cleavage." *Genes & Development*, no. 24: 1590–95. <https://doi.org/10.1101/gad.586710.1590>.
- Schaefer, Matthias, Julia P. Steringer, and Frank Lyko. 2008. "The Drosophila Cytosine-5 Methyltransferase Dnmt2 Is Associated with the Nuclear Matrix and Can Access

- DNA during Mitosis.” *PLoS ONE* 3 (1): 1–10.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001414>.
- Schmitz, Robert J., Zachary A. Lewis, and Mary G. Goll. 2019. “DNA Methylation: Shared and Divergent Features across Eukaryotes.” *Trends in Genetics* 35 (11): 818–27. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2019.07.007>.
- Schübeler, Dirk. 2015. “Function and Information Content of DNA Methylation.” *Nature* 517 (7534): 321–26. <https://doi.org/10.1038/nature14192>.
- Severin, Philip M.D., Xueqing Zou, Hermann E. Gaub, and Klaus Schulten. 2011. “Cytosine Methylation Alters DNA Mechanical Properties.” *Nucleic Acids Research* 39 (20): 8740–51. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr578>.
- Shinzawa, Naoaki, Tomoko Ishino, Mayumi Tachibana, Takafumi Tsuboi, and Motomi Torii. 2013. “Phenotypic Dissection of a Plasmodium-Refractory Strain of Malaria Vector Anopheles Stephensi: The Reduced Susceptibility to P. Berghei and P. Yoelii.” *PLoS ONE* 8 (5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063753>.
- Sinden, R. E. 2004. “A Proteomic Analysis of Malaria Biology: Integration of Old Literature and New Technologies.” *International Journal for Parasitology* 34 (13–14): 1441–50. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2004.10.005>.
- Sinden, R. E., Yasmene Alavi, and J. D. Raine. 2004. “Mosquito-Malaria Interactions: A Reappraisal of the Concepts of Susceptibility and Refractoriness.” *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 34 (7): 625–29. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2004.03.015>.
- Snell-Rood, Emilie C., Ashley Troth, and Armin P. Moczek. 2013. “DNA Methylation as a Mechanism of Nutritional Plasticity: Limited Support From Horned Beetles.” *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution* 320 (1): 22–34. <https://doi.org/10.1002/jez.b.22479>.
- Stresemann, Carlo, and Frank Lyko. 2008. “Modes of Action of the DNA Methyltransferase Inhibitors Azacytidine and Decitabine.” *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* 123 (1): 8–13. <https://doi.org/10.1002/ijc.23607>.

- Tang, Lin Ya, M. Narsa Reddy, Vanya Rasheva, Tai Lin Lee, Meng Jau Lin, Ming Shiu Hung, and C. K. James Shen. 2003. "The Eukaryotic DNMT2 Genes Encode a New Class of Cytosine-5 DNA Methyltransferases." *Journal of Biological Chemistry* 278 (36): 33613–16. <https://doi.org/10.1074/jbc.C300255200>.
- Tost, Jörg. 2010. "DNA Methylation: An Introduction to the Biology and the Disease-Associated Changes of a Promising Biomarker." *Molecular Biotechnology* 44 (1): 71–81. <https://doi.org/10.1007/s12033-009-9216-2>.
- Trixl, Lukas, and Alexandra Lusser. 2018. "The Dynamic RNA Modification 5-Methylcytosine and Its Emerging Role as an Epitranscriptomic Mark." *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, no. August: e1510. <https://doi.org/10.1002/wrna.1510>.
- Vilcinskas, Andreas. 2016. "The Role of Epigenetics in Host–Parasite Coevolution: Lessons from the Model Host Insects *Galleria Mellonella* and *Tribolium Castaneum*." *Zoology* 119 (4): 273–80. <https://doi.org/10.1016/j.zool.2016.05.004>.
- — —. 2017. "Chapter Six - The Impact of Parasites on Host Insect Epigenetics." In *Insect Epigenetics*, edited by Heleen Verlinden, 1st ed., 53:145–65. London, United Kingdom: Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/bs.aiip.2017.05.001>.
- Vinetz, J M. 2005. "Plasmodium Ookinete Invasion of the Mosquito Midgut." In *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 295:357–82. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16265898>.
- Vlachou, Dina, Timo Zimmermann, Rafael Cantera, Chris J Janse, Andrew P Waters, and Fotis C Kafatos. 2004. "Real-Time, in Vivo Analysis of Malaria Ookinete Locomotion and Mosquito Midgut Invasion." *Cellular Microbiology* 6 (7): 671–85. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2004.00394.x>.
- Volz, Jennifer, Hans Michael Müller, Agnieszka Zdanowicz, Fotis C. Kafatos, and Mike A. Osta. 2006. "A Genetic Module Regulates the Melanization Response of *Anopheles* to *Plasmodium*." *Cellular Microbiology* 8 (9): 1392–1405. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00718.x>.

- Waalwijk, C, and R A Flavell. 1978. "MspI, an Isoschizomer of HpaII Which Cleaves Both Unmethylated and Methylated HpaII Sites." *Nucleic Acids Research* 5 (9): 3231–36. <https://doi.org/10.1093/nar/5.9.3231>.
- Wang, Zhong, Mark Gerstein, and Michael Snyder. 2009. "RNA-Seq: A Revolutionary Tool for Transcriptomics." *Nature Reviews. Genetics* 10 (1): 57–63.
- Warren, M, W.E. Collins, B.B. Richardson, and J Skinner. 1979. "Naturally Occurring Pupal Phenotypes of Anopheles Albimanus and Their Susceptibility to Plasmodium Vivax and P. Falciparum." *Mosquito News* 39 (3): 472–77.
- Whitten, M M A, S H Shiao, and E A Levashina. 2006. "Mosquito Midguts and Malaria: Cell Biology, Compartmentalization and Immunology." *Parasite Immunology* 28 (4): 121–30. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2006.00804.x>.
- Wu, Xiaoji, and Yi Zhang. 2017. "TET-Mediated Active DNA Demethylation: Mechanism, Function and Beyond." *Nature Reviews Genetics* 18 (9): 517–34. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.33>.
- Wyatt, G R. 1951. "Recognition and Estimation of 5-Methylcytosine in Nucleic Acids." *The Biochemical Journal* 48: 581–84. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1275378/pdf/biochemj00918-0079.pdf>.
- Ye, Yixin H., Megan Woolfit, Gavin A. Huttley, Edwige Rancès, Eric P. Caragata, Jean Popovici, Scott L. O'Neill, and Elizabeth A. McGraw. 2013. "Infection with a Virulent Strain of Wolbachia Disrupts Genome Wide-Patterns of Cytosine Methylation in the Mosquito Aedes Aegypti." *PLoS ONE* 8 (6): 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066482>.
- Zakovic, Suzana, and Elena A. Levashina. 2017. "NF-KB-like Signaling Pathway REL2 in Immune Defenses of the Malaria Vector Anopheles Gambiae." *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 7 (JUN). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00258>.
- Zeng, J., and S. V. Yi. 2010. "DNA Methylation and Genome Evolution in Honeybee: Gene Length, Expression, Functional Enrichment Covary with the Evolutionary Signature of DNA Methylation." *Genome Biology and Evolution* 2 (0): 770–80. <https://doi.org/10.1093/gbe/evq060>.

- Zhang, Guangmei, Mazhar Hussain, Scott L. O'Neill, and Sassan Asgari. 2013. "Wolbachia Uses a Host MicroRNA to Regulate Transcripts of a Methyltransferase, Contributing to Dengue Virus Inhibition in *Aedes Aegypti*." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (25): 10276–81. <https://doi.org/10.1073/pnas.1303603110>.
- Zhang, Naifeng. 2018. "Role of Methionine on Epigenetic Modification of DNA Methylation and Gene Expression in Animals." *Animal Nutrition* 4: 11–16. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2017.08.009>.
- Zhu, Heng, Guohua Wang, Jiang Qian, Molecular Sciences, Edward Miller, Sidney Kimmel, Comprehensive Cancer, and The Smith Building. 2017. "Transcription Factors as Readers and Effectors of DNA Methylation" 17 (9): 551–65. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.83>. Transcription.
- Zilberman, Daniel. 2017. "An Evolutionary Case for Functional Gene Body Methylation in Plants and Animals." *Genome Biology* 18 (1): 87. <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1230-2>.

DÉCIMA PARTE
ANEXOS

ANEXO I

***ANOPHELES ALBIMANUS* WIEDEMANN (1820)**

CONDICIONES DE MANEJO DE *A. ALBIMANUS*

CONDICIONES DE INSECTARIO: temperatura de 28 a 30 °C; humedad relativa de 70 a 80 %; ciclos de oscuridad/luz de 12 h/12 h.

CONDICIONES EXPERIMENTALES: temperatura de 19 a 20 °C; humedad relativa de 70 a 80 %; ciclos de oscuridad/luz de 12 h/12 h.

SELECCIÓN DE FENOTIPOS DE *A. ALBIMANUS*

La cepa Tapachula fue la cepa parental del cual se seleccionaron los fenotipos. Los fenotipos Blanco y Café se seleccionaron y se separaron en la etapa pupal con base en la presencia o ausencia de una franja blanca en el dorso. Los fenotipos intermedios con una franja blanca borrosa o un color de cuerpo verde se descartaron. Los fenotipos se mantuvieron separados durante 20 generaciones durante el transcurso de los experimentos. Los fenotipos recurrentes se depuraron sistemáticamente cada generación.

MANEJO DE *A. ALBIMANUS*

ETAPA LARVARIA. Las fases larvarias se colocaron en palanganas de (30 x 55) cm, con 2 cm de profundidad de agua corriente previamente reposada, a una densidad de \approx 200 individuos por palangana y se mantuvieron durante (9 ó 10) d hasta la transición a la fase de pupa. Se alimentaron dos veces al día con alimento pulverizado y esterilizado a base de croquetas para gato. Diariamente se ajustó el nivel de agua de las palanganas a 2 cm de profundidad.

ETAPA PUPAL. Las pupas fueron colectadas con pipetas de transferencia de plástico y colocadas en contenedores plásticos de 7.5 cm de diámetro por 4 cm de alto con agua corriente reposada (aproximadamente 2 cm de profundidad) a una densidad de \approx 200-300 individuos, para mantenerse dentro de contenedores para adultos hasta su emergencia.

ADULTOS. Hembras y machos adultos se mantuvieron a una densidad de 200 individuos en contenedores de 30 cm de diámetro y 15 cm de alto, con tapa de tela de tul para la alimentación y una entrada de manga de tela de tul lateral para permitir la introducción y retiro de los contenedores de pupas, de ovoposición y mosquitos.

ALIMENTACIÓN. En almohadilla de algodón estéril, agregar 10 ml solución sacarosa al 8% en almohadillas de algodón cada 24 h *ad libitum* para alimentar \sim 200 mosquitos hembra *A. albimanus*, durante 24h. **OVIPOSICIÓN.** Los mosquitos fueron alimentados con sangre de conejo a 37°C a través de una membrana de alimentación. Se proporcionaron vasos de oviposición 48 h después de la hemoalimentación. Los huevos se recogieron después de 24 h y se dejaron eclosionar antes de transferirlos a las bandejas de plástico.

PREPARACIÓN DE MOSQUITOS

Grupos de 200 hembras de dos días posteriores a la emergencia (dpe) fueron seleccionadas y colocadas cuidadosamente a través de un tubo acoplado a un filtro y a una manguera con boquilla para aspirarlos mediante succión, para formar los grupos a evaluar: Café (C); Café + azacitidina (CA); Café + decitabina (CD); Blanco (B); Blanco + azacitidina (BA); y Blanco + decitabina (BD). Los mosquitos fueron alimentados con almohadillas de algodón estériles empapados con una solución azucarada (10 ml de solución con sacarosa al 8 %, ácido paraminobenzóico (PABA) al 0.05% y penicilina, estreptomycin y neomicina, (PSN) cada 24 h *ad libitum*, permaneciendo en condiciones experimentales hasta finalizar los ensayos. En todos los experimentos se retiraron los cadáveres y se cuantificó la supervivencia cada 24 h hasta su conclusión.

MANEJO DE MOSQUITOS INFECTADOS

Para corroborar la presencia y viabilidad del parásito en el cultivo post-alimentación y en el lumen intestinal, se tomaron dos muestras del cultivo y 10 intestinos de mosquitos seleccionados aleatoriamente y observarlos por fluorescencia. Solo las hembras completamente alimentadas se mantuvieron en condiciones experimentales a 19-20°C y 70-80% de humedad relativa, en un ciclo de luz / oscuridad de 12/12 h. Los mosquitos infectados y controles fueron alimentados *ad libitum* con almohadillas de algodón humedecidas con una solución de sacarosa al 8% y PABA al 0.05% hasta finalizar los ensayos. Los grupos de mosquitos se usaron para los ensayos únicamente si la prevalencia de infección en el grupo control fenotipo blanco susceptible fue superior al 80%.

TOMA DE MUESTRAS

DISECCIÓN DE INTESTINO MEDIO DE MOSQUITOS

Las hembras fueron anestesiadas en frío durante 15 min a 4°C y se coloraron dorsalmente en laminillas con PBS frío para disecar los intestinos. Se disecaron intestinos medios y se realizaron incisiones longitudinales para lavar y eliminar cualquier resto del contenido intestinal con agua fría desionizada pura de alta calidad. Cada muestra con 30 tejidos se almacenó a -20°C hasta su posterior uso.

ESPECIFICACIONES

1. Se realizaron tomas de muestra de intestinos de 30 hembras por grupo en los siguientes condiciones: hembras de 5 dpe (control), hembras de 5 dpe con 72 h de tratamiento de inhibición de la metilación (tiempo: 0 h) y hembras de 6 dpe con 24 h post-infección o hemoalimentación (tiempo: 24 h).
2. En el caso de los ensayos de mosquitos infectados, estos se infectaron seis h después de concluir los tratamientos de inhibición.
3. La disección de los intestinos medios destinados a las extracciones de ADN o ARN, se realizaron en mosquitos hembra de 5 dpe (después de 72 h de

tratamiento con inhibidores) y de 6 dpe (24 h después de la infección o hemoalimentación).

4. Las muestras de mosquitos infectados se procesaron para la extracción de ADN o ARN una vez confirmada la infección 3 días posteriores a la infección (dpi). Las muestras se almacenaron a -20°C hasta su posterior uso.

INHIBICIÓN DE LA METILACIÓN EN LA ONTOGENIA DE *A. ALBIMANUS*

Posterior a la selección de los fenotipos de *A. albimanus* por más de 20 generaciones, se colectaron huevecillos provenientes del fenotipo Blanco y del fenotipo Café para supervisar la eclosión de los mismos. Cien larvas recién emergidas (L1) de cada fenotipo se colocaron cuidadosamente en placas de seis pozos con 10 ml de agua destilada y permanecieron durante 1 h en quietud. Se inició el tratamiento con 50 μ M de azacitidina en condiciones experimentales hasta concluir los ensayos. Se evaluó la sobrevivencia y el crecimiento larvario cada 24 h a través de la observación directa de la placa y la medición de la longitud cefálica-caudal en un microscopio estereoscópico con micrómetro ocular. Las dosis de azacitidina se realizaron cada 48 h, reemplazando siempre el pozo en el que se encontraban las larvas para evitar la acumulación del fármaco. Los cadáveres se retiraron diariamente hasta concluidos los ensayos.

ANEXO II

SOLUCIONES DE TRABAJO

Solución para alimentación: Disolver, con agitador magnético, 80g de fructosa y 0.5 g de ácido paraminobenzóico (PABA) en 900 ml de agua desionizada. Aforar a 1 L. Esterilizar y almacenar a 4°C hasta por 1 semana.

Solución para alimentación con antibiótico: En 9.894 ml de solución de alimentación, agregar 6.25 μ l de gentamicina (80 mg/ml) y 100 μ l de PSN (Penicilina, estreptomina, neomicina; 100X), para 24 h.

Tratamiento con Azacitidina (25 μ M): Agregar 25 μ l de Azacitidina 10 mM fresco en 9.975 ml de solución para alimentación con antibióticos.

Tratamiento con Azacitidina (50 μ M): Agregar 50 μ l de Azacitidina 10 mM fresco en 9.950 ml de solución para alimentación con antibióticos.

Tratamiento con Azacitidina (75 μ M): Agregar 75 μ l de Azacitidina 10 mM fresco en 9.925 ml de solución para alimentación con antibióticos.

Tratamiento con Decitabina (50 μ M): Agregar 50 μ l de Decitabina 10 mM fresco en 9.950 ml de solución para alimentación con antibióticos.

SOLUCIONES DE ALMACENAMIENTO

Peróxido de hidrógeno (**H₂O₂: Sigma 30% (w/w)**): Tomar (1/12) 83.3 μ l de H₂O₂ 12 M y aforar con 916.7 μ l de PBS estéril a 1 ml para obtener una solución 1 M; almacenar las alícuotas a 2-8°C en oscuridad. SOLUCIÓN DE TRABAJO: agregar 10 μ l de H₂O₂ 1 M en 990 μ l de PBS y mezclar por inversión para obtener una solución 10 mM. Preparar antes de su uso.

Azacitidina (Sigma; wt: 244.2): Pesar 0.244 g de Azacitidina y disolver en 1 ml de ácido acético: H₂O₂ DEPC (1:1) v/v estéril para obtener una solución 1 M. SOLUCIÓN DE TRABAJO: Agregar 10 µl de Azacitidina1M en 990 µl de PBS y mezclar por inversión para obtener una solución 10 µM. Preparar antes de su uso.

Decitabina (Sigma; wt: 228.2) Pesar 0.288 g de Decitabina y disolver en 1 ml de ácido acético: H₂O₂ DEPC (1:1) v/v estéril para obtener una solución 1M. SOLUCIÓN DE TRABAJO: Agregar 10 µl de Decitabina1M en 990 µl de PBS y mezclar por inversión para obtener una solución 10µM. Preparar antes de su uso.

Gentamicina: Alícuotas de 1ml, solución de almacenamiento a 80 mg/ml y almacenar a -20°C. Concentración de uso: 50 mg/ml.

Penicilina/Estreptomicina/Neomicina (**PSN**): Disolver el liofilizado en 100 ml de solución salina 9 mg/ml, hacer alícuotas en 10 ml y almacenar a -20°C.

Solución salina: Pesar 900 mg de NaCl, disolver en 80 ml de agua desionizada y aforar a 100 ml. Esterilizar y almacenar a temperatura ambiente.

Solución CH₃COOH:H₂O DEPC: Agregar poco a poco, 2.5 ml de ácido acético 100% en 2.5 ml de H₂O₂ DEPC estéril. Filtrar y almacenar. Preparar en fresco.

ANEXO III

MATERIALES Y REACTIVOS

ALIMENTACIÓN

Sacarosa (Molecular Probes); ácido paraminobenzóico (PABA; Sigma-Aldrich), Penicilina, Estreptomicina y Neomicina, (PSN; Molecular Probes).

CRECIMIENTO DE FASES MEROGÓNICAS DE *P. BERGHEI*

Primetamina (Sigma-Aldrich); solución criopreservante; 28 % v/v de glicerol, 4.2 % p/v de sorbitol y NaCl a 111.22 mM); giemsa(Sigma-Aldrich); heparina (Sigma-Aldrich).

CULTIVO DE OOCINETOS *P. BERGHEI*

Fenilhidrazina (Sigma-Aldrich); medio RPMI-Ooc (RPMI 1640 (Gibco); suero fetal bovino descomplementado por calor (SFBdc; Gibco).

TRATAMIENTOS DE INHIBICIÓN DE LA METILACIÓN

Azacitidina (Sigma-Aldrich); decitabina (Sigma-Aldrich).

EFFECTO DE AZACITIDINA SOBRE *P. BERGHEI*

Azacitidina (Sigma-Aldrich); H₂O₂(Sigma-Aldrich); gel ECM (Sigma-Aldrich); medio MEM (Gibco); Schn-Ooq (Schneider a pH 6.8 suplementado con 23.8 mM de bicarbonato de sodio, 3.68 mM de hipoxantina, PSN, 44 μM PABA, 0.2% de lípidos / colesterol (Gibco).

AISLAMIENTO DE ADN Y ARN

Tris-HCl (New England Biolabs); EDTA (Thermo Scientific); SDS (Sigma-Aldrich); proteinasa K (Promega); acetato de amonio (Sigma-Aldrich); ARNasa (Sigma-Aldrich); isopropanol (Sigma-Aldrich); etanol (Sigma-Aldrich); TRIzol (Thermo Fisher); Cloroformo (Sigma-Aldrich).

PCR LARGO DE DNMT2

dNTP's (Thermo Scientific); $MgCl_2$ (Thermo Scientific); enzima Long PCR (Thermo Scientific); dNTP's (Thermo Scientific).

PURIFICACIÓN DEL AMPLICÓN DE DNMT2

GeneJET GEL Extraction Kit (Thermo Scientific)

TRATAMIENTO CON ADNasa

ADNsa I (Thermo Scientific); EDTA (Thermo Scientific).

SÍNTESIS DE ADNC

Oligo dT (Thermo Scientific); dNTP's (Thermo Scientific); DTT (Thermo Scientific); inhibidor de ARNasa Ribo lock (Thermo Scientific); tampón y transcriptasa reversa M-MLVRT (Thermo Scientific).

PCR

dNTP's (Thermo Scientific); $MgCl_2$ (Thermo Scientific); tampón de DreamTaq Green y DreamTaq Green ADN pol (Thermo Scientific).

qPCR

MasterMix SYBR Green (Thermo Scientific).

DIGESTIÓN DE ADN CON *HpaII*

Tampón Fast Digest y enzima HpaII (Thermo Scientific).

DOT BLOT

Membrana de nitrocelulosa (Hybond® ECL™); NaCl (Sigma-Aldrich); NaOH (Sigma-Aldrich); Tris.Cl (New England Biolabs); Tween 20 (); anticuerpo primario $\alpha 5^mC$ (Zymo research, A3001-200); anticuerpo secundario αPRP (GERPN2108 - ECL™ Western Blotting Analysis System); quimioluminiscencia (GERPN2108 - ECL™ Western Blotting Analysis System); película (KODAK BioMax Light).

HPLC

HIDROLISIS:ADNsa I (Thermo Scientific); Nucleasa S1 (Thermo Scientific); CH₃COOH (Sigma-Aldrich); glicina (Sigma-Aldrich); MgCl₂ (Sigma-Aldrich); ClZn (Sigma-Aldrich); ClCa (Sigma-Aldrich); NaOH (Sigma-Aldrich); fosfatasa alcalina (Thermo Scientific). DERIVATIZACIÓN:dimetilformamida (DMF; Sigma-Aldrich); CH₃COOH (Sigma-Aldrich); bromoacetofenona (Sigma-Aldrich). CROMATOGRAFÍA:columna cromatográfica Agilent Sorbax C18 (250 x 4.6 mm, 5 μ m); precolumna Supelco; Acetonitrilo (Fisher Scientific, Pittsburgh, USA), ácido trifluoroacético (TFA; Fisher Scientific, Pittsburgh, USA), metanol (Fisher Scientific, Pittsburgh, USA) y agua (D; (18.2 M Ω cm, Labconco, USA).

ACTIVIDAD FENOL-OXIDASA

Isopropanol (Sigma-Aldrich); feniltiurea (Sigma-Aldrich); L-DOPA (Sigma-Aldrich).

CUANTIFICACIÓN DE NITRITOS Y NITRATOS

ZnSO₄ (Sigma-Aldrich); NaOH (Sigma-Aldrich); Sulfanilamida (Sigma-Aldrich); NED (Sigma-Aldrich); H₃PO₄ (Sigma-Aldrich); VCl₃ (Sigma-Aldrich); HCl (Sigma-Aldrich); NaNO₂ (Sigma-Aldrich).

ANEXO IV

UN RECORRIDO HISTÓRICO SOBRE LA 5mC

En 1925 Johnson y Coghill descubrieron a la 5mC como componente estructural en el DNA del bacilo de la tuberculosis. En 1948, Hotchkiss confirmó el hallazgo de Johnson-Coghill en una muestra de timo bovino y sugirió que la citosina modificada se encuentra naturalmente en el DNA; la nombró epicitosina por su comportamiento cromatográfico y su espectro de absorción ultravioleta similar al de la citosina (Hotchkiss 1948). En ese mismo año, Rosedale reportó la presencia de la 5mC en el DNA de insectos. (Rosedale, J. L., 1948). En 1950, Wyatt mostró que la 5mC está presente en los ácidos nucleicos de los animales y de las plantas (Wyatt 1951).

En 1958 Bessman caracterizó la función de la DNA polimerasa y mostró que la enzima no puede distinguir entre las citosinas metiladas de las no metiladas, además propuso la existencia de enzimas responsables de propagar a la 5mC durante la replicación del DNA, las metiltransferasas. Para 1962, con el trabajo de Arber y Dussoix en el que descubren el fenómeno de restricción y modificación en DNA de bacterias, se incorporan evidencias en las que la 5mC y/o N6 metil adenosina tienen importantes consecuencias biológicas. En 1963, Gold corroboró que la catálisis de la metilación en el DNA es realizada por las proteínas DNA metil-transferasas (DNMTs). Grippo encontró en 1968, que en los animales la metilación ocurre en la citosina del dinucleótido CpG y dos años más tarde, Vanyushin encontró que hay diferencias entre las 5mC totales de los diferentes tejidos en animales.

Finalmente en 1975 Holliday y Pug por un lado y Riggs por otro, publican en artículos independientes la posible función de la metilación: silenciamiento de la expresión génica. Luego se conocieron dos mecanismos de control transcripcional: 1) mecanismo directo, en el que la 5mC previene la unión de los factores de transcripción como E2F, Krox-20 y CREB. 2) mecanismo indirecto, unión de proteínas con dominios de unión a grupo metilo y bloquean la unión de la RNAPol (Proteínas de unión a DNA metilado: MBD1-4). Para 1978, la 5mC es reconocida como la quinta base del DNA en los vertebrados (Moore, Le, and Fan 2012).

En 1939, el biólogo del desarrollo Conrad Waddington, utilizó el término epigenética para referirse al camino que toman las células durante el desarrollo y su paso del genotipo al fenotipo, e incorpora la idea de que las células vecinas influyen la diferenciación de las otras, sin embargo, no visualizó a la molécula responsable de este fenómeno. En 1956 Conrad Waddington logró demostrar la herencia de una característica adquirida en una población en respuesta a un estímulo ambiental. Sus estudios se centraron en analizar el efecto que tiene cambiar la temperatura o administrar estímulos químicos en el desarrollo de la estructura del tórax y alas en embriones de la mosca de la fruta. Observó que el desarrollo de los embriones se veía persuadido por los estímulos ambientales que aplicaba y que conducían al embrión a una “canalización” que lo llevaba hacia el favorecimiento de un tipo de estructura torácica-alar definida, sobre otra no favorecida en una población con un mismo fondo genético. Para Waddington, la imagen de “canalización” representa la influencia del medio sobre el desarrollo de los organismos. Al modelar al desarrollo como un panorama en el que el organismo o las células en diferenciación toman una serie de decisiones que las conducen a la determinación del fenotipo, Waddington incluyó a la influencia del medio y lo simboliza como valles u horquillas con pendientes que estructuran el relieve o panorama del desarrollo.

Luego, la posibilidad de que una característica adquirida se heredara tenía que ponerse a prueba. Waddington seleccionó y crió a la progenie de los insectos que mostraban el fenotipo adquirido y los expuso a los mismos factores ambientales inductores. Después de varias generaciones y aplicación de los inductores observó que la proporción de adultos con el fenotipo adquirido se incrementaba e incluso se mantenía sin la necesidad de aplicar el inductor. Dado que la adquisición fenotípica requería de varias generaciones para “fijarse en el genoma” del organismo sin la necesidad del inductor, llamó a este proceso “asimilación”. Por tanto, en el proceso de “asimilación” había dos etapas consecutivas a saber: la asimilación suave, donde la fijación fenotípica en la población ocurre como consecuencia de la aplicación del inductor en cada generación y a través de un cierto número de generaciones y, la asimilación dura, en cuyo caso no se requiere del reforzamiento del fenotipo con el inductor para que la población presente la característica adquirida, pero es requerido que la población sea descendiente del linaje en el que se fijó la característica. Es de notar el requerimiento del linaje para la fijación fenotípica, pues sustenta el hecho de que

la población de partida cuenta con la información del rasgo en su genoma, en forma de alelo, y éste es seleccionado por el inductor para favorecer su expresión en la población.

Estos experimentos pioneros sentaron las bases de la herencia de las características adquiridas en los organismos y es de resaltar también, que el modelo fundador es el insecto. Ya desde entonces, se sugería que a pesar de precisar la codificación genómica del rasgo, el sitio que albergaba esta adquisición se encontraba por encima del genoma (epi-genoma).

Después de que se demostró que la herencia de una característica adquirida en una población en respuesta a un estímulo ambiental ocurre, a finales de los 50' se gestaban las condiciones históricas que conducirían a elucidar el mecanismo de esta selección alélica. Sin embargo, pasarían cerca de dos décadas para entrever a la epigenética como mecanismo de herencia. Mientras tanto, se sumarían conocimientos que llevarían a plantear a la función de la metilación del DNA como de silenciamiento de la expresión génica.

Adams y McKay reportaron niveles bajos pero medibles en los mosquitos *Aedes*. A través de la cromatografía con columna de intercambio iónico, lograron una mejor detección y mayor separación de la 5^{mC} de las muestras de las células de los *Aedes albopictus*, que con la cromatografía en papel. Determinaron la presencia del 0.036% de la 5^{mC} del total de las bases del DNA en los *Aedes* (Adams et al. 1979). Casi una década después Bianchi y Vidal-Rioja, buscaron la presencia de la 5^{mC} a través de un abordaje indirecto: a través del tratamiento con la 5-AZA a los cromosomas en las células de los *Aedes albopictus*, los hacen susceptibles a la digestión con la enzima *HpaII* (Bianchi, Vidal-Rioja, and Cleaver 1986). En 2004, Marhold et al, detectaron por *slot blot* la 5^{mC} en el DNA genómico embrionario de la *Drosophila melanogaster*, la *Drosophila pseudoobscura* y del mosquito *Anopheles gambiae* (Marhold et al. 2004). (Marhold et al., 2004)

Sin embargo, en otros organismos también se ha tenido información controvertida sobre si presentan metilación naturalmente. Por más de tres décadas, la existencia de la metilación en el parásito *Plasmodium* es el tema de debate. Finalmente, en 2013 Ponts y Fu comprobaron la presencia de la 5^{mC} en el DNA de los parásitos del género

Plasmodium, con la cromatografía acoplada a la espectrometría de masas y secuenciación genómica (Ponts et al. 2013).

ACONTECIMIENTOS IMPORTANTES EN EL ESTUDIO DE LA METILACIÓN DEL ADN

- 1904 — Johnson y Wheeler sintetizan la 5-metil citosina (5mC).
- 1925 — Johnson y Coghill descubren la 5mC como componente estructural en la molécula del ADN del bazo de la tuberculosis. Discuten que a través de la desaminación la citosina se convierte en uracilo (principalmente en plantas) y que la desaminación de la 5mC en animales, se convierte en timina.
- 1939 — Conrad Waddington utiliza el término epigenética para referirse al camino que toman las células durante el desarrollo y el paso del genotipo al fenotipo. También incorpora la idea de que las células vecinas influyen la diferenciación de las otras.
- 1940 — Conrad Waddington introduce el concepto de paisaje epigenético para describir el fenómeno en el que las células en diferenciación pierden la habilidad para regresar a un estado de mayor pluripotencia.
- 1948 — Hotchkiss comprueba la presencia de 5mC en ADN de timo bovino.
- 1950 — Wyatt muestra que la 5mC está presente en los ácidos nucleicos de los animales y de las plantas.
- 1958 — Bessman caracterizó la función de la ADN polimerasa y mostró que la enzima no puede distinguir entre las citosinas metiladas y las no metiladas. Propone la existencia de enzimas metiltransferasas como las responsables de propagar a la 5mC durante la replicación del ADN.
- 1962 — Arber y Dussoix descubrieron el fenómeno de restricción y modificación en bacterias. Fue reconocido más tarde que las modificaciones en el ADN como la 5mC y/o N6 metil adenosina tienen importantes consecuencias biológicas.
- 1963 — Gold reporta que la catálisis de la metilación en el ADN es realizada por las proteínas DNMTs.
- 1968 — Grippo encuentra que a diferencia de las plantas, en los animales mayores, la metilación ocurre en la citosina del dinucleótido CpG.
- 1970 — Kelly y Smith descubrieron endonucleasas de restricción con aplicación en el análisis en el ADN.

- 1970 — Li y Olin reportan la citotoxicidad y modo de acción de la 5-azacitidina en la leucemia.
- 1970 — Vanyushin encuentra diferencias entre el total de las 5mC en los diferentes tejidos de animales.
- 1971 — Danna y Nathans probaron que enzimas de restricción cuya función es comprometida por la presencia de la 5mC en la secuencia de reconocimiento tienen un gran valor para analizar el estado de metilación de una secuencia de ADN.
- 1974 — Cihak descubre los efectos biológicos de la 5-azacitidina en eucariontes.
- 1975 — Holliday and Pug, y Riggs publican la posible función de la metilación de forma independiente.
- 1977 — Constantinides muestra el efecto de la 5-azacitidina en las células del músculo estriado.
- 1977 — Christman demuestra que en presencia de L-methionina aumenta la expresión de genes de la globina en células eritroleucémicas; la L-methionina conduce a la reducción de la 5mC en el locus de la beta globina.
- 1978 — Waalwijk y Flavell encuentran diferencias significativas entre la abundancia de 5mC del esperma, el cerebro y el hígado de conejo.
- 1978 — Waalwijk y Flavell investigan la 5mC en el locus de la globina a través del uso de los isoesquizómeros *HpaII* y *MspI* que reconocen la secuencia 5'-ccgg-3'
- 1978 — Coulondre reporta que la desaminación de la 5mC produce timina.
- 1979 — McGhee y Ginder se preguntaron si los niveles de 5mC correlacionan con la expresión de genes del locus de la beta globina de pollo. Prueban que los genes sin 5mC se expresan y cuando inducen su metilación se silencian.
- 1981 — Mohandas prueba que la 5mC inactiva a el cromosoma X.
- 1982 — Ehrlich comprueba definitivamente las variedades globales de los niveles de metilación entre tejidos y tipos celulares.
- 1982 — Gruenbaum reporta que la DNMT1 tiene una alta afinidad por el ADN hemimetilado y Stein observa que copia el patrón de 5mC de la hebra

parental.

- 1985 — Bird identifica las islas CpG en promotores y la ausencia de la 5mC en estas regiones.
- 1987 — Reik reporta que la 5mC es el mecanismo de imprinting génico.
- 1988 — Watt y Molloy demuestran que la 5mC tiene un efecto de represión directa de la expresión, por exclusión de la unión de proteínas que efectúan la transcripción.
- 1990 — Okano analiza la DNMT3 (*de novo*) y su especificidad de tejido.
- 2000 — Ramsahoye muestra que sólo en mamíferos, la 5mC que está fuera de contexto CpG es observada en células troncales embrionarias con potencial relevancia biológica.
- 2000 — Lyko la 5mC está presente en *Drosophila melanogaster* durante el desarrollo embrionario.
- 2005 — Robertson reporta el mecanismo indirecto de la 5mC en la represión de la expresión génica, por reclutamiento de proteínas de unión a metil-CpG que se asocian con remodeladores de cromatina represivos de la expresión génica.
- 2007 — Hellman reporta que la 5mC en promotores y enhancers silencian la expresión génica y que la 5mC en el cuerpo del gen aumenta la expresión. 2007: Slotkin y Martiensenn reportan que la 5mC tiene el efecto de mayor integridad cromosómica y silenciamiento de transposones.

ARTÍCULO PUBLICADO



DNA Methylation in *Anopheles albimanus* Modulates the Midgut Immune Response Against *Plasmodium berghei*

Fabiola Claudio-Piedras, Benito Recio-Tótoro, Renaud Condé, Gerardo Hurtado-Sil and Humberto Lanz-Mendoza*

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.03025/full>

Centro de Investigaciones Sobre Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca, Mexico

OPEN ACCESS

Edited by:

Gerardo R. Vasta,
University of Maryland, Baltimore,
United States

Reviewed by:

Parisa Norouzzafab,
Ghent University, Belgium
Parik Kakani,
Birla Institute of Technology and
Science, India
Rini Dhawan,
National Brain Research Centre
(NBRC), India

*Correspondence:

Humberto Lanz-Mendoza
humberto@insp.mx

Specialty section:

This article was submitted to
Comparative Immunology,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 11 July 2019

Accepted: 10 December 2019

Published: 14 January 2020

Citation:

Claudio-Piedras F, Recio-Tótoro B,
Condé R, Hernández-Tablas JM,
Hurtado-Sil G and Lanz-Mendoza H
(2020) DNA Methylation in *Anopheles
albimanus* Modulates the Midgut
Immune Response Against
Plasmodium berghei.
Front. Immunol. 10:3025.
doi: 10.3389/fimmu.2019.03025

Epigenetic mechanisms such as DNA methylation and histone post-translational modifications are fundamental for the phenotypic plasticity of insects during their interaction with the environment. In response to environmental cues, the methylation pattern in DNA is dynamically remodeled to achieve an epigenetic control of gene expression. DNA methylation is the focus of study in insects for its evolutionarily conserved character; however, there is scant knowledge about the epigenetic regulation in vector mosquitoes, especially during their infection by parasites. The aim of the present study was to evaluate the participation of DNA methylation in the immune response of *Anopheles albimanus* to a *Plasmodium* infection. For this, we first investigated the presence of a fully functional DNA methylation system in *A. albimanus* by assessing its potential role in larval development. Subsequently, we evaluated the transcriptional response to *Plasmodium berghei* of two mosquito phenotypes with different degrees of susceptibility to the parasite, in a scenario where their global DNA methylation had been pharmacologically inhibited. Our study revealed that *A. albimanus* has a functional DNA methylation system that is essential to larval viability, and that is also responsive to feeding and parasite challenges. The pharmacological erasure of the methylome with azacytidine or decitabine abolished the divergent responses of both mosquito phenotypes, leading to a transcriptionally similar response upon parasite challenge. This response was more specific, and the infection load in both phenotypes was lowered. Our findings suggest that DNA methylation may constitute a key factor in vector competence, and a promising target for preventing malaria transmission.

Keywords: DNA methylation, resistance to *Plasmodium*, *Anopheles*, Immune response, epigenetic regulation

INTRODUCTION

Nucleic acid methylation is the most ancient and conserved epigenetic mechanism (1–4). The methylation of cytosines is a chemical modification of nucleic acids that involves the covalent addition of methyl groups to the 5-carbon of the cytosine (5, 6). This reaction is catalyzed by a family of conserved enzymes called methyltransferases, which place the methyl group on cytosines that lie in the major groove of double-stranded DNA (7–9). DNA methyltransferase 2 (DNMT2) is the most conserved methyltransferase, and it is the only present in dipterans capable of methylating

DNA as well as RNA (10–12). Unlike DNMT1 which methylates cytosines in the CpG sites, DNMT2 methylates out of any particular context (6, 10, 11). The 5-methyl-cytosine (5mC) is a stable epigenetic mark that adds information to the genetic code, this mark is dynamic and changes occur in response to environmental stimuli. It does not interfere with base pairing but, depending on the degree of methylation and its context, it can promote or inhibit strand separation (5, 6, 13). The most widespread function of 5mC is to enhance or hinder the binding of transcriptional factors or regulatory proteins that, in conjunction with other epigenetic modifications, modulate the expression of genes through the structure and stability of the chromatin (14, 15). Additionally, the 5mC is the substrate for Ten-eleven Translocation (TET) dioxygenases, which have a key role in the epigenetic dynamics of DNA methylation during the generation and maintenance of phenotypic diversity (16, 17). The family of TET enzymes is formed by TET1, TET2, and TET3 (17). TET enzymes catalyze the oxidative demethylation of 5mC to form more oxidized intermediates of cytosine that can be converted back to unmodified cytosines (17).

In the dipteran model *Drosophila*, the amount of global 5mC is about as low as 0.1–0.6% of all cytosines (18–20) and the null mutation of the *dnmt2* gene showed no apparent anomalies in development (21). This low levels of DNA methylation present in dipterans has caused it to be regarded as having a subtle function or even a lack thereof (22, 23). Despite this, the biological significance of this epigenetic mark in *Drosophila* has been established in the silencing of retrotransposon transcription, maintenance of telomere integrity (20), and as a requirement for a normal lifespan (21). Furthermore, DNMT2 is essential for efficient immune antiviral responses (24) and the protection of RNA under heat shock and oxidative stress in *Drosophila* (25). Other insects like bees, wasps, and sawflies have more complex methylation system comprising three enzymes; DNMT1, DNMT2, and DNMT3 (23). For example, *Apis mellifera* have ~1.4% of their total genomic cytosines methylated (4) and their methylation system has been studied in relation to transcriptional activity and phenotypic plasticity (1, 4, 26, 27). In other insects such as horned beetles, *Tribolium castaneum*, and *Galleria mellonella*, DNA methylation has been shown to play a role in the generation of different phenotypes, changes in behavioral and nutritional plasticity, as well as in stress responses induced by heat or infections (28–30). In mosquitoes, it is not well-understood whether DNA methylation plays an essential role in their development, nutrition, or immune response (31–35).

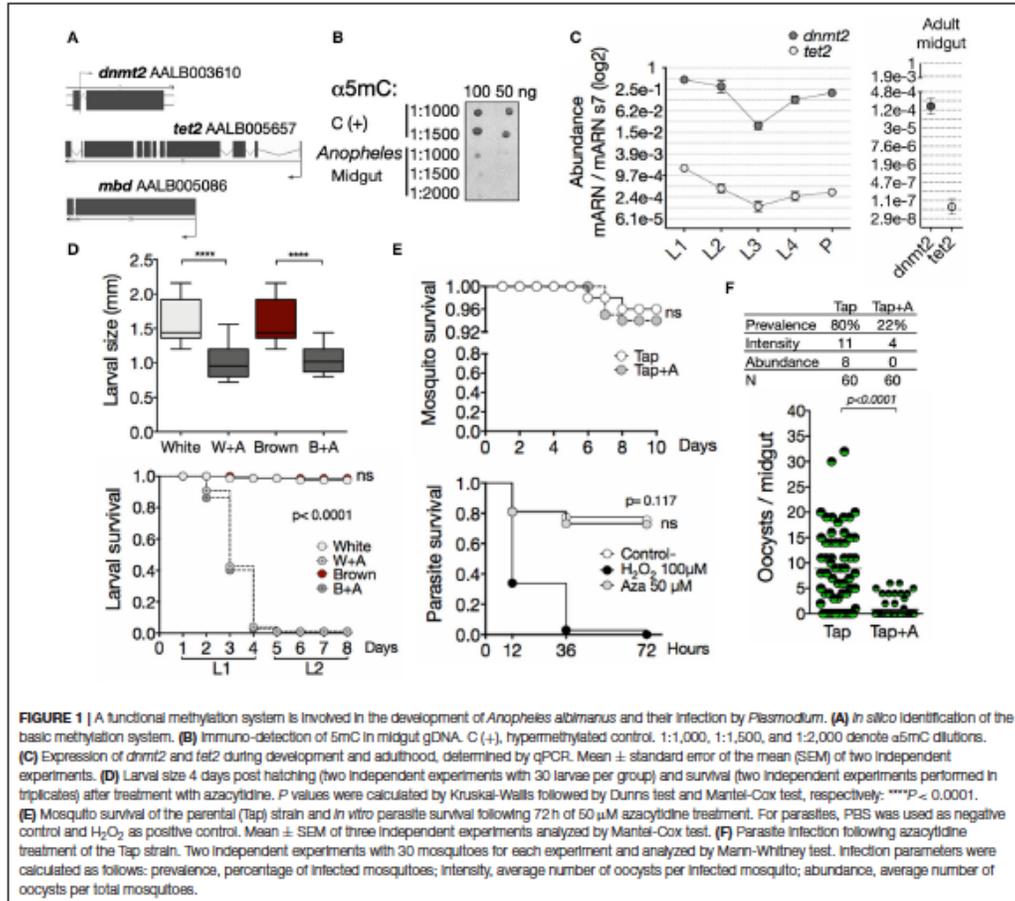
Anopheles albimanus is one of the principal malaria vectors in Central America and its surroundings from Florida and Texas in the north, to Peru in the south (36, 37). Mosquito infection by *Plasmodium* depends on the parasite development into invasive ookinetes that colonize and form oocysts in the midgut (38, 39). The most significant reduction in parasite numbers occurs in the midgut, which displays a fast immune response (36, 40, 41). Since the innate immune response constitutes an insect's primary defense mechanism against infections, several mosquito immune effectors are related to different degrees of resistance to *Plasmodium* (41–44). *Anopheles albimanus* has two naturally

occurring phenotypes with differences in their *P. vivax* infection susceptibility (45). These phenotypes are distinguished on larvae and pupae by the presence or absence of a morphological marker denominated *stripe*. The *white stripe* phenotype shows a layer of white pigment visible below the cuticle of the back of the abdomen and the thorax. The *white stripe* mosquitoes (White, W) have been shown to be more susceptible to *P. vivax* infections than the non-striped mosquitoes (Brown, B) (45). This phenomenon has not been characterized at the molecular or functional level. The natural occurring of phenotypes in *A. albimanus* may be involved in various physiological processes in the mosquitoes, in which DNA methylation can play an important role. We took advantage of this phenotypic trait to study the influence of DNA methylation in the transcriptional immune response to a parasite challenge in susceptible and resistant mosquitoes.

RESULTS

Anopheles albimanus Has Functional Genes of the DNA Methylation Machinery Which Are Required for Mosquito Development

To obtain insights regarding if the methylation system is operating in *A. albimanus*, we initially took a bioinformatic approach to look for the DNA sequences coding for the proteins involved in DNA methylation. A search in the *A. albimanus* genome database revealed the presence of genes coding for a DNA/RNA methyltransferase 2 (*dnmt2*), a demethylase methylcytosine dioxygenase *tet2* (*tet2*) and the regulatory protein, methyl-CpG-binding domain protein (*mbd*) (Figure 1A and Figures S1–S3). Hence, the *A. albimanus* genome presents all the components needed for regulating gene expression by nucleic acid methylation. Given that the first organ challenged by *Plasmodium* invasion is the midgut (38), we particularly focused on this organ and determined whether the genomic DNA (gDNA) and RNA in this organ contained 5mC. We found the epigenetic mark in the midgut DNA (Figure 1B; mean pixel intensity: C+ = 44.2 ± 3.2 , Midgut = 10.26 ± 2.3) and RNA (Figure S4; 5mC% = 0.73 ± 0.11 , after azacytidine treatment 5mC% = 0.48 ± 0.16). Since DNA methylation has essential roles in reproduction and development, orchestrating the phenotypic plasticity of almost all organisms (46), we determined its functionality during mosquito development. First, we evaluated the transcription profile of *dnmt2* and *tet2* during ontogeny. Both genes were transcribed throughout the mosquito development and during adulthood (Figure 1C). Then, the effect of methylation inhibition with azacytidine in the early stages of larval development was evaluated, resulting in diminished size and survival of the larvae (Figure 1D). Together, these data provide strong evidence for the functionality of the methylation system and demonstrate an essential role of nucleic acid methylation during the ontogeny of the mosquito. In contrast, the survival of adult mosquitoes and ookinetes was not affected (Figure 1E). Interestingly, the azacytidine treatment significantly reduced the



mosquito infection (Figure 1F), suggesting that nucleic acid methylation plays a key role during this process.

Anopheles albimanus Phenotypes Are Different in gDNA Methylation Status, Transcriptional Profile, and Susceptibility to *Plasmodium*

Epigenetic modifications have been shown to modulate phenotype expression in insects (26–30). Thus, to explore the potential role of the DNA methylation in the phenotypes of *A. albimanus* and their responses against a *Plasmodium* infection, we first characterized the two phenotypes from the parental mosquito Tapachula (Tap) strain at a functional and molecular level. We determined the susceptibility/resistance condition of the White and Brown phenotypes to *P. berghei* infections.

For this, female mosquitoes of 5 days post-emergence were fed with 400 ookinetes per μ l, and 3 days post-feeding, the oocyst load per midgut was determined by fluorescence microscopy. This experiment was repeated for seven generations for the Tap strain and for 10 successive generations for White and Brown. In each generation of the Tap strain and the derived Brown and White phenotypes, a sample of mosquitoes were taken for the parasite challenges, while the rest were kept for breeding the next generation. As shown, *P. vivax*-susceptible White mosquitoes are also more susceptible to *P. berghei* infections compared to Brown mosquitoes (Figures 2A,B, and Figure S5).

To characterize the phenotypes at a molecular level, we evaluated basal nitric oxide production, phenoloxidase activity, amount of genomic 5mC, and transcriptional profile of several immune markers previously described as the main effectors in the mosquito midgut against *Plasmodium* (36, 40). The basal

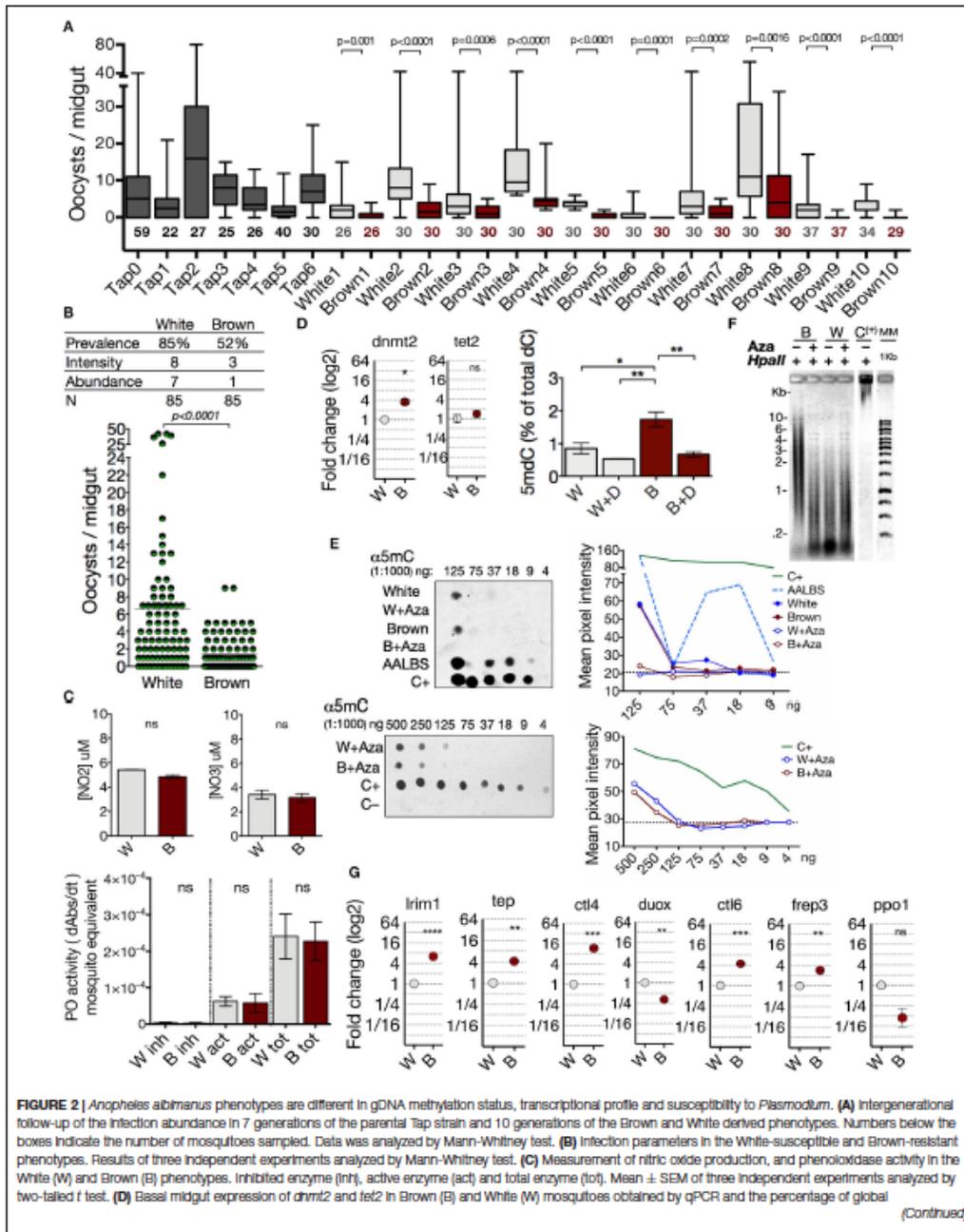


FIGURE 2 | 5-methyl-2-deoxycytidine [5mC] in midgut gDNA of both phenotypes treated with 50 μ M of decitabine (W+D and B+D). Determinations were obtained by HPLC (mean \pm SEM of three independent experiments, analyzed by ANOVA and Tukey post-hoc test). **(E)** Effect of azacytidine on the amount of 5mC in midgut gDNA of the mosquito phenotypes determined by immunodetection. Mean pixel intensity of the dots is represented to the right of the biots. Hypermethylated DNA as positive control (C+), lambda phage as negative control (C-). AALBS is the *A. albimanus* LSB-AA695BB cell line. The numbers above the biots represent gDNA dilutions. **(F)** Midgut gDNA digestion with *HpaII* after azacytidine treatment in both phenotypes. (C+) = hypermethylated DNA. **(G)** Basal midgut expression of several immune anti-*Plasmodium* markers in the two phenotypes. Expression determined by qPCR and relative to White mosquito's expression. Means \pm SEM of three independent experiments analyzed by two-tailed *t* test. Asterisks represent the *P* value as follows: **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001, *****P* < 0.0001.

nitric oxide (NO) production and phenoloxidase (PO) activity were not different between the phenotypes (Figure 2C). The differences in susceptibility observed between phenotypes did not correlate with basal NO production or PO activity, so it is not a feature that conditions the susceptibility/resistance to infection in the phenotypes.

Next, we analyzed the transcriptional profile of *dnmt2* and *tet2*, and the 5mC content in both phenotypes. With a 3.5-fold higher *dnmt2* transcription, Brown mosquitoes had significantly more total gDNA methylation ($1.73\% \pm 0.22$) than White mosquitoes ($0.85\% \pm 0.17$) (Figure 2D). We found that the amount of the nucleoside 5-methyl-2-deoxycytidine (5mC) between phenotypes was leveled after the treatment with decitabine; an exclusive DNA-methylation inhibitor (Figure 2D). Furthermore, azacytidine inhibited DNA methylation in both phenotypes, although slightly more efficiently in Brown mosquitoes (Figures 2D–F). After gDNA digestion with the 5mC-sensitive restriction enzyme *HpaII*, Brown mosquitoes showed digestion protection which is lost after azacytidine treatment (Figure 2F), thus corroborating a higher degree of gDNA methylation than in the White mosquitoes.

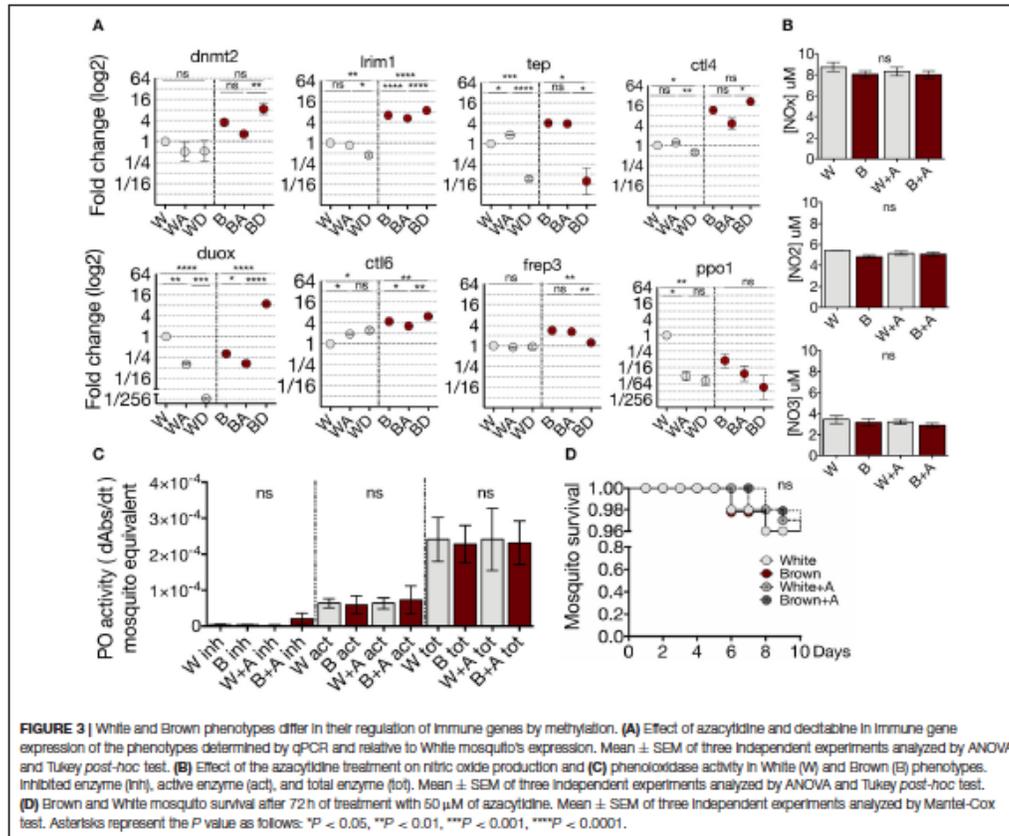
Then, evaluation was made of the basal transcription levels of *leucine-rich repeat immune protein 1* (*lrim1*), *thioester-containing complement-like protein* (*tep*), *c-type lectin 4* (*ctl4*), *dual oxidase* (*duox*), *c-type lectin 6* (*ctl6*), *fibrinogen-related protein 3* (*frep3*), and *pro-phenoloxidase 1* (*ppo1*). We found several differences between the transcription levels in the phenotypes. Fold change transcript abundance of Brown in relation to White mosquito were as follows: *lrim1* (+6.3), *tep* (+4.1); *ctl4* (+11.6), *ctl6* (+4.4), *frep3* (+2.8) (Figure 2G). In *A. gambiae* and *A. stephensi*, Dual oxidase acts as a modulator that prevents a strong immune response (47, 48). Thus, the lower transcription (3.1-fold) of *duox* in Brown mosquitoes could also contribute to its resistance condition (Figure 2G). No differences were observed in the pro-phenoloxidase 1 (*ppo1*) expression (Figure 2G). These mosquito transcriptional profiles correlate with the susceptibility differences observed between the White (prevalence = 85%, intensity = 8, abundance = 7) and Brown (prevalence = 52%, intensity = 3, abundance = 1) phenotypes (Figure 2B). Our results show significant differences between the phenotypes, which consist of a higher abundance of genomic 5mC, higher transcriptional activity of immune markers in basal conditions, and a lower load of oocysts in the Brown phenotype compared to the White phenotype. Considering the transcriptional differences and amount of 5mC observed between White and Brown mosquitoes, we explored the possibility that these differences would be modulated by gDNA methylation.

White and Brown Phenotypes Differ in Their Modulation of Immune Genes by Methylation

To investigate whether transcription of the immune markers selected are modulated by DNA or RNA methylation, White and Brown mosquitoes were treated with the azanucleosides decitabine or azacytidine, and their transcription profiles were determined. The methylation inhibitor decitabine is a deoxycytidine analog that is exclusively incorporated into DNA, while azacytidine incorporates into DNA and RNA (49). Inhibition of methylation by the azanucleosides had phenotype-specific effects on transcription (Figure 3A). This effect may be due to the differential deposition of epigenetic marks between the phenotypes, which can depend on underlying genetic differences (50). Remarkably, decitabine produced greater and in many cases contrary transcriptional effects than azacytidine. It has been shown that a loss of 5mC in RNA causes impairments in post-transcriptional processes (51), whereas the effect of decitabine only involves transcriptional processes. The selective inhibition of DNA methylation affects the abundance of distinct transcripts among the phenotypes (White: *lrim1* and *ctl4*; Brown: *frep3*) (Figure 3A). In White mosquitoes, transcript abundance of *ctl6* and *ppo1* were affected mainly by 5mC inhibition in the DNA (the inhibition of RNA methylation by azacytidine did not aggregate transcriptional effects). There were no changes in transcript expression resulting exclusively from RNA inhibition (by azacytidine but not decitabine). In contrast, both inhibitors affected the expression of some gene transcripts in White mosquitoes (*tep*, *duox*, *ctl6*, and *ppo1*) and Brown mosquitoes (*lrim1*, *duox* and *ctl6*), although with opposite effects (White: *tep*; Brown: *lrim1*, *duox*, and *ctl6*). In contrast, 5mC inhibition did not have any post-transcriptional effect on NO production (Figure 3B) and phenoloxidase activity (Figure 3C). Moreover, the methylation inhibition treatment did not have any impact on the adult survival of both phenotypes (Figure 3D). Our results show that the inhibition of methylation had phenotype-specific effects on the midgut transcription profile. Furthermore, these data provide evidence that the midgut expression of anti-*Plasmodium* genes is epigenetically modulated by DNA methylation in *A. albimanus*.

White and Brown Phenotypes Respond Differently to a *Plasmodium* Challenge In Terms of DNA Methylation and Transcription of Immune Genes

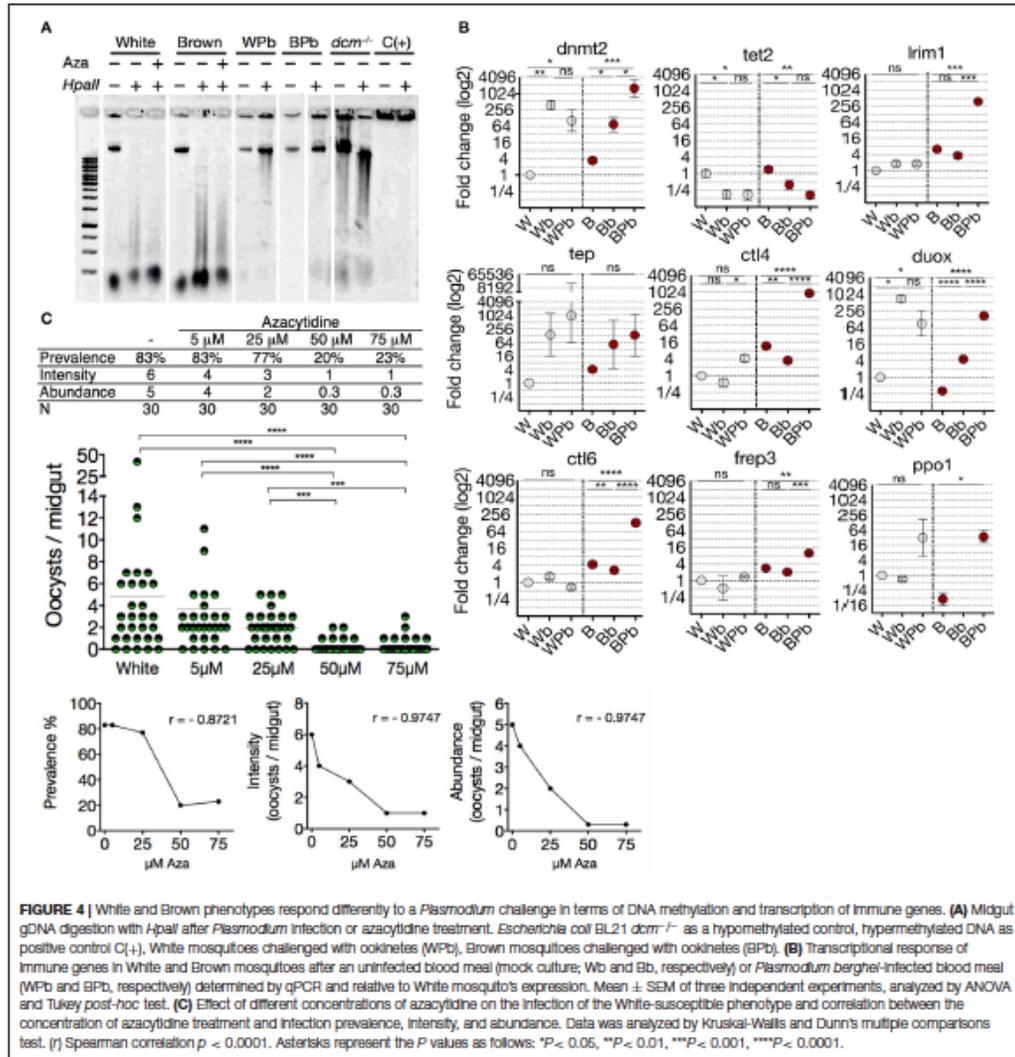
Since oxidative stress, nutritional balance, and microbial challenges trigger epigenetic marking of DNA (52–54), we



tested the functionality of the methylation system of both mosquitoes phenotypes. For this we evaluated whether the status of 5mC in midgut gDNA changes in response to an immune challenge with the parasite. Midgut gDNA of *Plasmodium*-challenged mosquitoes of both phenotypes were digested with the restriction enzyme *HpaII*. Midgut gDNA of *Plasmodium*-challenged mosquitoes of both phenotypes showed less sensitivity to *HpaII* digestion (Figure 4A), revealing a higher level of 5mC and a dynamic methylation status that responds to the immune challenge. In agreement with this epigenetic response, clearly induced from the immune challenge, we found that *dnmt2* and *tet2*, as well as most of the anti-*Plasmodium* genes have putative regulatory binding sequences for the nuclear factor- κ B (NF- κ B) family, the key transcription factors of the immune response (55) (Table S1). Therefore, we evaluated the transcriptional profile of mosquitoes fed with uninfected- and *P. berghei* infected-blood. Upon parasite challenge, Brown mosquitoes showed an increase in *dnmt2* transcription (BpB/Bb: 21.3-fold) and a tendency

to decrease *tet2*, while the White mosquitoes did not show significant differences (Figure 4B). This balance is congruent with the gain in the epigenetic mark. Also, blood-feeding induced a substantial increase in *dnmt2* transcription (Wb: 372-fold; Bb 21-fold) and a decrease in *tet2* (Wb: 5.6-fold; Bb: 3.6-fold). Hence, we corroborated that *dnmt2* and *tet2* are responsive to environmental stimuli.

Anopheles mosquitoes regulate their transcriptional profile during *Plasmodium* invasion (36). The specificity and quantity of this response can contribute to the resistance to the parasite, therefore to obtain further insights into the susceptibility differences; we evaluated the transcriptional response to the parasite in both mosquito phenotypes. We found that the transcription profile of Brown vs. White mosquitoes during *Plasmodium* invasion was strongly induced and significantly most robust (Figure 4B). Furthermore, the only significantly up-regulated gene in White mosquitoes was *ct4* (7.7-fold), a lectin-like receptor considered an agonist of *Plasmodium* survival



in the midgut (56). In contrast, Brown mosquitoes drastically increased the transcription of *lrim1* (104-fold), *ct16* (47.6-fold), *frep3* (4.9-fold), and *ppo1* (286-fold) which correlates with its resistance condition despite the increment in *ct14* (260-fold) and *duox* (37.8-fold). Then, to assess the impact of 5mC on the susceptibility condition, the methylation pattern was altered in the White phenotype with azacytidine 3 days before the ookinete challenge. A strong correlation was found between a lower

quantity of oocysts and a higher concentration of azacytidine (Figure 4C). The effect bottomed at 50 μ M of azacytidine showing no further decrease in oocyst infection. We then asked if the gDNA methylation status differences between the two phenotypes could be related to the differences observed in *P. berghei* susceptibility. By inhibiting methylation before mosquito exposure to the parasite, a lower prevalence and intensity of infection was exhibited by both the White and

Brown mosquitoes (Figure S6), resulting in the elimination of the differences between the two phenotypes. These data show that DNA methylation is dynamic in response to an immune challenge with the parasite; this challenge induces a substantial increase in the 5mC mark and a significant up-regulation of *dnmt2* coupled with a down-regulation of *tet2*. Both these genes have a putative binding sequence of NF- κ B in their promoter region, suggesting that they can be induced as a primary response against the challenge. We showed transcriptional differences between phenotypes that may partially explain the susceptibility differences to *Plasmodium*. Furthermore, the rescue of the susceptible phenotype by pharmacological erasure of methylome supports this.

Inhibition of DNA Methylation Bring *A. albimanus* Mosquitoes Into a Resistance Condition Against *Plasmodium*

Subsequently, we examined the impact of the methylation inhibitors on the transcription of immune genes in challenged mosquitoes. We treated the mosquitoes with azacytidine and then challenged them with ookinetes to evaluate transcriptional response to parasite invasion in a state where the epigenetic mark was globally eliminated (Figure 5A). The epigenetically naive state induced by the inhibitor led both phenotypes to respond similarly to the parasite challenge by producing *dnmt2*, *lrin1*, and *tep*, thus abolishing most of the differences between phenotypes (Figure 5B; A+Pb). TEP1 and LRIM1 are considered the main factors controlling parasite loads in mosquitoes. Their function is similar to the complement system in mammals promoting parasite lysis and melanization (41, 42, 44). In both *Plasmodium*-challenged phenotypes, methylation inhibition increased *tep* transcription (Figure 5B; Pb vs. A+Pb). The increase in *lrin1* transcription, however, was greater in White mosquitoes to that observed in Brown mosquitoes.

On the other hand, the transcription of the infection agonist *ctt4* diminished in both challenged phenotypes when treated with azacytidine. Furthermore, some transcriptional differences persisted; in particular, *ppo1* was also expressed in the White phenotype, while *ctt4* and *ctt6* were only expressed in the Brown phenotype (Figure 5B; A+Pb). The fact that the inhibitors reduced the demethylase *tet2* transcription to undetectable levels, probably contributes to the preservation of the 5mC incipiently placed in response to the parasite challenge. An explanation for these observations is that the epigenetic inheritance of the phenotypes was erased with the inhibitory treatments, so when the mosquitoes encounter the parasite, they started by producing what is probably relevant against the infection. In summary, the response involved the activation of the DNA methylation system, the increment of the 5mC mark, the transcription of anti-*Plasmodium* effectors, and higher resistance to the parasite (Figure 5C). This effect was more noticeable with decitabine, especially in the White mosquitoes.

The transit of the malaria parasite through the mosquito midgut results in a bottleneck that often reduces the parasite population to a single-digit number (38). Hence, transmission-blocking interventions (TBIs) ought to be more effective

at this stage of infection. Treatment of mosquitoes with the azanucleosides herein constituted an efficient TBI, with effectiveness ranging between 70 and 96% (Figure 5D), suggesting that DNA methylation could modulate the vector competence.

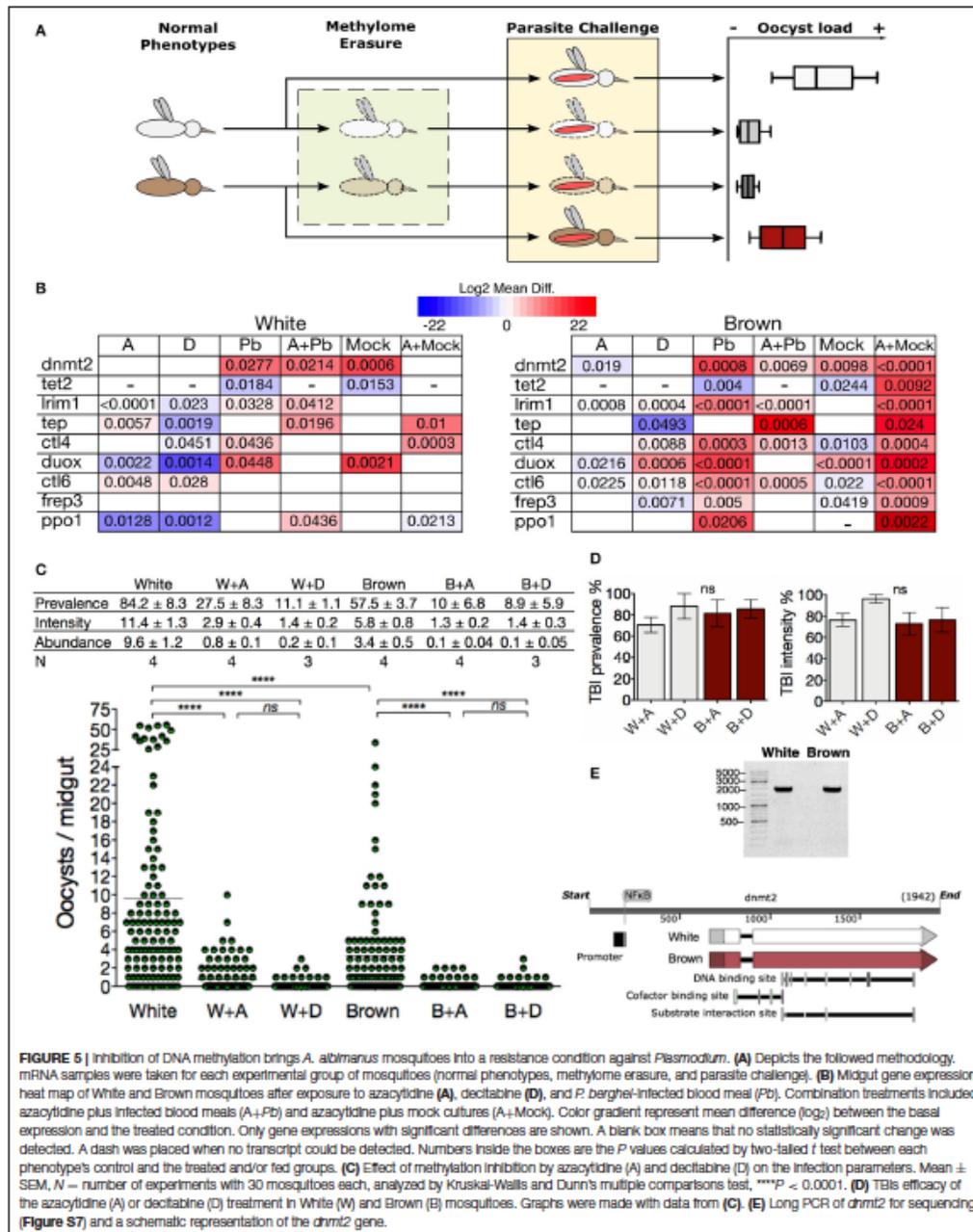
The *dnmt2* gene was sequenced in an attempt to elucidate the reasons for the observed differences in methylation, but both phenotypes showed identical gene sequences (Figure 5E and Figure S7). The distinct response to methylation inhibition by the azanucleosides between White and Brown mosquitoes, suggests that DNA methylation signaling is divergent in the two phenotypes. Despite this, downstream effects were the same, leveling 5mC and parasite loads between the phenotypes.

DISCUSSION

This study shows that DNA methylation has an essential role in *A. albimanus* biology. Larvae in which the methylation has been inhibited were unable to grow, and their development was hampered, resulting in early death. This result revealed that in *A. albimanus*, the DNA methylation mechanism is functional and works similarly as in other better-studied insects. In adult mosquitoes, the inhibition of DNA methylation did cause neither death nor other apparent effects besides the modifications in the transcriptional responses. This inhibition translated into both phenotypes becoming considerably more capable of controlling infection loads; however, the mechanism(s) by which the parasite is eliminated are not fully understood. Possible candidates are LRIM1 and TEP1, since both of these transcripts were up-regulated similarly between the phenotypes (Figure 5A).

Interestingly, the azacytidine treatment prevented the transcription of *duox* after a parasite challenge in the two phenotypes. Besides its antimicrobial activity through hydrogen peroxide production, DUOX is associated with mechanisms that reduce damage to the host's microbiota after a blood meal by lowering the intensity of the immune response (47). It has been shown that the silencing of DUOX promotes effective immune responses that include the increment of TEP1, leading to lower infection loads (48). In the particular case of *A. albimanus*, phenoloxidase activity (and *ppo1* gene transcription) is not likely to be related to parasite death. Despite the increment of *ppo1* upon infection in Brown mosquitoes, when the mosquitoes were treated with azacytidine and then challenged, *ppo1* only increased in the White mosquitoes and yet both phenotypes effectively reduced the infection load. The fact that we do not observe parasite remainders or melanization suggests that the parasite is being eliminated by lysis.

The methylation inhibitors removed higher amounts of 5mC in Brown compared to White, though without reaching a total removal of the epigenetic mark. Decitabine or azacytidine act when they are incorporated into DNA (and RNA for azacytidine) during replication, DNA repair, transcription, or demethylation events that involve nucleotide replacement. Then, the DNMT2 interacts with these cytidine analogs and gets irreversibly covalently bonded to the inhibitor during the catalytic reaction. This observation implies that the inhibitors can



only inhibit methylation in places where they are incorporated and where the DNMT2 can access them (49), correlating with the higher transcriptional activity of Brown, in which more mark was eliminated. Whereas, in White, with lower transcriptional activity, less 5mC was eliminated. The inaccessibility of certain low activity-genomic regions to the inhibitors or the DNMT2 may also explain why in both phenotypes the 5mC inhibition reached similar levels without lowering any further.

In general, DNA methylation is considered to have gene repression functionalities, primarily when it is located in the promoter regions. However, when located within the gene body it seems to be associated with gene expression (57). In insects DNA methylation is almost exclusively present in gene bodies (3), which explain why the Brown phenotype, with two times more 5mC content, has an overall higher transcription than the White phenotype. After feeding with or without ookinete-containing blood, DNA methylation increases in both phenotypes, although slightly more in the Brown phenotype (Figure 4A). This result correlates with the higher transcription of *dnmt2*, and lower transcription of *tet2*. Furthermore, this is in line with the higher transcription of anti-*Plasmodium* genes observed after feeding. The reduction of 5mC after the treatment with the methylation inhibitors lowered the transcription of the immune genes in both phenotypes (Figure 5A). By looking at Figure 5B it can be concluded that the inhibitor treatment lowered the overall transcription but increased the transcription of *Irim1* and *tep*, causing the mosquitoes to respond less intensely but with higher specificity. Despite the above, some transcriptional differences persisted in the phenotypes after the inhibitor treatments which led us to consider as a first possibility the genetic differences. We searched for differences in the *dnmt2* gene; however, it resulted in being identical in both phenotypes after sequencing. A second possibility could rely on the NF- κ B family, since all of the genes evaluated in this study have putative binding sites for this family of transcription factors, including *dnmt2* and *tet2*. The exception being *frep3*, which does not have a putative binding site and did not show significant transcriptional changes, at least in White (Table S1). A third possibility is the regulation of other epigenetic mechanisms. It is known that, in many organisms, gene regulation by DNA methylation depends on the context of the surrounding genes (8, 58, 59) and more critical in the context of other epigenetic marks, like histone acetylation and nucleosomal organization (58, 60–62). In this context, the epigenetic state as a whole is a combination of epigenetic modifications. There is a close association between DNA methylation and the modifications in histones (58, 63), in particular, the deacetylation. The methyl CpG binding protein 2 (MeCP2) and other MBD proteins recruit histone deacetylases, which create a dominant repressive chromatin environment in response to changes in the DNA methylation status (64). Considering the lack of knowledge and the complexity of the epigenetic systems, a straightforward relationship between DNA methylation and a particular transcriptional response is not to be forcefully expected, even more knowing that the different epigenetic mechanisms are intertwined. In this regard, the genome of *A. albimanus* has several genes of histone deacetylases

among other epigenetic elements that should be taken into account (Table S2).

This report shows a general view of the role of the DNA methylation system in mosquitoes and adds extra information in the changes in vector competence within a mosquito species. Potential directions for future work are the location of 5mC within the different regions that comprise a gene, the regulation of the epigenetic mark by *tet2* and *mbd*, and the connection between the *dnmt2* and the one-carbon metabolism that provides methyl groups for all methylation reactions. Signaling pathways of DNA methylation and epigenetic chromatin circuits are essential aspects that need clarification to have a more comprehensive understanding of this phenomenon. Also, considering possible interactions with other epigenetic mechanisms could clear the view about the epigenetic regulation of immunity, mainly because it is not yet clear how *A. albimanus* gets rid of the malaria parasite.

In this work, we used the interaction of *A. albimanus* and *P. berghei* as a study model to characterize the phenotypic properties of susceptible and resistance phenotypes, making the first analysis of the relationship between DNA methylation, the expression of immune genes, and the susceptible-resistant state of the mosquitoes. We found that the expression profile of anti-*Plasmodium* responsive genes in the midgut is modulated by DNA methylation. This modulation is different between the phenotypes and, regardless of this, the outcome in terms of parasite elimination is the same in both phenotypes upon the erasure of the epigenetic mark, resulting in the elimination of the differences between phenotypes. We found that the 5mC is required for proper larval development but is not necessary for adult survival. In the adult, however, we found that the transcription of *dnmt2* and *tet2* is regulated through feeding and parasite challenges, resulting in an increase of the 5mC mark in the genome. These results render the methylation system in this mosquito as a responsive element to environmental cues, which is further supported by the presence of NF- κ B putative binding sites in the promoter regions of these genes.

We have focused on the role of *dnmt2*, the methylation agent, as the factor regulating immunity; however aspects like epigenetic-by-genetic and gene-by-environment interactions are important components to vector competence that should be considered and understood. Here we have unveiled the participation of the methylation system in the malaria mosquito infection, creating new paths to interrupt the transmission of what is the most devastating vector-borne disease.

MATERIALS AND METHODS

Bioinformatics Identification of the Methylation System Genes

The genes involved in the methylation system were identified in the *A. albimanus* genome databank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/11556>) and in the vector database (<https://www.vectorbase.org/>) using the genes of the methylation system of *Drosophila*, *Mus musculus* and human as the entry query. Sequence analysis and protein domain determination were

performed using InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>). Promoter analysis was made in (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html) and the prediction of transcription binding sites was obtained in the program AliBaba2 at (<http://gene-regulation.com>).

Anopheles albimanus Breeding Conditions and Phenotype Selection

The parental *A. albimanus* Tapachula strain and the derived Brown and White phenotypes were reared as described (65). The insectary was maintained at 28–30°C and 70–80% relative humidity, on a 12 h photoperiod. Larvae were kept at a density of 200 individuals per tray with 2 cm deep tap water and fed twice a day with dry ground cat food. The White and Brown phenotypes were selected and separated at the pupal stage based on the presence or absence of a white stripe in the dorsal side. Intermediate phenotypes having a blurry white stripe or green body color were discarded. The phenotypes were kept separated for 20 generations during the course of the experiments. Reoccurring phenotypes were systematically depurated each generation.

For determining the developmental stage of the larvae, the moltings were traced by the presence of exuviae, and confirmed by comparing the exuvial head capsules size to the larval head size. Measurements were made in a stereoscopic microscope with an ocular micrometer. Adult mosquitoes were maintained under the aforementioned insectary conditions at a density of 200 mosquitoes per 5 liter container. Feeding was carried out *ad libitum* with 8% w/v sucrose in ddH₂O, delivered on sterile cotton pads and changed every 24 h. For breeding, mosquitoes were fed rabbit blood at 37°C through a feeding membrane. Oviposition cups were provided 48 h after feeding. The eggs were collected after 24 h and allowed to hatch before transferring to the plastic trays.

Ookinete Culture and Mosquito Infections

Plasmodium berghei ANKA strain (kindly donated by Dr. R. Sinden, Imperial College London), constitutively expressing the green fluorescent protein, was used throughout the experiments. Ookinetes were cultured as described (66). Briefly, male BALB/c mice from 6 to 8 weeks of age were intraperitoneally treated with phenylhydrazine (6 mg/ml in 0.8% saline) 2 days before the inoculation of $2-4 \times 10^8$ parasites via the same route. When the parasitemia reached 15–25%, and after verifying gametocyte viability, the infected blood was extracted by cardiac puncture with a heparinized syringe from the CO₂ euthanized mice. To allow for ookinete formation, the blood was then incubated at 19–20°C for 20–24 h in ookinete medium (1:4, blood:medium), which consists of RPMI-1640 at pH 8.3 supplemented with 23.81 mM sodium bicarbonate, 0.37 mM hypoxanthine, 25 mM HEPES, PSN (0.05 mg/ml penicillin, 0.05 mg/ml streptomycin and 0.1 mg/ml neomycin; Gibco) and 20% heat inactivated fetal bovine serum (FBS).

Mosquitoes were infected with ookinetes by the standard membrane alimentation methodology. Only cultures containing >7 exflagellation centers per 400X field of view were used. The ookinetes were counted in a Neubauer chamber and the

culture was centrifuged at 2,000 rpm for 5 min. The ookinete pellet was resuspended to a final concentration of 400 ookinetes per microliter of FBS for the feedings. As control, mock cultures were prepared with the blood from non-infected mice. Mosquitoes of 5 days post-emergence (dpe) were starved for 6 h and allowed to feed for 30–60 min from the membrane glass feeder heated at 37°C. Only fully engorged females were kept for further experimentation at 19–20°C and 70–80% relative humidity, on a 12 h photoperiod. Infected and mock-infected mosquitoes fed on cotton pads moistened with 8% sucrose solution with 0.05% PABA. Appraisal of the infection was measured 3 days post infection (dpi) by dissecting in PBS the midguts of 30 cold anesthetized females and observing the GFP-expressing oocysts by fluorescence microscopy. The mosquitoes were used for the assays only if the infection prevalence was 80% or higher in the susceptible-White phenotype control group.

Transmission blocking efficiency was calculated as in (67).

Nucleic Acids Methylation Inhibition Assays

For inhibiting the methylation of nucleic acids, the DNA/RNA methylation inhibitor azacytidine (5-azacytidine), and the DNA exclusive methylation inhibitor decitabine (5-Aza-2'-deoxycytidine; both purchased from Sigma-Aldrich) were used. Larvae and mosquitoes were maintained under experimental conditions optimal for *P. berghei* (see above). To evaluate the impact of nucleic acid methylation during development, 100 larvae of 1 h post hatching were treated with 50 μM azacytidine in 6 well-culture plates. To avoid compound accumulation, the treatment was replenished every 48 h by moving the larvae to an adjacent well-containing fresh treatment. Every 24 h larval survival was monitored and growth was measured taking the cephalic-caudal length. Developmental stages were assessed by collection of exuviae and dead larvae were removed.

Methylation inhibition in adults started at 2 dpe by *ad libitum* feeding on cotton pads moistened with 50 μM of azacytidine or decitabine in a solution of 8% sucrose, 0.05% PABA and PSN. The treatments lasted 72 h, replacing the cotton pads every 24 h. In the case of assays requiring infected mosquitoes, these were infected after the inhibition treatments were concluded. Dissection of midguts destined for RNA or DNA extractions, was carried out at 5 dpe (after 72 h of treatment with inhibitors) and also at 6 dpe (24 h post infection). Midguts were dissected as described above, thoroughly washed and stored at –20°C. For infected mosquitoes, the midguts were used for RNA or DNA extraction only if the infection was confirmed at 3 dpi.

Effect of Azacytidine on *P. berghei* Survival and Development

To determine whether azacytidine affects parasite survival or development, the ookinetes were purified and then cultured in the presence of 50 μM azacytidine. Mock treated (PBS) and 1 mM H₂O₂ were used as controls. The ookinetes were cultured to allow

oocyst formation at 19–20°C in oocyst medium consisting of Schneider's insect medium at pH 6.8 supplemented with 23.8 mM sodium bicarbonate, 3.68 mM hypoxanthine, PSN, 44 µM PABA, 0.2% lipids/cholesterol (Gibco) and 15% FBS (68). Parasite survival and development were determined with fluorescence microscopy at 0, 12, 36 and 72 h of culture.

gDNA and RNA Extraction

For gDNA extraction, the midguts of 30 mosquitoes per treatment were dissected and incubated overnight at 55°C in lysis solution and treated with proteinase K and RNase A. RNA was extracted from 30 midguts per sample by employing the TRIzol (Thermo Fisher Scientific) protocol. DNA and RNA samples were stored at –20°C until further use. For cDNA synthesis, RNA extracts (1 µg) were treated with DNase I and 500 ng/µl of OligodT were added. After 10 min at 70°C, the master mix (1 mM dNTPs, 0.01 mM DTT, 20 units of RNase inhibitor and reverse transcriptase buffer) and 200 U/µl M-MLVRT were added.

PCRs

dnmt2, *tet2*, and *s7* genes were amplified using 10 ng cDNA, 0.5 µM for each primer (Table S3), 1 µM dNTPs, 3.25 mM MgCl₂, 1X DreamTaq Green buffer (with 2 mM MgCl₂) and 1.25 U DreamTaq Green DNA pol (Thermo Fisher Scientific). *dnmt2* long PCR, including the 5' and 3' UTR and promoter regions, was amplified from midgut DNA. The reaction mix contained 100 ng of gDNA, 0.5 µM of each primer (Table S4), 1 µM dNTPs, 2.5 mM MgCl₂, Long PCR 1X buffer (with 1.5 mM MgCl₂) and 2 U of Long PCR enzyme (Thermo Fisher Scientific). PCR reactions were carried out in a T100™ (BIO-RAD) thermocycler and visualized on agarose gel electrophoresis. The PCR band was purified with the GeneJET Gel Extraction kit (Thermo Fisher Scientific). The PCR product was sequenced at the Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN of the Instituto de Biotecnología-UNAM.

RT-qPCR

dnmt2, *tet2*, *ctf4*, *ctf6*, *lrim1*, *tep*, *duox*, *ppo1*, *frp3*, and *s7* genes were amplified as following: a mixture of 5 ng cDNA, 0.25 µM oligo (Table S3) and Master Mix SYBR Green 1X was loaded on 96 well-plates on a ViiA™ 7, Applied Biosystems thermocycler. Amplification efficiency was determined with LinRegPCR. Data were normalized to *S7* gene amplification.

gDNA Digestion Sensitive to Methylation

Midgut gDNA (1 µg) was digested with 1 unit of *HpaII* (Thermo Fisher Scientific) in 1X Fast Digest buffer for 1 h at 37°C. gDNA digestion products were visualized on agarose gel electrophoresis.

Dot Blot

Midgut gDNA of 5 dpe female mosquitoes was spotted on a nitrocellulose membrane (Hybond® ECL™), dried and fixed with UV light. An anti-5^mC antibody (Zymo research, A3001-200) was used in conjunction with αPRP (1:1,000, GERPN2108-ECL™ Western Blotting Analysis System). Fluorescence was developed on a KODAK BioMaxLight film. The films were

scanned and a densitometric analysis was performed using ImageJ to calculate the mean pixel intensity of the dots.

High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Methylation groups in DNA and RNA were quantified by HPLC by the following methodology (69). Briefly, gDNA was digested with DNase I, S1 nuclease and treated with alkaline phosphatase. For RNA digestion, RNase H and P1 nuclease were used following the same methodology as for gDNA. The nucleosides were derivatized with bromoacetylphenone. HPLC analysis was performed on an Agilent Series 1100 utilizing an Agilent Sorbax C18 (250 × 4.6 mm, 5 µm) column and a Supelco pre-column. Derivatized nucleosides were fluorometrically detected at excitation/emission wave lengths of 306/378 nm.

PO Activity

PO activity was measured as described (70). Pools of 30 mosquitoes were macerated and centrifuged at 10,000 g for 10 min at 4°C. PPO was activated with isopropanol to quantify the total enzyme. PO was inhibited with phenylthiourea and PBS was used to measure basal enzyme activity. L-DOPA was used as the substrate for PO, which is transformed into the dye dopachrome. Auto-oxidation controls (L-DOPA only) and blanks (macerated mosquitoes) were included. PO activity was measured every minute for 30 min at 490 nm in a microplate reader (ELISA iMark, BIO-RAD).

NO Quantification

Nitrites and nitrates were evaluated by the Griess assay (71). Pools of 30 mosquitoes per treatment were macerated and centrifuged twice at 10,000 g for 10 min at 4°C. Proteins were eliminated with ZnSO₄. Nitrates were reduced into nitrites using VCl₃ immediately followed by the addition of sulfanilamide and NED. The reaction was incubated for 15 min at RT and the absorbance was measured at 490 and 630 nm in a microplate reader.

Statistical Analysis

Data was analyzed in Prism 6 statistical software. The sample size for mosquito infections and nucleic acids extraction was determined according to Churcher et al. (67). Data were tested for normality by the D'Agostino and Pearson omnibus normality test. Survival of larvae, adults and parasites was analyzed using Mantel-Cox test (Log-rank test). Larval growth was analyzed with Kruskal-Wallis and Dunns multiple comparisons test. The infection parameters were analyzed through Mann-Whitney or Kruskal-Wallis and Dunn's multiple comparisons test. PCR, HPLC, PO, NO and TBIs results were analyzed by conducting a two-tailed *t* test or ANOVA followed by a Tukey's multiple comparison test.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this manuscript will be made available by the authors, without undue reservation, to any qualified researcher.

ETHICS STATEMENT

The Ethics, Biosafety, and Research Committees of our institution evaluated and approved this project. The handling of animals and the experimentation with mice and mosquitoes was carried out adhering to the criteria of the aforementioned committees.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

FC-P conceived the project, designed and performed most of the experiments, analyzed the data and wrote the original draft. JH-T assisted in experimentation and data collection. BR-T produced the parasites. GH-S performed the HPLC experiments. HL-M supervised the project and contributed in experiment design. BR-T, RC, and FC-P interpreted the data and wrote the final version of the manuscript.

REFERENCES

- Sarda S, Zeng J, Hunt BG, Yi SV. The evolution of invertebrate gene body methylation. *Mol Biol Evol.* (2012) 29:1907–16. doi: 10.1093/molbev/ms062
- Glastad KM, Hunt BG, Goodisman MA. Evolutionary insights into DNA methylation in insects. *Curr Opin Insect Sci.* (2014) 1:25–30. doi: 10.1016/j.cois.2014.04.001
- Zilberman D. An evolutionary case for functional gene body methylation in plants and animals. *Genome Biol.* (2017) 18:87. doi: 10.1186/s13059-017-1230-2
- Feng S, Cokus SJ, Zhang X, Chen P-Y, Bostick M, Goll MG, et al. Conservation and divergence of methylation patterning in plants and animals. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2010) 107:8689–94. doi: 10.1073/pnas.1002720107
- Allis CD, Jenuwein T. The molecular hallmarks of epigenetic control. *Nat Rev Genet.* (2016) 17:487–500. doi: 10.1038/nrg.2016.59
- Jeltsch A. Beyond Watson and Crick: DNA methylation and molecular enzymology of DNA methyltransferases. *Chem Inform.* (2002) 33:274–93. doi: 10.1002/chin.200222292
- Jurkowski TP, Jeltsch A. On the evolutionary origin of eukaryotic DNA methyltransferases and Dnmt2. *PLoS ONE.* (2011) 6:e28104. doi: 10.1371/journal.pone.0028104
- Jones PA. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet.* (2012) 13:484–92. doi: 10.1038/nrg3230
- Lyko F, Maleszka R. Insects as innovative models for functional studies of DNA methylation. *Trends Genet.* (2011) 27:127–131. doi: 10.1016/j.tig.2011.01.003
- Ashapkin VV, Kutueva LI, Vanyushin BF. Dnmt2 is the most evolutionary conserved and enigmatic cytosine DNA Methyltransferase in eukaryotes. *Genetika.* (2016) 52:269–82. doi: 10.1134/S1022795416030029
- Jeltsch A, Nellen W, Lyko F. Two substrates are better than one: dual specificities for Dnmt2 methyltransferases. *Trends Biochem Sci.* (2006) 31:306–8. doi: 10.1016/j.tibs.2006.04.005
- Glastad KM, Hunt BG, Yi SV, Goodisman MA. DNA methylation in insects: on the brink of the epigenomic era. *Insect Mol Biol.* (2011) 20:553–65. doi: 10.1111/j.1365-2583.2011.01092.x
- Severin PMD, Zou X, Gaub HE, Schulten K. Cytosine methylation alters DNA mechanical properties. *Nucleic Acids Res.* (2011) 39:8740–51. doi: 10.1093/nar/gkr578

FUNDING

This work was possible thanks to the grant (No. 228628) given by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) to FC-P, who is a doctoral student from the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas-UNAM.

ACKNOWLEDGMENTS

We gratefully acknowledge the technical assistance of G. Peralez-Ortiz and A. Lopez-Torres, the help of P. Munguia-Vega in parasite culture, L. Salgado-Albarrán for mosquito rearing and Allan Larsen for editorial assistance.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.03025/full#supplementary-material>

- Schmitz RJ, Lewis ZA, Goll MG. DNA methylation: shared and divergent features across eukaryotes. *Trends Genet.* (2019) 35:818–27. doi: 10.1016/j.tig.2019.07.007
- Schübeler D. Function and information content of DNA methylation. *Nature.* (2015) 517:321–6. doi: 10.1038/nature14192
- Kohli RM, Zhang Y. TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. *Nature.* (2013) 502:472–9. doi: 10.1038/nature12750
- Wu X, Zhang Y. TET-mediated active DNA demethylation: mechanism, function and beyond. *Nat Rev Genet.* (2017) 18:517–34. doi: 10.1038/nrg.2017.33
- Gowher H, Leisemann O, Jeltsch A. DNA of *Drosophila melanogaster* contains 5-methylcytosine. *EMBO J.* (2000) 19:6918–23. doi: 10.1093/emboj/19.24.6918
- Lyko F, Ramsahoye BH, Jaenisch R. DNA methylation in *Drosophila melanogaster*. *Nature.* (2000) 408:538–40. doi: 10.1038/35046205
- Phalke S, Nickel O, Walluscheck D, Hortic F, Onorati MC, Reuter G. Retrotransposon silencing and telomere integrity in somatic cells of *Drosophila* depends on the cytosine-5 methyltransferase DNMT2. *Nat Genet.* (2009) 41:696–702. doi: 10.1038/ng.360
- Lin MJ, Tang LY, Reddy MN, Shen CKJ. DNA methyltransferase gene dDnmt2 and longevity of *Drosophila*. *J Biol Chem.* (2005) 280:861–4. doi: 10.1074/jbc.C400477200
- Regev A, Lamb MJ, Jablonka E. The role of DNA methylation in invertebrates: developmental regulation/rror genome defense? *Mol Biol Evol.* (1998) 15:880–91. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a025992
- Bewick AJ, Vogel KJ, Moore AJ, Schmitz RJ. Evolution of DNA Methylation across Insects. *MolBiolEvol.* (2016) 34:654–65. doi: 10.1093/molbev/msw264
- Dardevic Z, Hanna K, Gold B, Pollex T, Cherry S, Lyko F, et al. Efficient RNA virus control in *Drosophila* requires the RNA methyltransferase Dnmt2. *EMBO Rep.* (2013) 14:269–75. doi: 10.1038/embor.2013.3
- Schaefer M, Pollex T, Hanna K, Tuorto F, Meusburger M, Helm M, et al. RNA methylation by Dnmt2 protects transfer RNAs against stress-induced cleavage. *Genes Dev.* (2014) 24:1590–5. doi: 10.1101/gad.586710
- Flores K, Wolschin F, Corneveaux JJ, Allen AN, Huentelman MJ, Amdam GV. Genome-wide association between DNA methylation and alternative splicing in an invertebrate. *BMC Genom.* (2012) 13:480. doi: 10.1186/1471-2164-13-480
- Zeng J, Yi SV. DNA methylation and genome evolution in honeybee: gene length, expression, functional enrichment covary with the evolutionary signature of DNA methylation. *Genome Biol Evol.* (2010) 2:770–80. doi: 10.1093/gbe/evq060

28. Snell-Rood EC, Troth A, Moczek AP. DNA Methylation as a mechanism of nutritional plasticity: limited support from horned beetles. *J Exp Zool Part B Mol Dev Evol*. (2013) 320:22–34. doi: 10.1002/jex.b.22479
29. Vilcinškas A. The role of epigenetics in host-parasite coevolution: lessons from the model host insects *Galleria mellonella* and *Tribolium castaneum*. *Zoology*. (2016) 119:273–80. doi: 10.1016/j.zool.2016.05.004
30. Maleszka R. Epigenetic code and insect behavioural plasticity. *Curr Opin Insect Sci*. (2016) 15:45–52. doi: 10.1016/j.cois.2016.03.003
31. Adams RLP, McKay EL, Craig LM, Burdon RH. Methylation of mosquito DNA. *BBA Sect Nucleic Acids Protein Synth*. (1979) 563:72–81. doi: 10.1016/0005-2787(79)90008-X
32. Bianchi NO, Vidal-Rioja I, Cleaver JE. Direct visualization of the sites of DNA methylation in human, and mosquito chromosomes. *Chromosoma*. (1986) 94:362–6. doi: 10.1007/BF00328636
33. Marhold J, Rothe N, Pauli A, Mund C, Kuehle K, Brueckner B, et al. Conservation of DNA methylation in dipteran insects. *Insect Mol Biol*. (2004) 13:117–23. doi: 10.1111/j.0962-1075.2004.00466.x
34. Ye YH, Woolfit M, Huttley GA, Rancès E, Caragata EP, Popovici J, et al. Infection with a virulent strain of *Wolbachia* disrupts genome wide-patterns of cytosine methylation in the mosquito *Aedes aegypti*. *PLoS ONE*. (2013) 8:e66482. doi: 10.1371/journal.pone.0066482
35. Falkenhayn C, Carneiro VC, de Mendonça Amarante A, Schmid K, Hanna K, Kang S, et al. Comprehensive DNA methylation analysis of the *Aedes aegypti* genome. *Sci Rep*. (2016) 6:36444. doi: 10.1038/srep36444
36. Martínez-Barnetche J, Gómez-Barreto RE, Ovilla-Muñoz M, Téllez-Sosa J, López García DE, Dinglasan RR, et al. Transcriptome of the adult female malaria mosquito vector *Anopheles albimanus*. *BMC Genom*. (2012) 13:59. doi: 10.1186/1471-2164-13-207
37. Conn JE, Quiñones MI, Póvoa MM. *Phylogeography, Vectors and Transmission in Latin America*, Manguin Rijeka S, editor. Croatia (2016). doi: 10.5772/55217
38. Angrisano E, Tan Y-H, Sturm A, McFadden GI, Baum J. Malaria parasite colonisation of the mosquito midgut—placing the *Plasmodium* ookinete centre stage. *Int J Parasitol*. (2012) 42:519–27. doi: 10.1016/j.ijpara.2012.02.004
39. Phillips MA, Burrows JN, Manyando C, van Huijsduijnen RH, Van Voorhis WC, Wells TN. Malaria. *Nat Rev Dis Prim*. (2017) 3:1–24. doi: 10.1038/nrdp.2017.50
40. Christophides GK, Zdobnov E, Barillas-Mury C, Birney E, Blandin S, Blass C, et al. Immunity-related genes and gene families in *Anopheles gambiae*. *Science*. (2002) 298:159–65. doi: 10.1126/science.1077136
41. Osta MA, Christophides GK, Kafatos FC. Effects of mosquito genes on plasmodium development. *Science*. (2004) 303:2030–2. doi: 10.1126/science.1091789
42. Blandin S, Shiao S-H, Moita LE, Janse CJ, Waters AR, Kafatos FC, et al. Complement-like protein TEP1 is a determinant of vectorial capacity in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Cell*. (2004) 116:661–70. doi: 10.1016/S0092-8674(04)00173-4
43. Sinden RE, Alavi Y, Raine JD. Mosquito-malaria interactions: a reappraisal of the concepts of susceptibility and refractoriness. *Insect Biochem Mol Biol*. (2004) 34:625–9. doi: 10.1016/j.ibmb.2004.03.015
44. Fraiture M, Baxter RHG, Steinert S, Chelliah Y, Fiolet C, Quispe-Tintaya W, et al. Two mosquito LRR proteins function as complement control factors in the TEP1-mediated killing of plasmodium. *Cell Host Microbe*. (2009) 5:273–84. doi: 10.1016/j.chom.2009.01.005
45. Chan A, Rodríguez MH, Torres JA, Rodríguez M del C, Villarreal C. Susceptibility of three laboratory strain of *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae) to coindigenous *Plasmodium vivax* in Southern Mexico. *Entomol Soc Am*. (1994) 31:400–3. doi: 10.1093/jmedent/31.3.400
46. Luo C, Hajkova P, Ecker JR. Dynamic DNA methylation: In the right place at the right time. *Science*. (2018) 361:1336–40. doi: 10.1126/science.aaf806
47. Kumar S, Molina-Cruz A, Gupta L, Rodrigues J, Barillas-Mury C. A peroxidase/dual oxidase system modulates midgut epithelial immunity in *Anopheles gambiae*. *Science*. (2010) 327:1644–49. doi: 10.1126/science.1184008
48. Kakani P, Kajla M, Choudhury TP, Gupta L, Kumar S. *Anopheles stephensi* dual oxidase silencing activates the thioester-containing protein 1 pathway to suppress plasmodium development. *J Invertebr Immunol*. (2019) 127021:1–10. doi: 10.1159/000497417
49. Strememann C, Lyko F. Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacytidine and decitabine. *Int J Cancer*. (2008) 123:8–13. doi: 10.1002/ijc.23607
50. Anreiter I, Kramer JM, Sokolowski MB. Epigenetic mechanisms modulate differences in *Drosophila* foraging behavior. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2019) 116:8630–1. doi: 10.1073/pnas.1905223116
51. Triad L, Lusser A. The dynamic RNA modification 5-methylcytosine and its emerging role as an epitranscriptomic mark. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. (2018) 10:e1510. doi: 10.1002/wrna.1510
52. Cridge A, Harrop T, Lovegrove M, Remnant E, Dearden P. "Chapter Two - Nutrition and Epigenetic Change in Insects: Evidence and Implications," in: Verlinden H, editor. *Insect Epigenetics*. London: Academic Press (2017). p. 31–54. doi: 10.1016/bs.aip.2017.06.001
53. Vilcinškas A. "Chapter Six - The Impact of Parasites on Host Insect Epigenetics," in: Verlinden H, editor. *Insect Epigenetics*. London: Academic Press (2017). p. 145–65. doi: 10.1016/bs.aip.2017.05.001
54. Cavalli G, Heard E. Advances in epigenetics link genetics to the environment and disease. *Nature*. (2019) 571:489–99. doi: 10.1038/s41586-019-1411-0
55. Zakovic S, Levashina EA. NF- κ B-like signaling pathway REL2 in immune defenses of the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Front Cell Infect Microbiol*. (2017) 7:258. doi: 10.3389/fcimb.2017.00258
56. Le BV, Williams M, Logarajah S, Baxter RHG. Molecular basis for genetic resistance of *Anopheles gambiae* to plasmodium: structural analysis of TEP1 susceptible and resistant alleles. *PLoS Pathog*. (2012) 8:e1002958. doi: 10.1371/journal.ppat.1002958
57. Hunt BG, Glstad KM, Yi SV, Goodisman MAD. The function of intragenic DNA methylation: insights from insect epigenomes. *Integr Comp Biol*. (2013) 53:319–28. doi: 10.1093/icc/ibc003
58. Hunt BG, Glstad KM, Yi SV, Goodisman MAD. Patterning and regulatory associations of DNA methylation are mirrored by histone modifications in insects. *Genome Biol Evol*. (2013) 5:591–8. doi: 10.1093/gbe/evt030
59. Ambrosi C, Manzo M, Baubec T. Dynamics and context-dependent roles of DNA methylation. *J Mol Biol*. (2017) 429:1459–75. doi: 10.1016/j.jmb.2017.02.008
60. Ruiz JL, Yerbanga RS, Lefèvre T, Ouedraogo JB, Corces VG, Gómez-Díaz E. Chromatin changes in *Anopheles gambiae* induced by *Plasmodium falciparum* infection 06 biological sciences 0604 Genetics 11 medical and health sciences 1108 medical microbiology. *Epigenet Chromatin*. (2019) 12:1–18. doi: 10.1186/s13072-018-0250-9
61. Jenkins AM, Muskavitch MAT. Evolution of an epigenetic gene ensemble within the genus *Anopheles*. *Genome Biol Evol*. (2015) 7:901–15. doi: 10.1093/gbe/evv041
62. Coleman-Derr D, Zilberman D. Deposition of histone variant H2A.Z within gene bodies regulates responsive genes. *PLoS Genet*. (2012) 8:e1002988. doi: 10.1371/journal.pgen.1002988
63. Cho Y, Griswold A, Campbell C, Min KT. Individual histone deacetylases in *Drosophila* modulate transcription of distinct genes. *Genomics*. (2005) 86:606–17. doi: 10.1016/j.ygeno.2005.07.007
64. Kass SU, Landsberger N, Wolffe AP. DNA methylation directs a time-dependent repression of transcription initiation. *Curr Biol*. (1997) 7:157–65. doi: 10.1016/S0960-9822(97)70086-1
65. Methods BM, Benedict M. *Methods in Anopheles Research, 4th Edn*. Benedict MQ, editor. MR4. Atlanta (2014).
66. Rodríguez MDC, Margos G, Compton H, Ku M, Lanz H, Rodríguez MH, et al. *Plasmodium berghei*: routine production of pure gametocytes, extracellular gametes, zygotes, and ookinetes. *Exp Parasitol*. (2002) 101:73–6. doi: 10.1016/S0014-4894(02)00035-8
67. Churcher TS, Blagborough AM, Deives M, Ramakrishnan C, Kapulu MC, Williams AR, et al. Measuring the blockade of malaria transmission – an analysis of the standard membrane feeding assay. *Int J Parasitol*. (2012) 42:1037–44. doi: 10.1016/j.ijpara.2012.09.002
68. Al-Olayan EM, Beetsma AI, Butcher GA, Sinden RE, Hurd H. Complete development of mosquito phases of the malaria parasite in vitro. *Science*. (2002) 295:677–9. doi: 10.1126/science.1067159

69. Lopez Torres A, Yanez Barrientos E, Wrobel K, Wrobel K. Selective derivatization of cytosine and methylcytosine moieties with 2-bromoacetophenone for submicrogram DNA methylation analysis by reversed phase HPLC with spectrofluorimetric detection. *Anal Chem.* (2011) 83:7999–8005. doi: 10.1021/ac2020799
70. Li X, Ma M, Liu F, Chen Y, Lu A, Ling QZ, et al. Properties of *Drosophila melanogaster* prophenoloxidases expressed in *Escherichia coli*. *Dev Comp Immunol.* (2012) 36:548–56. doi: 10.1016/j.dci.2011.11.005
71. Miranda KM, Espey MG, Wink DA. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide.* (2001) 5:62–71. doi: 10.1006/niox.2000.0319

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Claudio-Piedras, Recio-Tótoro, Condé, Hernández-Tablas, Hurtado-Sil and Lanz-Mendoza. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.