

**INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA**  
**ESCUELA DE SALUD PÚBLICA DE MÉXICO**

**Efecto de los neuropéptidos allatorreguladores en  
la respuesta inmune del mosquito *Anopheles  
albimanus*.**

**MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA SALUD PÚBLICA**  
**CON AREA DE CONCENTRACIÓN EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS**

**P R E S E N T A**

**Ing. Minerva Sánchez Zavaleta**

**DIRECTOR: Dr. Salvador Hernández Martínez**

**ASESORES: Dr. Humberto Lanz Mendoza**

**Dr. Jorge A. Contreras Garduño**

# Agradecimientos

*Gracias a mis padres Asunción y Moisés: por su cariño, comprensión y apoyo sin condiciones ni medida. Gracias por guiarme sobre el camino de la educación.*

*Agradezco: a mi director de tesis Dr. Salvador Hernández Martínez, por su valiosa ayuda y sabio consejo en la consecución de mi trabajo. La asesoría del Dr. Humberto Lanz Mendoza y del Dr. Jorge A. Contreras Garduño. Al Dr. Mario Henry por su tiempo, experiencia y consejos entregados al desarrollo de mi tesis.*

*Gracias a mis compañeros del laboratorio: a Toñita y Miguel por sus constantes aportes en mi trabajo. Especialmente a Julia, Romelia, Isabel, Idalia y Didier por hacer que cada pedazo de tiempo fuera ameno no voy a olvidar sus consejos, enseñanzas y ayuda.*

*Durante el período de estudios y realización de mi tesis fui becario de CONACyT ( No. beca 12471). Durante la realización del trabajo se contó con el apoyo económico del proyecto SEP-CONACyT de Ciencia Básica No. 83287*

## Resumen

*La malaria continúa siendo un problema de salud pública a nivel mundial, debido a que las estrategias de control que se utilizan no han disminuido la tasa de prevalencia y mortalidad generados. Una nueva estrategia para el control de la malaria es tratar de conferir una respuesta inmune eficiente al mosquito *A. albimanus*. Evidencias preliminares han sugerido que el sistema neuroendocrino produce neuropéptidos que podrían estar involucrados en la regulación de ciertos factores de la respuesta inmune del mosquito. Dichas evidencias mostraron que neuropéptidos allatorreguladores (allatotropina y allatostatina-C), que regulan la biosíntesis de hormona juvenil, podrían jugar un papel pleiotrópico cuando son liberadas en la hemolinfa del mosquito, ya que afectaron directa o indirectamente la actividad de fenoloxidasa y la morfología de los hemocitos, aunado a que sus niveles fueron alterados en presencia de parásitos de malaria. En la presente tesis se investigó si los neuropéptidos allatorreguladores afectan la actividad de algunos de los componentes de la respuesta inmune del mosquito *A. albimanus*. Particularmente, se analizó de manera directa el papel de la allatotropina y allatostatina-C en tres componentes de respuesta inmune humoral: en la actividad de la fenoloxidasa de la hemolinfa; en el nivel de expresión de genes que codifican para péptidos antimicrobianos y las concentraciones de óxido nítrico generados por el intestino; y su efecto en la capacidad fagocítica de una línea celular de *A. albimanus*. Los resultados obtenidos mostraron que los neuropéptidos allatorreguladores no afectan la actividad de la fenoloxidasa, ya que el análisis estadístico no mostró diferencia significativa; sin embargo, en la determinación de los niveles de expresión de genes que codifican para péptidos antimicrobianos si se encontraron diferencias de aproximadamente el doble en los estimulados con los neuropéptidos respecto a los grupos control. Asimismo, los*

*intestinos de mosquitos estimulados con los neuropéptidos incrementaron aproximadamente el doble la producción de Óxido Nítrico con respecto al control. Finalmente, la línea celular de A. albimanus en presencia de estos neuropéptidos presentó actividad fagocítica, lo cual no ocurrió en ausencia de ellos (grupo control). Con estos resultados podemos concluir que la estimulación con los neuropéptidos no afecta a todos los componentes de la respuesta inmune del mosquito humoral estudiados en este trabajo. En el caso de la actividad de la fenoloxidasa el resultado puede deberse a que la actividad de la fenoloxidasa no esta regulada por la presencia de allatotropina o allatostatina-C en la hemolinfa del mosquito. Con respecto a la expresión de genes que codifican para péptidos antimicrobianos, la generación de ON y la capacidad fagocítica, los neuropéptidos allatorreguladores si mostraron un efecto claro, lo cual nos estimula a continuar explorando la relación entre estos dos sistemas a un nivel más detallado, por ejemplo, los receptores y las vías de señalización que son afectadas.*

# Índice

	Página
I. Introducción	
1.1 Malaria .....	5
1.2 Sistema inmune .....	9
1.2.1. Respuesta inmune celular .....	10
1.2.1 Respuesta inmune humoral .....	13
1.3. Sistema neuroendocrino .....	19
1.4. Interacción entre el sistema inmunitario y neuroendocrino .....	21
1.5. Justificación .....	28
II. Hipótesis .....	29
III. Objetivos .....	29
3.1. Objetivos particulares .....	29
IV. Metodología	
4.1. Material biológico .....	30
4.2. Actividad del sistema de la PO .....	32
4.3. Expresión de genes que codifican para péptidos antimicrobianos .....	34
4.4. Producción de Óxido Nítrico .....	37
4.5. Capacidad fagocítica en línea celular .....	39
V. Resultados	
5.1. Efecto de AT y AS-C en la actividad del sistema de la PO .....	40
5.2. Efecto de AT y AS-C en la expresión de genes que codifican para péptidos antimicrobianos .....	42
5.3. Efecto de AT y AS-C en la producción de Óxido Nítrico .....	44
5.4. Efecto de AT y AS-C en la capacidad fagocítica en línea celular de <i>Anopheles albimanus</i> .....	46
VI. Discusión .....	48
VII. Conclusiones .....	48
VIII. Referencias .....	58
IX. Apéndices .....	65

# I. Introducción

## 1.1. *Malaria*

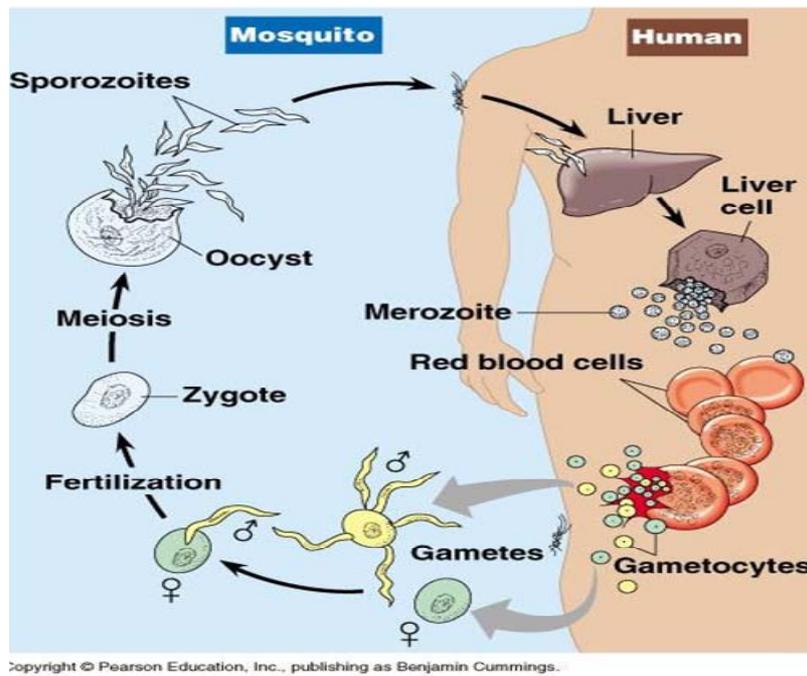
La malaria o paludismo es una enfermedad parasitaria que afecta a diversas especies de vertebrados, incluyendo a los humanos. La malaria se ha convertido en un problema de salud pública, no solo en México sino a nivel mundial, debido principalmente a su prevalencia y la elevada tasa de mortalidad generada. De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, la prevalencia a nivel mundial, fluctúa entre 350 y 500 millones de casos clínicos anuales con una tasa de mortalidad anual de más de 1.1 millones [WHO, 2010]. En México, el Boletín epidemiológico reportó 1 774 casos provenientes principalmente de los estados de Chiapas, Oaxaca, Chihuahua y Nayarit [DGE, 2010]. Los parásitos responsables de dicha enfermedad son protozoarios del género *Plasmodium* (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* y *P. ovale*) que son transmitidos al humano mediante la picadura de mosquitos vectores. En México, el mayor número de casos clínicos se deriva por la infección con *P. vivax* teniendo como vectores principales a los mosquitos *Anopheles albimanus* y *Anopheles pseudopunctipennis* [CDC, 2010].

La malaria es el resultado de la asociación de tres sistemas dinámicos y complejos: el humano (huésped), el patógeno (*Plasmodium*) y el mosquito (vector). Dentro de la interacción huésped-*Plasmodium* se han implementado estrategias profilácticas y terapéuticas pero estas no ha sido suficientes para el control y/o erradicación de la malaria. La búsqueda de nuevas estrategias más eficientes involucra el conocimiento de la interacción patógeno-vector y los

cambios fisiológicos que se presentan en el mosquito durante la infección, lo cual involucra conocer el ciclo de vida del *Plasmodium* dentro del vector y la respuesta inmune generada. Actualmente el ciclo de vida del *Plasmodium* dentro del vector está bien documentado (figura 1) [Osta *et al.*, 2004b; Blandin y Levashina, 2004a; Gokhale *et al.*, 2007]. Sin embargo, aún se desconocen muchos de los mecanismos moleculares que regulan la respuesta inmune del mosquito [Dimopoulos, 2003].

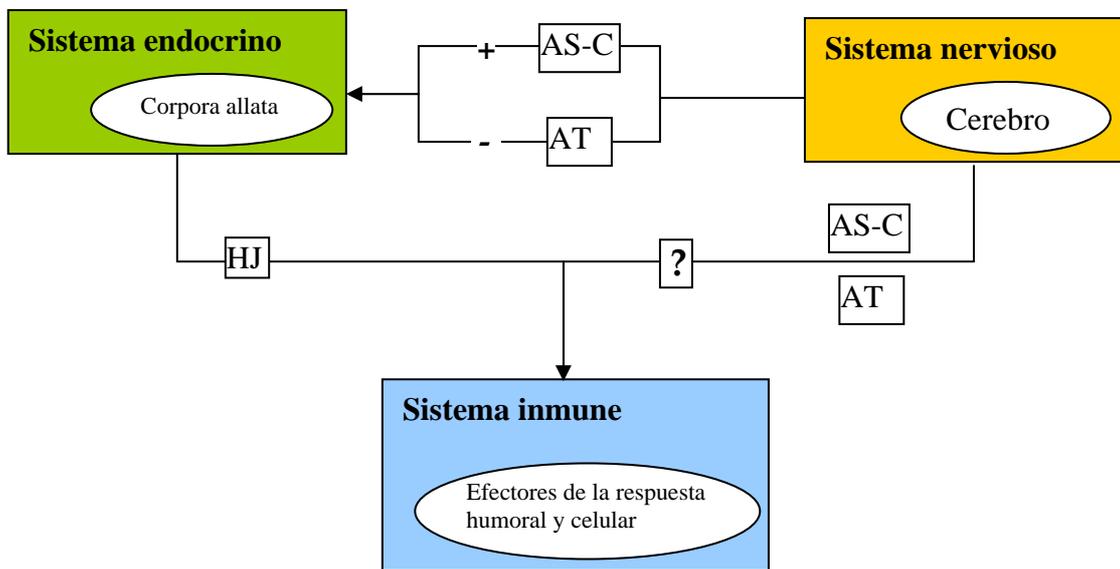
Hasta ahora se ha estudiado la respuesta inmune del mosquito vector como un sistema independiente, en los vertebrados se sabe que el sistema inmune no funciona de manera autónoma sino que interactúa con otros dos sistemas: el endocrino y el nervioso [Schedlowski y Benschop, 1999]; sin embargo en los invertebrados son pocas las evidencias que sugieren una conexión entre el sistema inmune y el neuroendocrino, por lo cual resulta interesante y de suma importancia realizar estudios encaminados a determinar hasta qué nivel pueden estar conectados estos sistemas.

En los mosquitos *Aedes aegypti* y *A. albimanus* al igual que en otros invertebrados, se sabe que dos neuropéptidos producidos en el cerebro regulan la biosíntesis de hormona juvenil (HJ) [Li *et al.*, 2006; Stay, 2000]. Estos neuropéptidos conocidos como allatotropina (AT) y la allatostatina-C (AS-C) ejercen directamente su acción en la glándula responsable de la producción de HJ. Como se discutirá en capítulos subsecuentes, estudios en diferentes insectos sugieren que la HJ ejerce un efecto regulador en las funciones de varios componentes de la respuesta inmune, p.e en la actividad del sistema de la fenoloxidasasa [Rantala *et al.*, 2003; Contreras-Garduño *et al.*, 2009] o en la generación de péptidos antimicrobianos [Manetti *et al.*, 1997; Flatt *et al.*, 2008].



**Figura 1. Ciclo de vida del *Plasmodium*.** La fase asexual del parásito se lleva a cabo dentro del humano e inicia con la picadura del mosquito *Anopheles* que introduce al parásito en forma de esporozoito. Estos circulan por la sangre periférica hasta llegar al hígado en donde tiene lugar la fase exo-eritrocítica (o esquizogonia hepática). Ahí se forman los merozoitos inmaduros que son liberados a la circulación sanguínea e invaden a los eritrocitos para madurar a las fases de trofozoitos y esquizontes (merozoitos maduros). En caso de *P. vivax* y *P. ovale*, un subgrupo de esporozoitos permanecen en estado letárgico en el hígado como hipnozoitos. Los merozoitos maduros rompen los eritrocitos y se liberan en la sangre para poder invadir otros eritrocitos (esquizogonia eritrocítica). Los merozoitos de *P. vivax* y *P. ovale* tienen predilección por los reticulocitos, mientras que *P. falciparum* invade hematíes de cualquier edad. El ciclo de esquizogonia se repite varias veces y un 10% de los merozoitos se transforma en gametocitos (formas sexuales) que luego son ingeridos por el mosquito vector. Fase sexual o esporogónica. La siguiente fase del desarrollo del *Plasmodium* tiene lugar dentro del mosquito hembra. Al ingerir sangre del huésped infectado, el mosquito adquiere los gametocitos del parásito. En el estómago del mosquito, los gametocitos encuentran las condiciones necesarias para transformarse en gametos (macrogameto: forma femenina, microgameto: forma masculina). La exflagelación del microgameto es necesaria para la fertilización del macrogameto y formación del cigoto. El cigoto se desarrolla y forma un oocineto móvil que atraviesa el revestimiento del intestino medio (la matriz peritrófica, y subsecuentemente el epitelio intestinal), para finalmente albergarse entre la lámina basal y el epitelio intestinal, ahí se transforma en ooquiste. Cada uno de los ooquistes producirán varios miles de esporozoitos mediante múltiples divisiones mitóticas [Vlachou y Kafatos, 2005a, Matuschewski 2006]. Los esporozoitos son liberados directamente en la hemocele del vector, mediante la circulación de la hemolinfa llegan a las glándulas salivales y penetran al lumen, donde se mezclan con la saliva y son inyectados al siguiente hospedero vertebrado [Osta *et al.*, 2004b; Blandin y Levashina, 2004a; Gokhale *et al.*, 2007].

Lo que sugiere que el sistema neuroendocrino puede ser capaz de interactuar directamente, por medio de la HJ, con el sistema inmune o por lo menos con algún componente de la respuesta inmune. La otra opción es que exista una regulación indirecta del sistema neuroendocrino hacia el sistema inmune por efecto directo de los neuropéptidos AT y AS-C (figura 2).



**Figura 2. Esquema hipotético que muestra la regulación del sistema nervioso hacia el sistema endocrino y la probable interacción con el sistema inmune.** El cerebro libera allatotropina (AT) que estimula a la corpora allata a producir hormona juvenil (HJ). Para inhibir la producción de HJ, el cerebro libera allatostatina-C (AS-C) a la corpora allata. La HJ liberada en la hemolinfa se ha asociado a inhibición de ciertos efectores del sistema inmune. De esta manera se presentaría una regulación directa del sistema inmune por endocrino, el cual a su vez es regulado por el sistema nervioso. Sin embargo, datos preliminares han mostrado que estos mismos neuropéptidos del sistema nervioso podrían estar involucrados en la regulación de ciertos efectores del sistema inmune [Hernández-Martínez, datos no publicados]. + : estímulo, -: inhibición.

## 1.2. Sistema inmune

En insectos, la primera línea de defensa contra patógenos son las barreras físicas o estructurales, constituidas por el exoesqueleto y las membranas peritrófica. El exoesqueleto, es una estructura dura que protege a los órganos y a la hemolinfa de los microbios presentes en el ambiente. El revestimiento de quitina que posee la tráquea protege a las células epiteliales de microorganismos y de diversos antígenos presentes en el alimento [Dimopoulos *et al*, 2001; Dimopoulos, 2003]. La membrana peritrófica (saco de quitina, proteínas y proteoglicanos) protege al epitelio intestinal del contacto directo con la comida y contra patógenos. La membrana peritrófica del estomago, presente en insectos hematófagos, se forma solamente en presencia de sangre. En el caso de algunos parásitos como *Plasmodium*, estos pueden invadir la pared intestinal de mosquitos anofelinos vectores, debido a que liberan quitinasas que degradan la membrana peritrófica [Osta *et al.*, 2004b].

Los patógenos que logran atravesar estas primeras barreras se enfrentarán a una segunda barrera el sistema inmune innato, que consta de dos mecanismos de respuesta: celular y humoral.

Las reacciones inmunes dan comienzo cuando moléculas patógenas son detectadas y reconocidas como no-propias. El reconocimiento esta mediado por *receptores de patrones de reconocimiento* denominados PRRs, los cuales se unen a *patrones moleculares asociados a patógenos* (PAMs). Los PRRs más estudiados son las proteínas de reconocimiento a peptidoglicano (PGRPs) y las proteínas de reconocimiento a bacterias Gram negativas (GNBPs) [Osta *et al.*, 2004b; Medzhitov *et al.*, 2002; Blandin y Levashina, 2004a]. En

*Drosophila melanogaster* estos PRRs activan vías de señalización involucrados en la respuesta humoral [Flatt *et al.*, 2008].

Otro tipo de PRRs que tienen la función de reconocer PAMs son las opsoninas. Se han identificado por lo menos dos tipos de opsoninas que promueven la fagocitosis en *Anopheles*: las que presentan dominios tio-éster (TEPs) y las que son ricas en leucinas (LRIMs) [Dimopoulos, 2003]. En estudios realizados en *A. gambiae*, se encontró que los hemocitos producen opsoninas tipo TEP. La TEP1 se adhiere a la superficie de bacterias Gram negativas y Gram positivas “marcándolas” para ser fagocitadas [Blandin y Levashina, 2004b; Levashina *et al.*, 2001]. La TEP1 tiene características similares con factores del complemento de vertebrados C3, C4 y C5 y  $\alpha$ 2-macroglobulinas [Levashina *et al.*, 2001]. La fijación de las TEPs a la superficie de las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas a través del sitio tioéster “etiqueta” a las bacterias para ser eliminadas vía fagocitosis por los hemocitos [Blandin y Levashina, 2004b]. Después del reconocimiento, se activa la respuesta humoral y celular.

### *1.2.1. Respuesta inmune celular*

La respuesta inmune celular se ha descrito como una de las principales defensas en insectos para controlar una infección. La efectividad de la respuesta inmune celular depende, entre otras cosas del reconocimiento de lo no propio. Una vez que el patógeno es reconocido, por medio de opsoninas [Lavine *et al.*, 2002; Blandin y Levashina, 2004b; Levashina *et al.*, 2001], como no propio se activan selectivamente diferentes factores inmunológicos. Este tipo de respuesta esta mediada por hemocitos, células especializadas que

circulan suspendidos en la hemolinfa o que se encuentran ligados a los tejidos. De acuerdo a estudios realizados en *D. melanogaster*, los hemocitos son células nucleadas que presentan formas amebiodes y pleomórficas [Rizki y Rizki, 1984]. Aunque, los hemocitos juegan un papel fundamental en los mecanismos de defensa también participan en el transporte de lípidos, proteínas, reparación de heridas, formación de tejido conectivo, secreción de factores humorales [Lackie, 1988].

En mosquitos anofelinos, se sabe que los hemocitos son los responsables de llevar a cabo los procesos de fagocitosis, nodulación, encapsulación e incluso síntesis de péptidos antimicrobianos [Hernández-Martínez *et al.*, 2002; Lanz-Mendoza *et al.*, 2002; Müller *et al.*, 1999].

Los tipos más comunes de hemocitos de *Anopheles* reportados en la literatura son: los prohemocitos, plasmacitos y granulocitos [Hernández-Martínez *et al.*, 1999; Castillo *et al.*, 2006]. Exclusivamente, los plasmacitos y los granulocitos son capaces de llevar a cabo procesos de fagocitosis [Lavine *et al.*, 2002; Hernández-Martínez *et al.*, 2002]. Hillyer y colaboradores observaron que los plasmacitos del mosquito *A. aegypti* fagocitan esporozoítos de *P. gallinaceum* y bacterias *E. coli* inoculados en el hemocele [Hillyer *et al.*, 2003]. Hernández-Martínez en el 2002, realizó trabajos con *A. albimanus* inoculándolos con bacterias muertas y observó que únicamente los plasmacitos llevaron a cabo procesos de fagocitosis [Hernández-Martínez *et al.*, 2002]. La fagocitosis tiene varias etapas: el reconocimiento, la atracción quimiotáctica, la adherencia, la ingestión y la digestión.

Posteriormente, ocurre una atracción quimiotáctica, en donde se promueve la movilización de los hemocitos hacia los patógenos. La adherencia

ocurre cuando el patógeno se adhiere a la superficie de los hemocitos. En estudios con *A. gambiae* se ha identificado un receptor de la familia de las  $\alpha$ - $\beta$ -integrinas que juega un papel importante en la adhesión y fagocitosis de *E. coli* [Moita *et al.*, 2006]. Una vez adherido el hemocito al patógeno, se da el proceso de ingestión mediante endocitosis al ser atrapados por pseudópodos que el hemocito genera al ser activado. La ingestión de la partícula ocurre cuando la membrana se invagina alrededor de la partícula y la encierra para formar una vacuola fagocítica. Dentro de la vacuola fagocítica se lleva a cabo la digestión de los patógenos o de las partículas extrañas, gracias a que se induce la generación de moléculas citotóxicas ( $O_2^-$ ,  $OH^-$ ,  $H_2O_2$ ), hidrolasas y enzimas lisosomales [Lavine y Strand, 2002]. La fagocitosis es un evento importante para el control de patógenos; sin embargo, las señalizaciones inter e intracelulares que se llevan a cabo y que son responsables de activar este evento aun no son del todo claras.

La nodulación es un mecanismo de defensa en insectos que se considera esencial en la eliminación de altos niveles de partículas extrañas presentes en el hemocele [Lavine y Strand, 2002; Hultmark, 1993]. La formación de nódulos es el resultado de la adhesión entre hemocitos y patógenos creando agregados que se adhieren a los tejidos del insecto [Lavine y Strand, 2002]. Únicamente las células granulares y los plasmatocitos están involucrados en la formación de nódulos [Lavine y Strand, 2002; Hultmark, 1993] y puede ser estimulada por la inyección de bacterias, virus, hongos y protozoarios [Lavine y Strand, 2002; Brey y Hultmark, 1998; Hultmark, 1993].

La encapsulación es un mecanismo de defensa para enfrentar cuerpos extraños o patógenos que entran en el hemocele y son muy grandes para ser

fagocitados por los hemocitos. Las cápsulas se forman por la unión de hemocitos (especialmente plasmotocitos y granulocitos) a la superficie de los patógenos grandes (p.e. nemátodos) formando capas sobre él [Hernández-Martínez *et al.*, 2002; Lavine y Strand, 2002].

Tanto los nódulos como el encapsulamiento se ven casi idénticos a nivel estructural ya que en ambos casos los hemocitos activan la producción de melanina, lo que le da un aspecto de cascarón negro [Lavine y Strand, 2002].

### *1.2.2. Respuesta inmune humoral*

La respuesta inmune humoral se encuentra representada por factores solubles constitutivos y los inducibles. Dentro de los factores solubles y constitutivos podemos mencionar a las lisozimas, lectinas, óxido nítrico, especies reactivas de oxígeno y la actividad del sistema de la fenoloxidasa, las cuales se encuentran en la hemolinfa o tejidos y pueden llegar a ser amplificadas después de un estímulo microbiano.

Los factores solubles inducibles son en general conocidos como péptidos antibacterianos o antimicrobianos, los cuales se presentan en la hemolinfa tiempo después de un estímulo inmune. Estos factores son producidos principalmente por células del cuerpo graso; sin embargo, bajo situaciones específicas otros tejidos como el intestino, túbulos de Malphigio, epidermis, hemocitos también participan la producción de estos factores. La síntesis y liberación de péptidos antimicrobianos es uno de los mecanismos de defensa utilizado por los insectos contra microorganismos patógenos. Dentro de las primeras horas después de la infección con bacterias, los insectos sintetizan péptidos antibacterianos, producidos en el cuerpo graso, y que se

acumulan en la hemolinfa [Brey y Hultmark, 1998]. En la mayoría de los casos el mecanismo de acción de éstos péptidos se ejerce a través de un mecanismo similar al de los detergentes, dañando la integridad de la membrana celular [Dimopoulos *et al.*, 2001].

Entre los anti-microbianos más notables, se encuentran las cecropinas, una familia de péptidos de 35-39 aminoácidos (4kDa), desprovistos de cisteína. Las cecropinas de los dípteros son una familia particularmente homogénea en sus secuencias [Kylsten *et al.*, 1990]. Estos péptidos a concentraciones micromolares son capaces de matar y lisis a la mayoría de las bacterias contra las que han sido probadas, tanto Gram positivas como Gram negativas, pero aparentemente inactivas contra células eucariotas [Brey y Hultmark, 1998]. Las cecropinas son moléculas anfipáticas formadas por  $\alpha$ -hélices que interactúan con los lípidos de las membranas bacterianas formando canales iónicos en las bacterias de tamaño variable [Hultmark, 1993; Hoffmann, 1995; Gillespie *et al.*, 1997].

Estos canales o poros permiten la entrada de productos extracelulares y conducen a la lisis de la bacteria [Vizioli *et al.*, 2000; Cociancich *et al.*, 1994]. En *A. gambiae* la cecropina 1 (CEC1) se ha asociado a una reducción en el número de ooquistes de *P. berghei* que se forman durante la infección [Vizioli *et al.*, 2000, Dimopoulos *et al.*, 2000]. La cecropina-2 es inducida por un estímulo inmune por ambos tipos de bacteria Gram positivas y Gram negativas así como por hongos [Vizioli *et al.*, 2000, Dimopoulos *et al.*, 2000].

Un segundo grupo de moléculas inducibles son las defensinas. Inicialmente fueron consideradas homólogas a las defensinas de mamíferos, pero las estructuras tridimensionales demostraron que son completamente

diferentes. En insectos, se han caracterizado 20 miembros de la superfamilia de las defensinas, los cuales son péptidos catiónicos, conformados por 34-43 aminoácidos, formados por 51 aminoácidos. Las defensinas contienen motivos característicos de seis cisteínas unidas en tres puentes disulfuro [Brey y Hultmark, 1998]. En los insectos las defensinas son principalmente activas contra bacterias Gram positivas, pero también pueden afectar a bacterias Gram negativas y hongos [Hultmark, 1993]. En cambio, las defensinas muestran semejanzas estructurales con algunas toxinas del escorpión, como la charibdotoxina. Al contrario de las cecropinas, las defensinas modifican la permeabilidad de la membrana citoplasmática, provocan la pérdida del potasio citoplasmático, la despolarización de la membrana interna, un decremento del ATP citoplasmático y la inhibición de la respiración de la bacteria [Cociancich *et al.*, 1993; Hultmark, 1993].

Dimopoulos y colaboradores encontraron que la síntesis de defensinas en *A. gambiae* se induce cuando hay una infección con bacterias Gram positivas [Dimopoulos *et al.*, 2001]. Las defensinas forman dímeros capaces de plegarse en estructuras de conformación  $\beta$ . Estas estructuras forman una especie de barril capaz de insertarse en la envoltura celular bacteriana, dando como resultado un aumento en la permeabilidad de la membrana que conduce a la lisis de la bacteria [Brey y Hultmark, 1998].

El tercer grupo lo forman proteínas llamadas atacinas. Constituyen la clase principal de moléculas efectoras, y se caracteriza por la presencia de una o más copias de la región G conservada [Hultmark, 1993]. En este grupo se incluyen a las sarcotoxinas II, dipterocinas y coleopterocinas. Las atacinas afectan la división celular de *E. coli* y de otras bacterias Gram negativas. En las

abejas se han encontrado dos moléculas con alto contenido de prolinas: la apidaecina y abaecina, que además presentan una gran homología con las dipterocinas [Hultmark, 1993, Hoffmann, 1995; Gillespie *et al.*, 1997].

En *A. gambiae*, se han aislado una defensina, dos cecropinas y la gambicina (un nuevo péptido anti-microbiano). Los transcritos de estos péptidos se han localizado en el cuerpo graso, el abdomen y el tórax [Dimopoulos *et al.*, 2001]. La producción de gambicina se ha observado ante infecciones con bacterias Gram positivas, Gram negativas y por hongos y al parecer tiene efecto en controlar la flora ingerida durante la alimentación [Dimopoulos *et al.*, 2000].

Aunque la existencia de péptidos anti-microbianos ha sido demostrada en insectos vectores, su participación directa en la eliminación de parásitos no es del todo clara. No obstante, existen algunas evidencias que demuestran que los péptidos anti-bacterianos pueden alterar la viabilidad de algunos parásitos. De manera interesante, se ha demostrado que dos defensinas de *Aeschna cyanea* y *Phormia terranova* son tóxicas para ooquistes de esporozoitos de *Plasmodium in vivo*, pero no son efectivos contra gametocitos u oocinetos [Shahabuddin *et al.*, 1998]. También se demostró que la cecropina B es capaz de inhibir la movilidad de microfilarias *in vitro* y de la misma manera reduce el número de larvas en desarrollo en *A. aegypti* [Chalk *et al.*, 1995]. Sin embargo, sólo altas concentraciones de cecropina B inyectada en *A. gambiae* inhibieron la formación de ooquistes de *Plasmodium*. Rodríguez y colaboradores en 1995, observaron que el péptido sintético Shiva-3 (péptido sintético basado en la secuencia de la cecropina B) afecta a los gametos de *P. berghei*, pero no a los oocinetos. El silenciamiento de la defensina-1 en *A. gambiae* no aumentó el

número de ooquistes de *P. berghei* [Blandin *et al.*, 2002], lo que indica que las defensinas de *A. gambiae* no participan en la eliminación de esta especie del parásito.

Otro de los factores humorales que puede estar involucrado en la destrucción de los parásitos como *Plasmodium* es el Oxido Nítrico (ON). El conocimiento que se tiene sobre el ON proviene de estudios realizados en vertebrados, en donde se ha descrito como una molécula de señalización y que también juega un papel importante como neurotransmisor, en el control de la presión y en mecanismos de defensa celular [Boucher *et al.*, 1999].

En vertebrados el ON presenta tres distintas funciones, dos de ellas son constitutivas mientras que la tercera es un efector inmune. La oxido nítrico sintetasa (NOS) cataliza la oxidación de L-arginina produciendo N<sup>ω</sup>-OH-L-arginina como molécula intermediaria y esta a su vez, se oxida para dar lugar a la formación de ON y L-citrulina. La producción de NOS y de ON es inducida en respuesta a una infección bacteriana, viral o por parásitos. Luckhart y colaboradores (1998) reportaron que la síntesis de ON limita el desarrollo de parásitos de *Plasmodium* en el mosquito *A. stephensi*. Encontraron que mosquitos infectados que llevan una dieta rica en L-arginina (sustrato de NOS) presentan un número menor de parásitos mientras en los mosquitos que tuvieron una dieta que proveía un inhibidor de NOS incrementaron el número de parásitos [Luckhart *et al.*, 1998].

Recientemente, los trabajos de Hyller sobre oxido nítrico en *A. gambiae* demuestran que el oxido nítrico es un componente esencial en la respuesta inmune del mosquito. Por medio de ensayos de inmunofluorescencia demostraron que la NOS es muy abundante en los granulocitos (subpoblación

de hemocitos), después de un estímulo bacteriano; y cuando inhibieron la producción de ON, la capacidad para controlar la infección con *E. coli* fue alterada drásticamente. Los resultados anteriores sugieren que el ON es un componente esencial en la respuesta inmune humoral y celular de *A. gambiae* [Hillyer *et al.*, 2010].

Los hemocitos parecen jugar un papel importante en la actividad de fenoloxidasa ya que se ha encontrado en línea celular proveniente de hemocitos de *A. gambiae* que tienen la capacidad de expresar mRNA que codifica para la enzima pro-fenoloxidasa (proPO, precursor de la enzima fenoloxidasa) [Müller *et al.*, 1999, Cerenius y Söderhäll, 2004]. Después de ser liberada de los hemocitos, la proPO es modificada post-traduccionalmente y transportada a diversas partes del cuerpo del insecto. La modificación proteolítica que sufre la proPO se lleva a cabo por una proteasa tipo serina denominada *enzima activadora de la profenoloxidasa* (PPAE por sus siglas en inglés) [Cerenius y Söderhäll 2004]. De esta forma que la proPO pasa a su forma activa de fenoloxidasa (PO). La PO oxida componentes fenólicos (p.e. Tirosina, Dopamina o L-Dopa) y las transforma en quinonas. Las quinonas fenólicas u ortoquinonas son capaces de auto polimerizarse y forman melanina [Nappi y Christensen, 2005]. De tal forma que la melanina es el resultado de la polimerización de ortoquinonas, productos de oxidación de monofenoles y difenoles. La finalidad de recubrir a los patógenos con melanina es para proteger el tejido del huésped de las especies reactivas de oxígeno y reacciones óxido reducción, que se llevan a cabo para aniquilar a los patógenos. Estudios realizados en el mosquito *A. albimanus*, mostraron que solamente una subpoblación de hemocitos (células granulares) presentan una

fuerte actividad de fenoloxidasa, y que al lisarse liberan su contenido principalmente durante la formación de cápsulas contra patógenos [Hernández-Martínez *et al.*, 1999; Hernández-Martínez *et al.*, 2002]

### 1.3. Sistema neuroendocrino

El sistema endocrino se encuentra íntimamente ligado al sistema nervioso, ambos sistemas segregan sustancias o factores que regulan sus funciones. En diversos insectos, el sistema endocrino no solo ayuda a mantener la homeostasis, sino también está involucrado en la regulación del crecimiento, programación de las actividades fisiológicas y la coordinación del comportamiento (la muda, metamorfosis, la diuresis, etc) [Adamo, 2006; Hernández-Martínez *et al.*, 2007; Weaver y Audsley, 2009]. En el mosquito, el sistema endocrino está formado por: glándulas endocrinas (glándulas protorácicas), órganos neurohemales (corpora allata y corpora cardiaca), órganos internos (ovarios, testículos, cuerpo graso y partes del intestino) y células neurosecretoras (cerebro y cordón ventral). El cerebro y el cordón ventral también forman parte del sistema nervioso [Stay, 2000].

Las glándulas protorácicas segregan ecdisona. La ecdisona es una prohormona esteroide que en las células del cuerpo graso o epidermis se transforma, por acción enzimática, en 20-hidroxiecdisona [Flatt *et al.*, 2005; Flatt *et al.*, 2008]. La ecdisona y sus homólogos (ecdisteroides) están involucrados en los procesos de muda. En *M. sexta* se ha encontrado que la HJ inhibe la producción de ecdisona, es decir, la síntesis de ecdisona está vinculada al sistema nervioso por el hecho de que la síntesis de HJ esta

regulada por la presencia de dos neuropeptidos allatoreguladores: allatotropinas (AT) y allatostatinas (AS) [Li *et al.*, 2006].

Una de las hormonas mejor estudiadas en insectos es la hormona juvenil (HJ), que está involucrada en el control de la reproducción y morfogénesis de todos los insectos [Weaver y Audsley, 2009]. La HJ es producida en un par de glándulas endocrinas denominadas corpora allata (CA), que en el mosquito se encuentran entre la base del cuello y región torácica. Se ha demostrado que diversas células neuronales despliegan sus axones desde el cerebro hasta la CA en donde liberara los neuropéptidos allatoreguladores directamente [Hernández-Martínez *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2006]. Los neuropéptidos AT y AS también son producidos por las células del cordón ventral y son liberados a la hemolinfa en donde actúan principalmente como hormonas, regulando la actividad de algún órgano (p.e. como cardioreguladores) [Hernández-Martínez *et al.*, 2005]. Asimismo existen evidencias de que los neuropéptidos producidos y liberados por el cordón ventral no parecen ejercer efecto sobre la CA [Hernández-Martínez, datos no publicados].

Las allatostatinas (AS) pueden ser agrupadas en tres familias, de acuerdo a su extremo C-terminal: Allatostatinas de cucaracha o tipo A (AS-A, YXFGL-amida); allatostatina de grillo o tipo B (AS-B, W2W9-amida) y la allatostatina tipo C (AS-C, PISCF-amida) [Li *et al.*, 2006, Oeh *et al.*, 2000]. La Allatostatina-C de *Aedes*, de 15 aminoácidos de largo, fue descrita con características comunes a todos las PISCF-allatostatinas identificadas en los insectos. La estructura del gen de allatotatina C es similar en *A. gambiae* y *A. aegypti* en donde un solo gen contiene tres diferentes exones [Li *et al.*, 2006].

A la fecha, solamente un tipo de allatotropina ha sido identificada y esta fue aislada originalmente de *M. sexta* (gusano del tabaco); y se le denominó Mas-AT y presenta una secuencia péptidica de 13 aminoácidos (GFKNVEMMTARGF-NH<sub>2</sub>) [Kataoka *et al.*, 1989]. En diversos insectos se ha observado que la AT estimula la producción de HJ en la CA mientras que la AS inhibe la producción de esta hormona [Li *et al.*, 2006; Stay, 2000].

Oeh y colaboradores demostraron que la biosíntesis de HJ es inhibida por Mas-AS cuando la CA ha sido activada previamente por Mas-AT en *M. sexta* [Oeh *et al.*, 2000]. Li y colaboradores demostraron que la AS-A no presenta efecto sobre la síntesis de HJ en el mosquito hembra de *A. aegypti*. Por el contrario, *Aedes* AS-C a concentraciones fisiológicas (10<sup>-9</sup>M) si afectaron significativamente y de manera negativa la biosíntesis de la HJ [Li *et al.*, 2006].

#### *1.4. Interacción entre el Sistema inmune y el neuroendocrino*

Recientemente se ha propuesto la posibilidad de que en los insectos exista una relación entre el sistema inmune y el neuroendocrino. Diferentes estudios sugieren que el funcionamiento del sistema inmune se encuentra regido por interacciones bidireccionales que establece con el sistema nervioso y el endocrino [Schedlowski y Benschop, 1999; Adamo, 2006; Beckage, 2008].

Las primeras evidencias sobre la regulación bidireccional entre los tres sistemas se establecieron por estudios realizados en mamíferos. Estudios pioneros mostraron de manera indirecta esta interacción, estableciendo la asociación entre el comportamiento de una especie y su impacto en la función inmunitaria. Una prueba sobre la interacción endocrina-inmune son los estudios

en hamster infectados con cisticercos, en donde se observó que las hembras son más susceptibles a la infección en comparación con los machos. Sin embargo, si ambos sexos se les gonadectomizan (extraer glándulas sexuales), ambos se vuelven igualmente susceptibles a enfermedades. Esto sugiere que las hormonas sexuales, como la progesterona, juegan un papel importante como efectores inmunes que ayudan a que un sujeto sea susceptible o no [Vargas-Villavicencio 2006, Vargas-Villavicencio 2009].

En insectos este tipo de interacciones no se han estudiado del todo. Pero realizando estudios comparativos se ha encontrado que estos manifiestan cambios de comportamientos cuando están ante una prueba inmunológica, algunos de estos cambios suelen ser similares a los observados en vertebrados después de un desafío inmunológico. Por ejemplo, los insectos expuestos a productos bacterianos exhiben diferentes comportamientos como anorexia inducida por la enfermedad y un decremento en la habilidad de aprendizaje. Indicando que la actividad inmune puede alterar funciones del sistema neuroendocrino [Weigent y Blalock, 1995; Beckage, 2008; Adamo, 2006].

Por su parte Mannetti y colaboradores [1997], sugieren la participación de la hormona juvenil (HJ) en la regulación de la expresión de genes que codifica para Ceratotoxina A (péptido antibacterial) en la mosca del mediterráneo *Ceratitis capitata*. Sus estudios mostraron que las hembras *C. capitata* tratadas con precocene II (compuesto anti allatotropina) bloquean la expresión de genes que codifican para Ceratotoxina A (péptido antibacterial). Debido a la ausencia de allatotropina, no hay biosíntesis de HJ; sin embargo, al

tratar los insectos con metoprene (análogo HJ) se reestablece la expresión de genes que codifican para Ceratotoxina A [Manetti *et al.*, 1997].

Por otro lado Rantala y colaboradores [2003] encontraron que los machos *T. molitor* que eran inoculados con HJ, no solo incrementaban el atractivo de sus feromonas sino que también reprimía algunas las funciones inmunes como la actividad de PO y el encapsulamiento.

Recientemente, algunos estudios han sido diseñados para evidenciar que existe una interacción directa entre el sistema nervioso e inmune. Aballay [2009], trato de demostrar esta relación utilizando como modelo de trabajo mutantes de *C. elegans*, que presenta una mutación en el gen GPCR y que confiere deficiencia en la actividad de *npr-1*. Los GPCRs constituyen una familia de proteínas transmembranales que están presentes en la superficie de células nerviosas de todos los organismos multicelulares, las cuales están involucradas en la regulación de procesos fisiológicos como la homeostasis, metabolismos, neurotransmisión y funciones inmunes. Se sabe que *npr-1* es parte de un circuito neuronal que integra las respuestas de comportamiento con el oxígeno del ambiente, las bacterias y otros organismos. En el estudio se observó que la mutación de este receptor resulta en una respuesta inmune ineficaz contra patógenos. Proponiendo al circuito neural *npr-1* regula, por lo menos en parte, la respuesta inmune de *C. elegans* [Aballay, 2009].

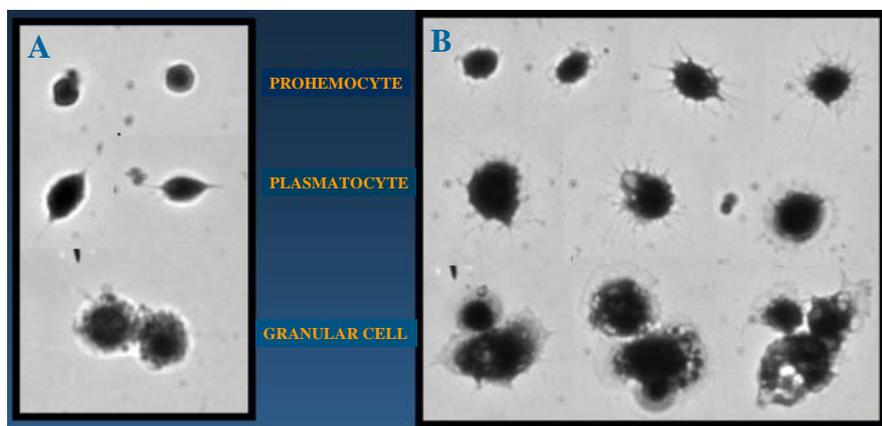
Por otro lado, en *A. aegypti* se observo que la AT es liberada a la CA después de que el mosquito cumple 9h de edad post-emergencia y en las horas previas esta glándula endocrina no entra en contacto con la AT, por tanto no hay producción de HJ [Hernández-Martínez *et al.*, 2005; Hernández-Martínez *et al.*, 2007]. Basado en estos resultados, estudios preliminares de

nuestro grupo realizadas en *A. albimanus* y *A. aegypti*, indican que los neuropéptidos allatoreguladores allatotropina y allatostatina (AT, AS respectivamente) pudieran estar involucrados en la regulación de algunos procesos efectores de la respuesta inmune. En dichos estudios la cabeza de mosquitos hembra de *A. albimanus* fue retirada antes de cumplir 9 h de edad, para asegurar que la CA no tuviera contacto con los neuropéptidos allatoreguladores (los cuales se producen en el cerebro). Los hemocitos de estos mosquitos decapitados, que no habían estado en contacto con AT y en consecuencia tampoco con HJ, fueron incubados *in vitro* por 30 minutos con AT a una concentración de  $1 \times 10^{-8} \text{M}$ . Los hemocitos en presencia de AT mostraron cambios morfológicos drásticos, en comparación con los hemocitos incubados solo con RPMI (figura 3). Ensayos similares realizados con hemocitos de *A. aegypti* mostraron los mismos resultados, pero en este caso de manera adicional se empleo AS-C, la cual no presentó efectos sobre los hemocitos [Hernández-Martínez, datos no publicados]. Estos resultados, sugieren que la allatotropina puede tener un efecto directo sobre los hemocitos.

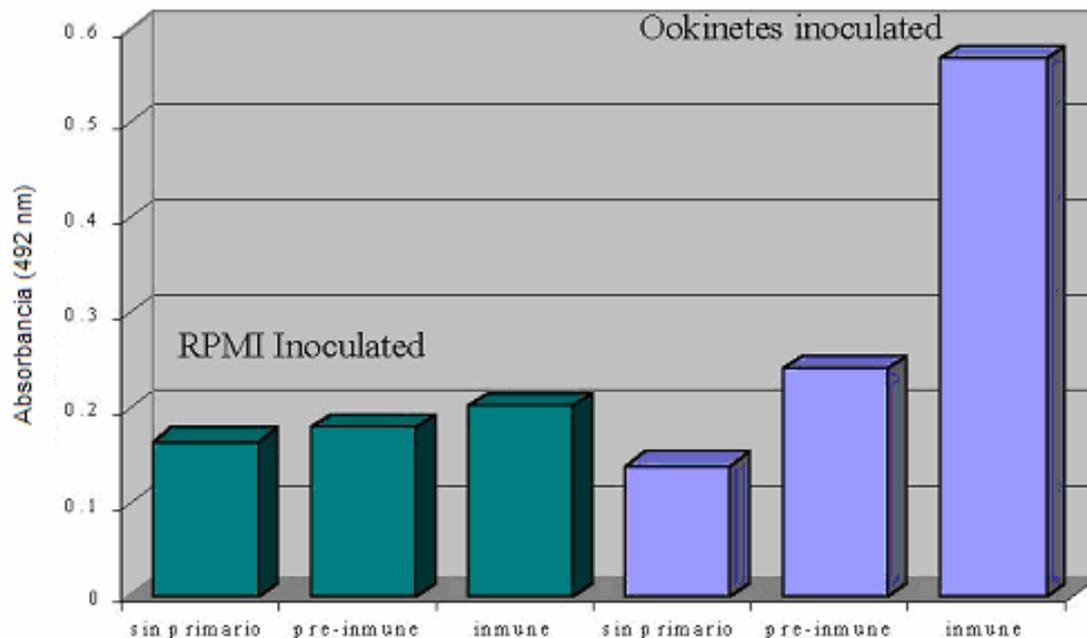
Adicionalmente Hernández-Martínez y cols. (datos no publicados) han observado que los niveles de AT son alterados en mosquitos que han sido infectados con parásitos de *P. berghei*. En estos ensayos, la presencia de oocinetos de *P. berghei* en el intestino de *A. albimanus* produjo un incremento al doble de AT con respecto a las concentraciones presentes en la hemolinfa tratados solamente con medio RPMI (medio en el cual los oocinetos fueron puestos en el intestino, ver figura 4).

Finalmente, un dato más que se suma a esta serie de evidencias, también fue observado por nuestro grupo, y está en relación a la posible

participación de la HJ y su efecto sobre la actividad de PO (fenoloxidasas, un componente importante de la respuesta inmune humoral) en el mosquito. Estas evidencias, aun no reportadas, fueron obtenidas empleando el modelo que ya se mencionó de mosquitos sin cabeza (Hernández-Martínez *et al.*, 2007) y un análogo de la HJ, el metopreno. Los datos muestran que los mosquitos del control 1 (con cabeza y mantenidos sin alimentar durante el ensayo, dado que los que no tienen cabeza ya no se alimentan) y los del control 2 (decapitados en las primeras horas post-emergencia y por tanto no productores de HJ, tratados solo con acetona que fue utilizada para diluir el metopreno en el grupo experimental) presentaron valores similares de PO. Por el contrario, los mosquitos tratados con metopreno presentaron valores de actividad de PO en su hemolinfa por lo menos dos veces más alto que los grupos control (Fig. 5, datos no publicados).

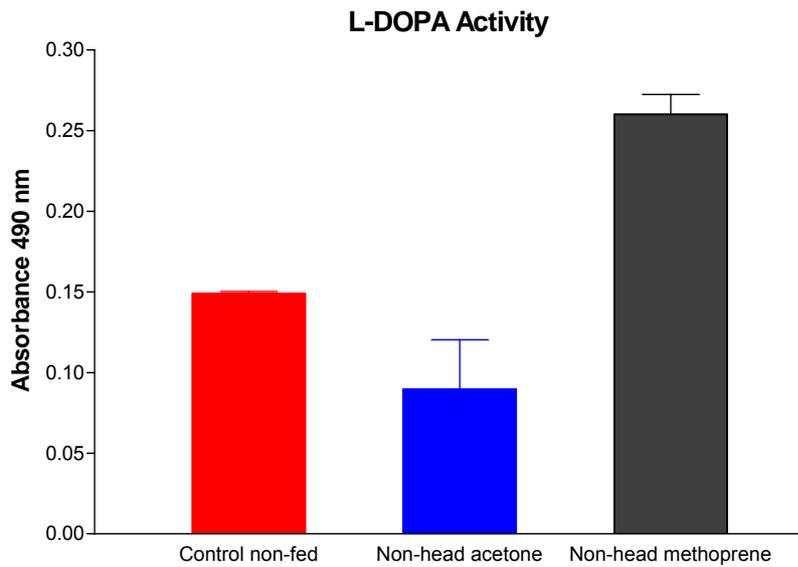


**Figura 3. Efecto de la allatotropina en hemocitos de *Anopheles albimanus in vitro*.** Los hemocitos de mosquitos individuales fueron obtenidos por perfusión con aproximadamente 5µl medio RPMI. Las muestras se mantuvieron por 15 minutos en cámara húmeda. El exceso de RPMI fue removido y se le agregaron 5µl de RPMI solo (A) o conteniendo  $1 \times 10^{-8} \text{M}$  AT (B). Después de 30 minutos, las muestras fueron fijadas en una cámara de vapores de paraformaldehído y teñidas con Giemsa. Se muestran las 3 subpoblaciones de hemocitos presentes en la hemolinfa del mosquito y los cambios producidos por la AT. Microscopía de Luz (100X).



**Figura 4. Cambios en las concentraciones de allatotropina en *A. albimanus* inoculados vía enema con RPMI u oocinetos malaricos.** Cada grupo lo conforma la hemolinfa de 10 mosquitos después de 24 h de ser inoculados con RPMI y con oocinetos de *P. berghei*. Las muestras primero fueron eluidas usando sep pak C-18, liofilizadas y resuspendidas en acetoneitrilo 80%, para después ser evaluadas por medio de un ensayo de ELISA. En el eje de las X tenemos, *sin primario*: suero de conejo sin anticuerpos contra AT, *pre-inmune*: suero de conejo con el antígeno AT pero sin anticuerpo contra AT, *inmune*: suero de conejo con anticuerpos contra AT. Los mosquitos inoculados con oocinetos muestran una mayor concentración de AT

En su conjunto, las evidencia descritas sugiere de manera muy fuerte una posible relación entre el sistema inmune y el sistema neuroendocrino en mosquitos y sería apremiante continuar el análisis y la búsqueda de evidencias más sólidas relacionadas a la participación de componentes del sistema neuroendocrino en la regulación del sistema inmune de mosquitos, aprovechando las herramientas inmunológicas, los conocimientos y experiencia en el manejo de péptidos allatorreguladores y cultivo de tejidos de mosquito de nuestro grupo de trabajo.



**Figura 5. Actividad de fenoloxidasa (PO) en la hemolinfa de *A. aegypti*, sin tratamiento o tratados con metopreno.** Los mosquitos después de ser decapitados, fueron tratados con acetona o metopreno; 24 h después la hemolinfa fue perfundida y la actividad de PO evaluada utilizando L-Dopa como sustrato. En los mosquitos que no producen de manera endógena hormona juvenil (HJ), el metopreno (análogo de la HJ) incrementa aproximadamente dos veces la actividad de PO. Barra roja: Mosquitos control sin tratamiento, mantenidos en las mismas condiciones que los grupos experimentales (sin alimentar). Barra azul: Mosquitos control decapitados antes de cumplir 9 horas post-emergencia (incapaces de producir HJ), tratados solo con acetona. Barra gris: Mosquitos decapitados antes de cumplir 9 horas post-emergencia, tratados ectópicamente con metopreno disuelto en acetona.

## 1.5. Justificación

La malaria continúa siendo un problema de salud pública a nivel mundial su prevalencia fluctúa entre 350 y 500 millones de casos anuales y su tasa de mortalidad es aproximadamente de 1.1 millones de personas anualmente [WHO, 2010]. Las estrategias de control que actualmente se utilizan no han dado una solución global para disminuir la tasa de prevalencia y mortalidad debido a múltiples razones; entre las que destacan la carencia de una vacuna eficiente, resistencia por parte del parásito a los fármacos para su control y estrategias adecuadas de control poblacional del vector.

Las propuestas de desarrollar mosquitos transgénicos resistentes a la infección con *Plasmodium*, suenan muy atractivas, sobre todo aquellas que proponen la manipulación del sistema inmune del mosquito para conferir resistencia a patógenos. Sin embargo, para alcanzar dichos objetivos es necesario realizar estudios detallados del sistema inmune de estos insectos principalmente en los aspectos de su regulación, de los que aún conocemos muy poco.

Evidenciar la existencia de una regulación neuroendocrina en la respuesta inmune del mosquito *A. albimanus* causaría un impacto, no solo en el conocimiento evolutivo sino también en la generación de conocimientos encaminados a proponer estrategias para el control de enfermedades transmitidas por vectores (por ejemplo, al mejorar la respuesta inmune del mosquito vector contra *Plasmodium* o algún otro patógeno).

## II. Hipótesis

Los péptidos allatoreguladores producidos en el cerebro del mosquito regulan la respuesta inmune celular y humoral de *A. albimanus*.

## III. Objetivo General

Investigar el efecto de los neuropéptidos allatorreguladores en la respuesta celular y humoral del mosquito *A. albimanus*.

### 3.1. Objetivos particulares

- Investigar el papel de la allatotropina y allatostatina-C en la actividad de fenoloxidasa, en la expresión de péptidos antimicrobianos y en la producción de Óxido Nítrico.
- Determinar el efecto de la allatotropina y allatostatina-C en la capacidad fagocítica de la línea celular LSB-AA695BB provenientes de *A. albimanus*.

# IV. Material y métodos

## 4.1. *Material biológico*

**Mosquitos:** Se utilizaron hembras de *A. albimanus* obtenidos del insectario del Instituto Nacional de Salud Pública. Los estadios larvales fueron criados con una dieta a base de croquetas para gato recién nacido de Whiskas® pulverizadas y los mosquitos adultos con una solución de azúcar al 10% en algodón humedecido. Todas las fases del mosquito fueron mantenidas en condiciones de temperatura a 37°C, humedad relativa de 80% y un foto periodo de 12/12.

Para eliminar la liberación de neuropéptidos allatoreguladores que promueven la biosíntesis de hormona juvenil [Hernández-Martínez *et al.*, 2007] (sección 1.3). En algunos experimentos los mosquitos fueron decapitados al momento de emerger o entre las cero y dos horas post-emergencia. Este proceso se realizó bajo un microscopio estereoscópico utilizando una aguja de jeringa a manera de bisturí. Los mosquitos decapitados fueron mantenidos en cámara húmeda a temperatura ambiente el tiempo necesario para la realización de los experimentos.

**Línea celular LSB-AA695BB:** La línea celular LSB-AA695BB fue obtenida a partir de embriones de *A. albimanus*, y ha sido mantenida bajo las condiciones previamente descritas [Bello *et al.*, 1997]. Brevemente, las células se mantuvieron en medio de cultivo Schneider suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado 1h a 56°C (iSFB). Se realizaron subcultivos generalmente en dilución 1:5 cuando el cultivo celular alcanzaba 85% de confluencia con el siguiente protocolo; las células se lavaban con medio fresco

y se despegaban golpeando suavemente con la palma de la mano. Las células se mantuvieron a 29°C

**Microorganismos:** Para los ensayos de fagocitosis en células *LSB-AA695BB* se utilizaron bacterias *E. coli* pHrodo™ conjugadas a Rodamina (BioParticles, Invitrogen), las cuales emiten fluorescencia cuando son fagocitadas, debido al cambio de pH. El rango de absorción y de emisión del colorante se encuentra alrededor de 505 nm y 560 nm respectivamente. Los viales de bacterias liofilizadas se resuspendieron de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

**Péptidos allatorreguladores:** La allatotropina y la allatostatina-C que se utilizaron en este trabajo fueron péptidos sintéticos donados gentilmente por el Dr. Fernando Noriega (Department of Biological Sciences, Florida International University). Los neuropéptidos allatotropina [Veenstra y Costes, 1999] y allatostatina-C [Li *et al.*, 2006] fueron previamente identificados, purificados y secuenciados de *A. aegypti*. La allatostatina- C, con un Peso Molecular de 1,936 y compuesto por 15 aminoácidos (QIRYRQCYFNPI SCF) fue sintetizada por BioPeptide (San Diego, CA). La allatotropina, con un Peso Molecular de 1,718 y compuesto por 14 aminoácidos (APFRNSEMMTARGF), sintetizada por Genemed Síntesis (San Francisco, CA). Ambos neuropéptidos fueron entregados en forma liofilizada, y a partir del liofilizado se preparó un stock a una concentración de  $10^{-4}$  M en agua deionizada para ambos casos. De la solución stock se prepararon las diferentes diluciones de trabajo.

## 4.2. Actividad del sistema de la PO

Para determinar el efecto de allatotropina y allatostatina-C en la actividad del sistema de fenoloxidasa en la hemolinfa de los mosquitos, estos neuropéptidos fueron inoculados en el hemocele de mosquitos decapitados. Posteriormente, la hemolinfa se extrajo por perfusión como previamente fue descrito por Hernández y colaboradores [1999]. Brevemente, la estrategia fue la siguiente:

**Inoculación:** Los mosquitos decapitados fueron anestesiados en hielo e inoculados a través de la membrana intersegmentaria localizada entre el 5° y 6° segmentos abdominales (en la región ventro-lateral) [Hernández-Martínez *et al.*, 2002]. La inoculación se realizó con la ayuda de microagujas montadas sobre una microjeringa Captrol III marca Drummond. Para cada ensayo se formaron 5 grupos con 10 mosquitos decapitados cada uno. El grupo Testigo lo conformaron mosquitos anestesiados con frío y sin tratamiento. El grupo Testigo negativo (grupo PBS) fue inoculado con PBS estéril (Apéndice 9.1), en el grupo de Levadura cada mosquito fue inoculado con aproximadamente 1000 levaduras en PBS (Apéndice 9.2), el grupo AT fue inoculado con allatotropina [ $10^{-7}$  M] en PBS estéril, el grupo AS fue inoculado con allatostatina-C [ $10^{-7}$  M] en PBS estéril. Los mosquitos inoculados se mantuvieron a temperatura ambiente durante 1 hora antes de la perfusión.

**Perfusión:** La hemolinfa fue obtenida por método de perfusión [Hernández *et al.*, 1999]. Los mosquitos fueron anestesiados en hielo, una vez dormidos fueron tomados por los apéndices con la ayuda de unas pinzas de disección y la región del abdomen fue sumergida en etanol al 85%. El alcohol se dejó evaporar por unos segundos a temperatura ambiente y una micro-aguja fue

insertada manualmente a través de la membrana del cuello hasta la cavidad torácica. Aproximadamente 20 µl del PBS/EDTA (1mM EDTA) fue perfundido a través del mosquito. Las gotas de hemolinfa fueron obtenidas de una pequeña incisión que se realizó en la membrana pleural del penúltimo segmento abdominal. La hemolinfa fue recolectada en tubos eppendorf de 600 µl estériles y se mantuvieron a -20°C.

**Actividad de fenoloxidasa (PO):** La actividad de la PO se determinó indirectamente por la oxidación de la L-dihidroxitifenilalanina (L-Dopa, SIGMA). La proteína de las muestras de hemolinfa se cuantificó mediante el método de Bradford (Apéndice 9.4); 20 µg de proteína de cada muestra fue colocada en una placa de 96 pozos y el volumen fue ajustado a 100 µl con PBS. A cada muestra se agregaron 100 µl de L-Dopa [4 mg/ml en PBS]. La mezcla se incubó durante 15 min a temperatura ambiente y protegidas de la luz. La absorbancia a 490 nm fue medida cada 5 min durante 30 min.

**Análisis estadístico:** Se realizó un análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) para detectar si existían diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (Testigo, PBS, Levadura, AT y AS-C). Posterior a la prueba ANOVA se realizó un análisis post-hoc de Fisher LSD. Esta prueba permite determinar los tratamientos que difieren entre sí.

### 4.3. Expresión de genes que codifican para péptidos antimicrobianos

Para evaluar el efecto de la allatotropina y allatostatina-C en la producción de péptidos antimicrobianos, se analizó la expresión de genes que codifican para los péptidos Gambicina, Atacina y Cecropina en los intestinos del mosquito después de ser estimulados con los neuropéptidos. La estrategia que se siguió para este ensayo *in vitro* se menciona a continuación:

**Cultivo de intestinos:** La disección de intestinos se llevó a cabo sobre una gota de PBS estéril suplementado con inhibidores de proteasas (Apéndice 9.3) de Gibco BRL. Para separar el abdomen del tórax se realizaron dos pequeñas incisiones laterales sobre la membrana pleural cerca del tórax y se cortó el último segmento del abdomen. El abdomen y el tórax fueron jalados en sentidos opuestos para obtener el intestino. Cada intestino obtenido fue lavado en PBS estéril. Como máximo se colocaron tres intestinos por pozo en placas estériles de 96 pozos conteniendo 200  $\mu$ l de medio de cultivo MEM, suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado 1h a 56°C y antibiótico-antimicótico 2X (200  $\mu$ g/ml Estreptomicina, 200 U/ml Penicilina, 0.5  $\mu$ g/ml de Anfotericina) de Gibco BRL.

Para este experimento se formaron 4 grupos con 20 intestinos cada uno. El grupo Testigo se incubó solamente con MEM suplementado, al grupo LPS se le adicionó lipopolisacarido (2  $\mu$ g/ml, SIGMA), al grupo AT se le adicionó allatotropina ( $10^{-7}$  M), al grupo AS se le adicionó allatostatina-C ( $10^{-7}$  M). Los cultivos de intestinos se incubaron durante 24 h a 32 °C.

**Extracción de RNA:** Para la extracción de RNA total se utilizó el Kit Mini RNA Isolation de Zymo Research utilizando productos, soluciones e indicaciones del

fabricante. Se retiró el medio de cultivo a los intestinos y se le agregó 100 µl de ZR RNA Buffer, con la ayuda de un pistilo se maceraron las muestras de inmediato. El homogenizado se transfirió a una columna Zymo-spin™. Se centrifugó a 12,000 rpm por 1 min y se continuó con los pasos de lavado para finalmente eluir el RNA con 30 µl de H<sub>2</sub>O-DEPC (Apéndice 9.5). La integridad del RNA extraído de cada muestra fue verificada y visualizada por medio de una electroforesis utilizando un gel de agarosa al 1.5%.

**Síntesis de cDNA:** A partir de las muestras de RNA obtenidas se realizó la transcripción reversa a cDNA utilizando el kit GeneAmp® RNA PCR de Applied Biosystems. El cDNA se sintetizó a partir de 5 µl de RNA total, 100ng de oligonucleótido dT y 200U de RNasa H. La mezcla de reacción además contenía 50mM Tris-HCl pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub> y 10 mM DTT. La transcripción reversa se llevó a cabo en el termociclador GeneAmp PCR system 2400 de Applied Biosystem, con las siguientes condiciones de corrida: 15 min a 42°C, 5 min a 99°C y finalmente 5 min a 5°C. Los cDNA's generados fueron almacenados a 4°C para su posterior procesamiento.

**Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real:** Para analizar en las muestras de cDNA los niveles de expresión de los genes que codifican para los péptidos antimicrobianos se llevó a cabo la PCR en tiempo real (Q-PCR). Los oligonucleótidos utilizados fueron: Gambicina (AGAP008645) RT\_Gam\_F (CGTGCGATGGTCAGACGAT) y RT\_Gam\_R (CGCCGCGTTCACAAGAA); Atacina (AGAP005620) Atta\_F (CGC TAC AAG ATG AAC GGC AAA) y Atta\_R (TGT TTC CGC TCG CAC TCT TC); Cecropina (AGAP000694) Cec3\_F (GAAATTGGCAAACGACGTGAA) y Cec3\_R (GCGATGCTAAAAGACTAAGGGC). Como control interno se amplificó un

fragmento de actina con los oligonucleótidos RT\_ActU\_R (CGA TCC AGA CCG AGT ACT TGC) y RT\_Act3.2\_F (TAC GCC AAC ATT GTC ATG TCC) [Herrera-Ortíz *et al.*, 2011]. Para la amplificación de los fragmentos se utilizó el protocolo incluido en el kit SyBR Green PCR de Applied Biosystems. De cada muestra de cDNA se colocó 1  $\mu$ l en una placa de 384 pozos con 14  $\mu$ l del Master Mix (2  $\mu$ l Primer Forward [1.5 mM], 2  $\mu$ l Primer Reverse [1.5 mM], 7.5  $\mu$ l SuperMix 2X, 2.5  $\mu$ l H<sub>2</sub>O DEPC), por triplicado. La amplificación se llevó a cabo utilizando un termociclador ABI Prism 7900HT (Applied Biosystems) con las siguientes condiciones de corrida para la amplificación: 1 ciclo de 50°C por 2min y 45 ciclos de 95°C por 10 min, 95°C 15 s, 54°C por 30 s y 72°C por 30 s [Herrera-Ortiz, datos no publicados]. Para la cuantificación relativa se utilizó el método de comparación del Ct (critical threshold cycle), o valores de “delta delta Ct” ( $\Delta\Delta$ Ct).

#### 4.4. Producción de Óxido Nítrico

La concentración de Óxido Nítrico (ON) fue determinada en el sobrenadante de los cultivos de intestinos de mosquito, la metodología para realizar el cultivo de intestinos se detalla en la sección 4.3. Para este experimento se formaron 5 grupos con 20 intestinos cada uno. El grupo Testigo se incubó solamente con MEM suplementado, al grupo LPS se le adicionó lipopolisacárido (2 µg/ml, SIGMA), nuestro Testigo positivo fue el grupo PMA incubado con 10 ng/ml de forbol-12-miristato 13-acetato (PMA, activador inespecífico de la respuesta inmune; SIGMA), el grupo AT fue incubado con una concentración  $10^{-7}$  M de allatotropina, el grupo AS fue incubado con una concentración  $10^{-7}$  M de allatostatina-C. Los cultivos de intestinos se incubaron durante 24 h a 32 °C. Los sobrenadantes se recuperaron en tubos eppendorf de 600 µl y se centrifugaron 3500 rpm por 5 min para eliminar restos celulares o cualquier material suspendido en él.

**Concentración de Óxido Nítrico (NO):** Las concentraciones de NO se determinaron indirectamente mediante la cuantificación de sus productos estables: nitritos y nitratos ( $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ ) por medio de la reacción de Griess [Nappi *et al.*, 2000]. De los sobrenadantes se tomaron 50 µl y se mezclaron con 50 µl de sulfanilamida al 1% y con 50 µl de naftiletilendiamina al 0.1% preparados en ácido fosfórico al 2.5%. Las muestras fueron incubadas durante 10 min a temperatura ambiente. Las lecturas de absorbancia fueron determinadas en un lector de ELISA (Multiskan MS de Labsystems) a 540 nm. Para calcular las concentraciones de nitritos presentes en el medio se elaboró una curva estándar con concentraciones conocidas de nitrato de sodio, de 1 a 100 µM.

**Análisis estadístico:** Se realizó un análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) para detectar si existían diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (Testigo, PMA, LPS, AT y AS). Posterior a la prueba ANOVA se realizó un análisis post-hoc de Tukey HSD. Esta prueba permite determinar los tratamientos que difieren entre sí.

## 4.5. Capacidad fagocítica en línea celular

La capacidad fagocítica de la línea celular LSB-AA695BB de *A. albimanus* fue determinada en presencia de allatotropina o allatostatina-C. Las células fueron lavadas con medio Schneider fresco suplementado con iSFB (sección 4.1), despegadas y resuspendidas. En un cubreobjeto de vidrio estéril (diámetro 18mm) fueron sembradas, aproximadamente 250 000 células. Para este experimento fueron diseñados 4 grupos: el grupo testigo fue incubado con medio Schneider fresco suplementado con iSFB, nuestro Testigo positivo fue el grupo PMA incubado con forbol-12-miristato 13-acetato (10ng/ml) (activador inespecífico de la respuesta inmune, SIGMA), el grupo AT fue incubado con allatotropina ( $10^{-7}$  M), el grupo AS fue incubado con allatostatina-C ( $10^{-7}$  M). Después de 30 min de incubación a temperatura ambiente, el medio fue retirado de los diferentes tratamientos cada grupo fue incubado con bacterias *E. coli* pH rhodo (a una concentración de 20 bacterias/célula) durante 30 minutos.

Los distintos grupos fueron observados bajo un microscopio de fluorescencia (Leica DM 1000) utilizando un filtro adecuado para la emisión de la rodamina, la cual se encuentra entre 505 y 560 nm. Los resultados fueron registrados utilizando una cámara fotográfica Leica modelo DFC320 y el software Image Manager (IM50 de Leica).

# V. Resultados

## 5.1. Efecto de AT y AS-C en la actividad del sistema de la PO

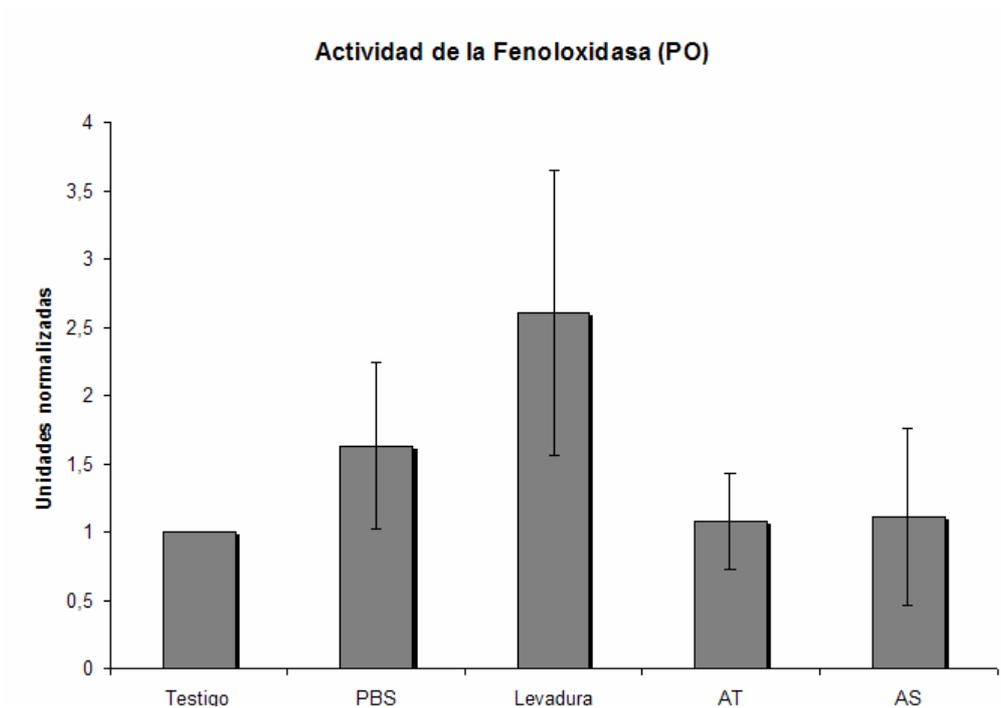
Para evaluar el efecto de la allatotropina y la allatostatina-C sobre el sistema de la PO en la hemolinfa del mosquito, la actividad de la PO fue medida indirectamente a través de la oxidación que produce la enzima sobre la L-Dopa. Los resultados fueron ajustados a unidades relativas de absorbancia, siendo el valor basal (Control) igual a 1. Este ensayo se realizó por triplicado.

La figura 6 muestra las unidades relativas de absorbancia de la oxidación de la L-Dopa en los diferentes tratamientos. Para cumplir con los supuestos de normalidad y homogenización de varianza los datos fueron transformados a logaritmo natural antes de realizar los análisis estadísticos. La prueba ANOVA mostró diferencias estadísticas marginalmente significativas en el modelo de estudio ( $F_{(4,10)}=3.079690$ ;  $p=0.067890$ ).

Dada la significancia estadística obtenida por ANOVA se decidió analizar con más detalle las diferencias existentes entre los tratamientos, usando una prueba post-hoc de Fisher LSD. Los resultados fueron los siguientes: se observa que el grupo retado con Levaduras indujo 2.61 veces más oxidación que el grupo Testigo ( $p=0.023013$ ), mientras que el grupo AT y AS presentaron aproximadamente los mismos niveles de oxidación, AT con 1.11 y AS con 1.08 veces más que el Testigo ( $p=0.646521$ ,  $p=0.615647$ ; respectivamente).

Los resultados muestran que solamente el grupo estimulado con Levadura presentó una diferencia estadística significativa con respecto al

Testigo; no se encontró otro tratamiento que presentara diferencias con el grupo Testigo como tampoco se encontró diferencia estadística entre el grupo AT con el grupo AS. Los que nos indica que los neuropéptidos allatorreguladores no afectaron la actividad de PO en el mosquito.



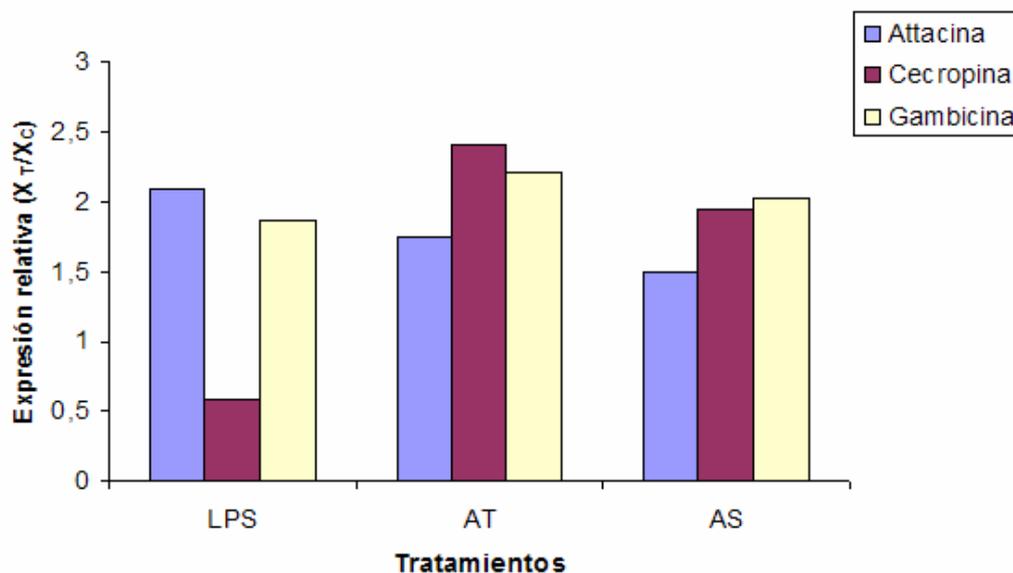
**Figura 6. Cuantificación de la Actividad de la fenoloxidasa en la hemolinfa de *A. albimanus* retados con diferentes estímulos.** La gráfica muestra los niveles de oxidación (DO) de la L-Dopa producidos por la enzima fenoloxidasa, en cada uno de los tratamientos. El análisis ANOVA muestra que en el modelo de estudio existen diferencias marginalmente significativas  $F_{(4,10)}=3.079690$ ;  $p=0.067890$ , mientras que la prueba de post-hoc de Fisher LSD mostró que la única diferencia se presentó en la muestra con levaduras ( $p=0.023013$ ) en comparación con el Testigo.

## *5.2. Efecto de AT y AS-C en la expresión de genes que codifican para péptidos antimicrobianos*

La generación de péptidos antimicrobianos en intestinos de mosquito en cultivo después de un reto microbiano ya ha sido reportado [Herrera-Ortiz, 2002]. En base a estos antecedentes, se realizaron ensayos para evaluar el efecto de la AT y AS en la expresión de transcritos correspondientes a péptidos antimicrobianos (Gambicina, Cecropina y Atacina) por PCR en tiempo real y analizados por el método  $\Delta\Delta Ct$ . Los resultados de este ensayo son reproducibles.

La figura 7 muestra los niveles de expresión obtenidos de la PCR en tiempo real, los resultados muestran sobre-expresión de los genes que codifican para péptidos antimicrobianos en los diferentes tratamientos. El grupo Testigo no es mostrado en la gráfica debido a que es el grupo de comparación y representa la unidad (Testigo=1 para todos los péptidos antimicrobianos analizados). Se observa en la gráfica que cuando los mosquitos fueron tratados con LPS hay sobre-expresión en atacina y gambicina (2.098 y 1.86 veces, respectivamente) mientras que cecropina disminuyó su expresión (0.58 veces). Por otra parte, de manera interesante se puede notar que el tratamiento con AT y AS inducen la generación de transcritos de los tres péptidos antimicrobianos (atacina: 1.74 y 1.49, respectivamente; cecropina 2.4 y 1.95; gambicina: 2.21 y 2.03, respectivamente) indicando la posible participación de los neuropéptidos en la regulación de la expresión de estos marcadores de respuesta inmune.

### Expresión de transcritos que codifican para péptidos antimicrobianos



**Figura 7. Cuantificación de los niveles de expresión de genes que codifican péptidos antimicrobianos en cultivo de intestinos de *A. albimanus*.** En el eje “y” se muestran los niveles de expresión relativa ( $X_T/X_C$ ), en donde  $X_T/X_C$  se lee: veces de expresión (X) del tratamiento (T) entre las veces de expresión del Testigo (C). En el grupo LPS indujo 2.09 veces más transcritos de atacina, y 1.86 veces más de gambicina. Los transcritos de cecropina disminuyeron bajo este tratamiento ya que mostraron un valor de relativo de 0.58 veces. El grupo AT indujo 1.74 veces más transcritos de atacina, y 2.4 y 2.21 veces más cecropina y gambicina respectivamente respecto al control. En caso de la AS, se observa que esta indujo 1.49 veces más transcritos de atacina, 1.95 y 2.03 más cecropina y gambicina respectivamente con respecto al control.

### 5.3. Efecto de AT y AS-C sobre la generación de Óxido Nítrico

La generación de ON se ha determinado en otros invertebrados como parte de la respuesta inmune [Herrera-Ortiz *et al.*, 2011, Hillyer y Estévez-Lao, 2010; Luckhart *et al.*, 1998]. En este trabajo también se determinó la producción de ON en los cultivos de intestino de *A. albimanus* por reacción de Griess (sección 4.4), en la cual se cuantifica la concentración de nitritos encontrados en la muestra. Los datos obtenidos cumplen con los supuestos de normalidad de los análisis paramétricos.

La prueba ANOVA mostró diferencias estadísticas significativas en el modelo de estudio ( $F_{(5,6)}=77.435$ ;  $p=0.000023$ ). Posterior al ANOVA se realizó una prueba post-hoc de Tukey HSD para determinar las diferencias entre los tratamientos.

La figura 8 muestra las concentraciones obtenidas de ON obtenidos en los ensayos, el grupo Testigo presento  $12.32 \pm 0.35 \mu\text{M}$ , nuestro grupo testigo positivo (grupo PMA) fue el que indujo la mayor producción de ON de  $40.54 \pm 7.16 \mu\text{M}$ , siendo aproximadamente 3 veces más que el que presenta el grupo Testigo ( $p=0.000251$ ), mientras que la presencia de LPS en el cultivo no modificó la producción de ON ( $15.25 \pm 3.95 \mu\text{M}$ ,  $p=0.623565$ ) con respecto al Testigo. Finalmente, se puede observar que tanto  $10^{-7}\text{M}$  de AT como  $10^{-7}\text{M}$  de AS fueron capaces de estimular la generación de ON ( $24.50 \pm 4.95 \mu\text{M}$  y  $27.24 \pm 2.49 \mu\text{M}$ , respectivamente). Presentando un incremento de más de 2 veces con respecto al control (AT,  $p=0.002567$  y AS,  $p=0,000864$ ).

### Producción de Óxido Nítrico

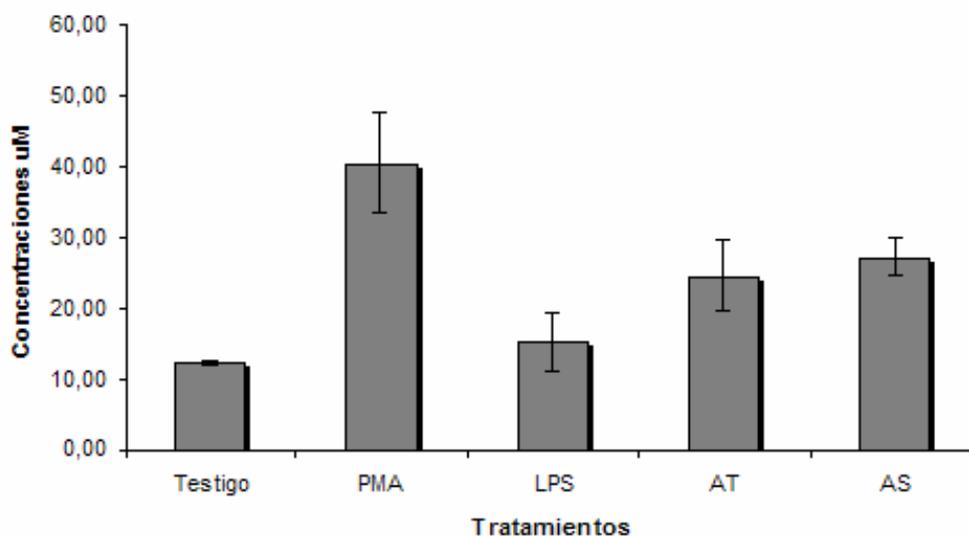


Figura 8. **Producción de Óxido Nítrico en cultivos de intestinos de *A. albimanus*.** En el eje “y” se muestran las concentraciones en  $\mu\text{M}$  de nitritos encontrados en el sobrenadante de los cultivos de intestinos. En el grupo Testigo (sobrenadante de cultivo de intestinos sin ningún tratamiento) la concentración encontrada fue de  $12.32 \pm 0.35 \mu\text{M}$ . En el grupo PMA (sobrenadante de cultivos de intestinos tratados con  $10\text{ng/ml}$  PMA) se encontró una concentración de nitritos de  $40.54 \pm 7.16 \mu\text{M}$ . En el grupo LPS (sobrenadante de cultivos de intestinos tratados con  $2\mu\text{g/ml}$  de LPS) se encontró una concentración de  $15.25 \pm 3.95 \mu\text{M}$ . En el grupo AT (sobrenadante de cultivo de intestinos tratados con  $10^{-7} \text{M}$  de AT) se encontró una concentración de  $24.50 \pm 4.95 \mu\text{M}$ . El grupo AS (sobrenadante de cultivo de intestinos tratados con  $10^{-7} \text{M}$  de AS) presentó una concentración de  $27.24 \pm 2.49 \mu\text{M}$ . La prueba ANOVA mostró que en el modelo existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de tratamiento  $F_{(5,6)}=77.435$ ;  $p=0.000023$ .

#### 5.4. Efecto de AT y AS-C en la capacidad fagocítica de una línea celular de *Anopheles albimanus*

La capacidad fagocítica es una de los principales efectores inmunológicos para controlar una infección en los insectos [Hillyer, 2009]. El siguiente ensayo se realizó sobre una línea celular de *A. albimanus* teniendo 4 grupos de estudio (Testigo, Control positivo con PMA, AT y AS). La figura 9 muestra el efecto producido por los tratamientos sobre la capacidad fagocítica de la línea celular. En el grupo testigo en contadas ocasiones solo se observó fluorescencia residual, lo cual resulta normal de acuerdo a las especificaciones de uso de la *E. coli* pHrodo (Invitrogen). En el tratamiento con PMA (10ng/ml) se observó una intensa fluorescencia en todas las células, lo cual indica una fuerte inducción de actividad fagocítica. Sin embargo, también es evidente la presencia de daño celular ya que se observan muchos restos celulares junto con bacterias fluorescentes fuera de células, aunado a la poca presencia de pseudópodos en las células ahí presentes.

En el caso de los tratamientos con AT y AS ( $10^{-7}$  M), también fue posible observar una fuerte inducción de fagocitosis en la línea celular. Con ambos tratamientos fue evidente un cambio morfológico en las células al compararlas con el control, pero al contrario del PMA, las células se observaron con menos daño (solo en el caso de la AS-C se observaron un poco de restos celulares) y si con abundantes pseudópodos, incluso más que en el control.

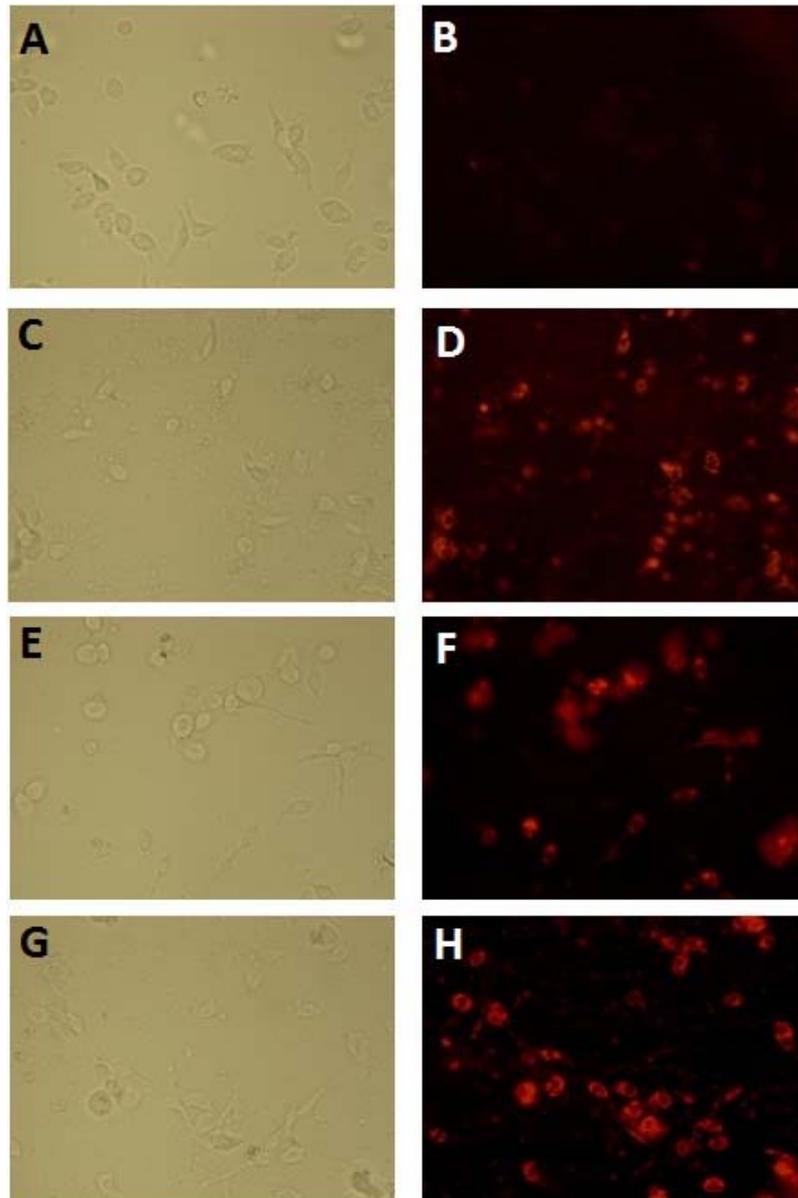


Figura 9. Efecto de los péptidos allatreguladores en la actividad fagocítica de la línea celular LSB-AA695BB de *A. albimanus*. En los diferentes grupos de estudio, la línea celular se puso a interactuar con su respectivo tratamiento por 30 min, después con bacterias *E. coli* K-12 pHrodo durante 30 min adicionales. A, B) Grupo control (sin tratamiento alguno) en el cual es posible observar que las células no fueron capaces de fagocitar bacterias, ya que no se observa fluorescencia. C, D) Tratamiento con PMA (medio adicionado con 5 ng/ml de PMA) en el cual se puede apreciar una fuerte inducción de fagocitosis y lisis celular; incluso donde no hay células (solo restos) se observan bacterias libres fluorescentes, aunado a que las células presentes prácticamente carecen de pseudópodos. E, F) Tratamiento con AT (medio adicionado con  $10^{-7}$ M de AT) en el que se observa intensa actividad de fagocitosis. Las células presentan cambios morfológicos evidentes (largos y finos pseudópodos) y aparentemente un buen estado. G, H) El tratamiento con AS (medio adicionado con  $10^{-7}$ M de AS), en términos generales, indujo el mismo efecto que la AT en esta línea celular. (A, C, E, G) Microscopía de campo claro. (B, D, F, H) Microscopía de fluorescencia. 40X.

## VI. Discusión

Actualmente sabemos que los mosquitos, al igual que todos los invertebrados, presentan una respuesta inmune del tipo innato y aunque no tienen linfocitos T o B, ni generan una memoria de larga duración, si presentan mecanismos celulares y humorales muy eficientes para eliminar agentes extraños. La respuesta humoral está centrada en la producción de péptidos antimicrobianos y en la activación del sistema de la fenoloxidasa (PO). Los péptidos antimicrobianos son producidos principalmente en el cuerpo graso y los hemocitos (células sanguíneas circulantes) respectivamente, y tienen actividad citotóxica contra bacterias e incluso parásitos. La respuesta celular está dada principalmente por los hemocitos circulantes que pueden fagocitar a las partículas extrañas o formar nódulos que las rodean y las neutralizan y además durante su formación se puede depositar melanina. El sistema de la PO consiste en una cascada proteolítica que finaliza en la activación de la enzima fenoloxidasa, la cual utiliza catecolaminas como L-Dopa y dopamina para producir melanina. Por otro lado, se ha observado que tejidos como el intestino también presentan importancia inmunológica, en donde se llegan a producir péptidos antimicrobianos y óxido nítrico [Herrera-Ortiz *et al.*, 2011]. Sin embargo, es mucho lo que desconocemos en cuanto a la regulación de estos sistemas, y el conocer qué factores pueden regularlos y cómo es que lo hacen, son preguntas esenciales para entender como en cierto momento los insectos vectores podrían responder de manera adecuada a los patógenos que transmiten.

En el presente estudio hemos mostrado evidencias que sugieren una relación estrecha del sistema neuroendocrino con el sistema inmune. Los neuropéptidos sintéticos utilizados (gentilmente donados por el Dr. Fernando Noriega, Department of Biological Sciences, Florida International University) fueron una herramienta indispensable que nos permitió evaluar el efecto de estos sobre diferentes componentes de la respuesta inmune de *A. albimanus*. Los antecedentes previos a este trabajo son escasos, pero suficientes para hacernos pensar que esta relación puede existir y estimularnos a para comenzar la exploración de nuestra hipótesis. En dichos antecedentes se observó que en *A. albimanus* los niveles de AT se incrementan en presencia de parásitos de malaria en el lumen intestinal, y que la AT afecta la morfología de los hemocitos (induciendo la formación de filopodios y adhesión a vidrio), lo que nos indicó la posible participación de los péptidos allatoreguladores en la regulación del sistema inmune en el mosquito [Hernández Martínez *et al.*, datos no publicados].

Como se pudo observar en los resultados, no todos los componentes del sistema inmune analizados fueron afectados por los neuropéptidos utilizados. En el caso de la actividad de PO no se observaron diferencias significativas entre los grupos control y los tratamientos con los neuropéptidos, pero si en el tratamiento con levadura (control positivo). En el caso de las levaduras, el resultado fue el esperado, debido a que previamente se ha reportado que estas son rápidamente melanizadas (proceso mediado por la actividad de la fenoloxidasa) al ser inoculadas al hemocele [Hernández-Martínez *et al.*, 2002].

El resultado puede tener varias explicaciones, y la más cercana podría ser que este sistema no presenta una conexión directa con los niveles de AT o AS-C en la hemolinfa. Al revisar los componentes de la cascada proteolítica del sistema de la PO (sistema de la fenoloxidasa) [Cerenius *et al.*, 2004] no es posible deducir la existencia de algún paso en el cual los neuropéptidos pudieran tener algún efecto. Una posibilidad de regulación, podría ser a nivel de receptores de membrana en hemocitos, ya que se sabe que en estos se puede encontrar compartamentalizada la PO [Nayar y Bradley, 1994; Hernández-Martínez *et al.*, 1999]. Sin embargo, debido al diseño de los experimentos, no fue posible evaluar esta opción, ya que en el proceso de obtención de la hemolinfa no se tuvo la precaución de mantener la integridad de los hemocitos. De tal modo que la realización de estudios más detallados, separando el plasma y hemocitos intactos, serán necesarios en el futuro para determinar de manera más precisa si los neuropéptidos allatoreguladores pueden regular la actividad de PO. Finalmente, si comparamos estos resultados con los obtenidos en los estudios de Oxido nítrico, péptidos antimicrobianos y fagocitosis, resulta positivo el hecho de que los neuropéptidos utilizados no afectan de manera indistinta a cualquiera de los componentes de la respuesta inmune en el mosquito.

Como se mencionó en los antecedentes, resultados preliminares mostraron que un análogo de la HJ si podría estar afectando la actividad de PO en la hemolinfa de mosquitos *Aedes* (Fig. 5). En adición, los resultados actuales muestran que si bien la AS-C y AT no afectan de manera directa la actividad de PO, si podrían hacerlo indirectamente por medio de la regulación de la biosíntesis de JH [Li *et al.*, 2003, 2003a, 2004].

Al igual que el sistema de la PO, los péptidos antimicrobianos juegan un papel muy importante en la respuesta inmune humoral de los insectos [Cociancich *et al.*, 1993, 1994; Chalk *et al.*, 1995; Meister *et al.*, 1997]. Por tal motivo decidimos realizar los ensayos que nos permitieran evaluar el efecto de la AT y AS-C en su expresión. Es importante mencionar que a la fecha, el modelo de producción de péptidos antibacterianos (AMPs) en *Drosophila* es el que mejor se ha estudiado, y en el cual sabemos que la respuesta pueden estar regulada por dos vías de transducción de señales: 1) la vía de señalización Toll, que responde principalmente por infecciones de bacterias Gram positivas y hongos. En *Drosophila* se activa con la translocación al núcleo de un factor llamado Dif el cual no tiene ortólogo en *Anopheles* y uno de los genes que induce es la drosomicina. 2) la vía de deficiencia inmune (IMD), que es activada por infecciones de bacterias Gram negativas. Al activarse se da la translocación del factor nuclear Relish, lo que resulta en la inducción de varios AMPs, incluyendo cecropina, atacina, drosomicina y diptericina. El uso de ambas formas de regulación de genes que codifican para AMPs puede ser un mecanismo eficiente para adaptar la respuesta antimicrobial produciendo AMPs específicos para diferentes microorganismos [Tzou *et al.*, 2002, Meister *et al.*, 2005].

Los datos obtenidos respecto a la producción de péptidos antimicrobianos mostraron una clara inducción de transcritos en el intestino de *A. albimanus* después del tratamiento con AT o AS-C (Fig. 7). Como se pudo observar, los tratamientos con LPS sobre expresaron la producción de transcritos de atacina y gambicina (regulados por la vía IMD y Toll respectivamente) y no así la de cecropina (regulada por la vía IMD). Es de

hacer notar que aun cuando la vía IMD es la que se ha asociado a bacterias Gram negativas y la Toll a positivas [Meister *et al.*, 2005], esto no es del todo tajante, ya que dependiendo del tipo de estímulo podrían ser activadas ambas vías (la gambicina es regulada por la vía Toll). Por otro lado, la falta de inducción de transcritos de Cecropina, es probable que este relacionada al estímulo realizado con LPS, y que muy posiblemente en este caso otros componentes de la bacteria sean requeridos para que ocurra la inducción de producción de cecropina.

En el caso de los intestinos tratados con AT y AS-C el resultado fue muy similar. Ambos péptidos indujeron una sobreproducción de transcritos para los 3 péptidos antimicrobianos analizados, siendo la cecropina y la gambicina los mejor inducidos. Este resultado es muy interesante ya que la cecropina y gambicina son regulados por vías diferentes, lo que sugiere que el posible sitio blanco para estos péptidos podría estar a un nivel más arriba de la translocación nuclear de Dif o Relish. Recientemente se reportó la caracterización funcional y molecular de dos receptores parálogos para AS-C en *A. aegypti*. La secuencia predicha de aminoácidos mostró algunas características presentes en receptores acoplados a proteína G (GPCRs), tales como 7 dominios transmembranales, sitios amino de glicosilación y sitios conservados de motivos “DRY”, los cuales están involucrados en la activación de GPCRs [Mayoral *et al.*, 2010]. En este estudio, además se analizó la expresión cuantitativa de los genes de estos receptores en diferentes tejidos del mosquito, y se encontró que uno de los que presentó niveles más elevados de RNAm fueron los túbulos de Malpighi, los cuales forman parte del sistema excretor del mosquito que se encuentra estrechamente ligado al intestino.

El dato anterior es muy importante, debido a que el análisis que realizamos en el presente trabajo con los intestinos en cultivo de *A. albimanus* también tuvieron presentes los túbulos de Malpighi, y posiblemente de ellos provienen los péptidos antimicrobianos que fueron evaluados. Lo anterior es apoyado por estudios previos que demuestran que los túbulos de Malpighi pueden funcionar con un órgano inmune autónomo, el cual es capaz de censar la hemolinfa y en presencia de bacterias producir péptidos antibacterianos [McGettigan *et al.*, 2005].

Respecto al resultado obtenido del efecto de la AT y la AS-C sobre la producción de óxido nítrico, encontramos que los neuropéptidos si inducen una producción significativa de este metabolito con respecto al control. El PMA fue el mejor inductor de ON, este fue un resultado esperado, ya que datos previos han demostrado que el intestino de mosquitos tiene la capacidad de producir ON después de un estímulo [Luckhart *et al.*, 1998; Herrera-Ortiz *et al.*, 2004], y las sales de forbolmiristato han sido empleadas para inducir el estallido respiratorio en macrófagos de mamíferos [Iribarren *et al.*, 2002]. En este sentido, la alta inducción de ON producida por el PMA se debe a que este compuesto es un potente activador inespecífico de respuesta celular y en los ensayos nos fue muy útil como control positivo. En el caso de la AT y AS-C, aun que en menor intensidad respecto al PMA, si se observó una clara inducción en la producción y liberación de ON, la cual fue estadísticamente significativa. A la fecha no sabemos a qué nivel estos neuropéptidos podrían estar estimulando la producción de ON, sin embargo McGettigan y cols. [2005] han reportado que los túbulos de Malpighi presentan una respuesta inmune que utiliza la vía de señalización de ON. Lo anterior sugiere fuertemente que

los neuropéptidos AT y AS pueden tener una participación muy importante en la regulación de este tipo de respuesta. Por lo cual, se sugieren estudios futuros en los cuales se trate de identificar el sitio blanco (a donde se unen) de la AT y la AS-C en el intestino de *A. albimanus*, asimismo estudios encaminados a bloquear pasos en la vía de síntesis de ON durante la estimulación con los péptidos, que nos proporcionen una idea más clara del mecanismo molecular.

El efecto observado del LPS en la producción de ON, también fue el esperado (se utilizó en ensayo como un control negativo). El LPS es el componente principal de la pared celular de bacterias Gram negativas, y previamente se ha reportado que este tipo de bacterias no inducen la generación de ON en cultivos de intestino de mosquito [Herrera-Ortiz *et al.*, 2004].

Finalmente, los resultados de estudios de fagocitosis realizados utilizando la línea celular LSB-AA695BB, fueron altamente estimulantes para reforzar la idea de que la AT y la AS participan de manera importante en la regulación de la respuesta inmune del mosquito. Uno de los problemas más importantes que nos hemos enfrentado durante años para estudiar la respuesta celular de mosquitos (como la fagocitosis), es precisamente la dificultad para obtener un número adecuado de células fagocíticas (hemocitos) para la realización de ensayos *in vitro* [Hernández *et al.*, 1999]. La línea celular LSB-AA695BB, originalmente obtenida de embriones de *A. albimanus* [Bello *et al.*, 1997], no tiene caracterizado de manera precisa su origen. En el presente estudio hemos demostrado que estas células presentan una potente capacidad fagocítica que puede ser inducida con activadores inespecíficos de la respuesta

inmune, como el PMA, o con péptidos allatoreguladores (figura 9). Por lo anterior se proponen como un excelente modelo para el estudio de diferentes aspectos relacionados a la respuesta inmune celular.

Algunos resultados preliminares ya habían demostrado que la AT y AS ejercían algún efecto sobre los hemocitos de *A. albimanus* (figura 3) y *A. aegypti* (dato no mostrado). Dicho efecto consistió en una fuerte inducción de formación de pseudópodos. Con la línea celular LSB-AA695BB, encontramos que también se presenta una “transformación celular” aunado a la intensa fagocitosis observada. A diferencia, en los tratamientos con PMA no se presentó la formación tan marcada de pseudópodos, pero si fagocitosis y marcada lisis celular. La lisis celular pudo deberse a una sobre estimulación del estallido respiratorio [Iribarren et al., 2002], a pesar de haber utilizado el PMA a la concentración recomendada por el proveedor (utilizada en leucocitos), por lo cual se propone en el futuro la realización de una cinética de concentración de PMA para descartar esta posibilidad. De hecho, las células bajo este tratamiento siempre se observaron más redondeadas que en el control o las tratadas con AT y AS-C.

El mecanismo de acción de la AT y AS-C en la línea celular, lo desconocemos, pero es muy probable que puedan estar actuando como opsoninas o que existan receptores de membrana (también en hemocitos) que reconozcan a los neuropéptidos y activen vías de señalización involucradas en el proceso de fagocitosis. Un hecho importante, es que actualmente se tiene identificados receptores de superficie (Mayoral *et al.*, 2010) para AS-C, los cuales podrían tratar de ser identificados en hemocitos, y bloqueados con anticuerpos para analizar si se previene la activación de fagocitosis con los

neuropéptidos. Un dato preliminar en el grupo que apoya esta idea, es que durante estudios de conjugación de estos péptidos (AT y AS-C) a nanocristales fluorescentes (para identificar los sitios blanco en el mosquito), se observó que gran cantidad de hemocitos son decorados (aparentemente en su superficie) con estos conjugados (datos no publicados). Lo anterior se suma a toda esta serie de evidencias que soportan la idea de que la presencia (niveles) de AT y AS-C en la hemolinfa regulen algunas de las funciones inmunes en el mosquito.

Los resultados generados a partir del presente trabajo tienen un gran impacto en conocer una posible vía de regulación del sistema inmune de insectos y abren una serie de posibilidades para realizar estudios futuros encaminados a comprender aspectos evolutivos, fisiológicos, celulares, moleculares y genéticos de esta interacción. En particular, este conocimiento podría impactar de forma directa en el desarrollo de nuevas estrategias encaminadas al control de vectores de enfermedades infecciosas, como es el caso de los mosquitos *Anopheles* empleados en el presente estudio. Asimismo, las características propias del trabajo lo hacen de mayor interés al poder ser extrapolado a otras especies de mosquitos, dado que los péptidos empleados se encuentran altamente conservados en estos insectos [Li *et al.*, 2006].

## VII. Conclusiones

Por primera vez se muestran datos en los cuales se demuestra que existe una estrecha relación entre neuropéptidos que participan en la regulación hormonal del mosquito y el sistema inmune.

El sistema de la PO forma parte importante del sistema inmune humoral de los mosquitos, que a pesar de no ser afectado por los péptidos allatoreguladores, es importante observar que no todos los parámetros inmunes evaluados son afectados por estos péptidos.

La AT y AS-C inducen la expresión de mensajeros para péptidos antimicrobianos que son regulados por las vías IMD y Toll, y aunque aún desconocemos el mecanismo molecular por el cual ocurre esto, el resultado es de gran valor para la elaboración de estudios futuros utilizando líneas celulares inmunocompetentes de mosquito.

El óxido nítrico es otro componente que sabemos presenta una participación importante en la respuesta de mosquitos contra patógenos, los resultados presentados sugieren fuertemente la existencia de un mecanismo de regulación en su producción que puede estar mediado por péptidos allatoreguladores en el intestino de mosquitos.

Finalmente, podemos concluir que la línea celular LSB-AA695BB de *A. albimanus*, se convierte en un excelente modelo para diferentes estudios relacionados a la respuesta inmune celular de mosquitos. Asimismo, en combinación con antecedentes previos, se concluye que la AT y AS-C actúan directamente sobre la actividad fagocítica de dicha línea celular.

## VIII. Referencias

Aballay A. **Neural regulation of immunity: Role of NPR-1 in pathogen avoidance and regulation of innate immunity.** *Cell Cycle* 2009, 8(7): 966-969

Adamo AS. **Comparative psychoneuroimmunology: Evidence from the insects.** *Behavioral and Cognitive Neuroscience Reviews* 2006, 5(3): 128-140

Beckage NE. **Insect Immunology.** First edition. Editorial Elsevier 2008 ISBN: 978-0-12-373976-6 2008

Bello FJ, Brochero H, Boshell J, Olano V, Rey G. **Establishment and characterization of a cell line from the mosquito *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae).** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 1997, 92(1): 123-128

Blandin S, Levashina EA. **Mosquito immune responses against malaria parasites.** *Current Opinion in Immunology* 2004a, 16(1):16-20

Blandin S, Levashina EA. **Thioester-containing proteins and insect immunity.** *Molecular Immunology* 2004b, 40(12):903-8

Blandin S, Moita LF, Köcher T, Wilm M, Kafatos FC, Levashina EA. **Reverse genetics in the mosquito *Anopheles gambiae*: targeted disruption of the Defensin gene.** *EMBO Reports* 2002, 3(9):852-6.

Boucher JL, Moali C, Tenu JP. **Nitric oxide biosynthesis, nitric oxide synthase inhibitors and arginase competition for L-arginine utilization.** *Cell and Molecular Life Science* 1999, 55(8-9):1015- 1028

Brey PT, Hultmark D. **Molecular mechanisms of immune responses in insects.** First Edition 1998. Editorial Chapman & Hall, London UK.

Castillo JC, Robertson AE, Strand MR. **Characterization of hemocytes from the mosquitoes *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti*.** *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 2006, 36(12):891-903

CDC: Centers for Disease Control and Prevention. Department of health and human services. 2010 <http://www.cdc.gov/spanish/>

Cerenius L, Söderhäll K. **The prophenoloxidase-activating system in invertebrates.** *Immunological Reviews* 2004, 198: 116-126

Chalk R, Albuquerque CM, Ham PJ, Townson H. **Full sequence and characterization of two insect defensins: immune peptides from the mosquito *Aedes aegypti*.** *Proceedings Biological Sciences*. 1995, 22;261(1361):217-21.

Cociancich S, Bulet P, Hoffmann JA. **The inducible antibacterial peptides of insects.** *Parasitology Today* 1994, 10:132-139

Cociancich S, Goyffon M, Bontems F, Bulet P, Bouet F, Menez A, Hoffmann J. **Purification and characterization of a scorpion defensin, a 4kDa antibacterial peptide presenting structural similarities with insect defensins and scorpion toxins.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1993, 194(1):17-22

Contreras-Garduño J, Córdoba-Aguilar A, Lanz-Mendoza H, Cordero-Rivera A. **Territorial behaviour and immunity are mediated by juvenile hormone: the physiological basis of honest signalling.** *Functional Ecology* 2009, 23: 159-163

DGE. Dirección General de Epidemiología 2008, <http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/indice-2010.htm>

Dimopoulos G. **Insect immunity and its implication in mosquito-malaria interactions.** *Cellular Microbiology* 2003, 5(1):3-14

Dimopoulos G, Müller HM, Levashina EA, Kafatos FC. **Innate immune defense against malaria infection in the mosquito.** *Current Opinion in Immunology* 2001, 13(1):79-88

Dimopoulos G, Casavant TL, Chang S, Scheetz T, Roberts C, Donohue M, Schultz J, Benes V, Bork P, Ansorge W. ***Anopheles gambiae* pilot gene discovery project: identification of mosquito innate immunity genes from expressed sequence tags generated from immune-competent cell lines.** *Proceedings of the National Academy of Science USA* 2000, 97:6619-6624

Flatt T, Heyland A, Rus F, Porpiglia E, Sherlock C, Yamamoto R, Garbuzov A, Palli SR, Tatar M, Silverman N. **Hormonal regulation of the humoral innate immune response in *Drosophila melanogaster*.** *Journal of Experimental Biology* 2008, 211:2712-2724

Flatt T, Meng-Ping T, Tatar M. **Hormonal pleiotropy and the juvenile hormone regulation of *Drosophila* development and life history.** *BioEssays* 2005, 27:999-1010

Gokhale K, Patole M, Shouche YS. **Understanding *Anopheles* and *Plasmodium* interactions: lessons from the real World.** *Journal of Bioscience* 2007, 32:(6)

Gillespie JP, Kanost MR, Trenczek T. **Biological mediators of insect immunity.** *Annual Review of Entomology* 1997, 42: 611-643

Hernández-Martínez S, Lanz H, Rodríguez MH, Torres JA, Martínez-Palomo A, Tsutsumi V. **Morphological and cytochemical characterization of female *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae) hemocytes.** *Journal of Medical Entomology* 1999, 36(4):426-34

Hernández-Martínez S, Mayoral JG, Li Y, Noriega FG. **Role of juvenile hormone and allatotropin on nutrient allocation, ovarian development and survivorship in mosquitoes.** *Journal of Insect Physiology* 2007, 53: 230- 234

Hernández-Martínez S, Li Y, Lanz-Mendoza H, Rodríguez MH, Noriega FG. **Immunostaining for allatotropin and allatostatin-A and C in the mosquitoes *Aedes aegypti* and *Anopheles albimanus*.** *Cell and Tissue Research* 2005, 321:105-113

Hernández-Martínez S, Lanz H, Rodríguez MH, González-Ceron L, Tsutsumi V. **Cellular-mediated reactions to foreign organisms inoculated into the hemocoel of *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae).** *Journal of Medical Entomology* 2002, 39(1):61-9

Herrera-Ortíz A, Lanz-Mendoza H, Martínez-Barnette J, Hernández-Martínez S, Villarreal-Treviño C, Aguilar-Marcelino L, Rodríguez MH. ***Plasmodium berghei* ookinetes induce nitric oxide production in *Anopheles pseudopunctipennis* midguts cultured *in vitro*.** *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 2004, 34: 893–901

Herrera-Ortíz A, Martínez-Barnette J, Smit N, Rodríguez MH, Lanz-Mendoza H. **The effect of nitric oxide and hydrogen peroxide in the activation of the systemic immune response of *Anopheles albimanus* infected with *Plasmodium berghei*.** *Developmental & Comparative Immunology* 2011, 35(1): 44-50

Hillyer JF, Estévez-Lao TY. **Nitric oxide is an essential component of the hemocyte-mediated mosquito immune response against bacteria.** *Developmental and Comparative Immunology* 2010, 34: 141–149

Hillyer JF. **Transcription in mosquito hemocytes in response to pathogen exposure.** *Journal of Biology* 2009, 8: 51.

Hillyer JF, Schmidt SL, Christensen BM. **Rapid phagocytosis and melanization of bacteria and *Plasmodium* sporozoites by hemocytes of the mosquito *Aedes aegypti*.** *The Journal of Parasitology* 2003, 89(1):62-9.

Hoffmann JA. **Innate immunity of insects.** *Current Opinion in Immunology* 1995, 7(1): 4-10.

Hultmark D. Immune reactions in *Drosophila* and other insects: a model for innate immunity. *Trends in Genetics* 1993, 9(5): 178-183.

- Iribarren P, Correa SG, Sodero N, Riera CM. **Activation of macrophages by silicones: phenotype and production of oxidant metabolites.** *BMC Immunology* 2002, 3:6.
- Kataoka H, Troetschler RG, Li JP, Kramer SJ, Carney RL, Schooley DA. **Isolation and identification of a diuretic hormone from the tobacco hornworm, *Manduca sexta*.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989, 86(8):2976-80.
- Kylsten P, Samakovlis C, Hultmark D. **The cecropin locus in *Drosophila*: a compact gene cluster involved in the response to infection.** *EMBO Journal* 1990, 9(1): 217-224.
- Lackie AM. **Immune mechanisms in insects.** *Parasitology Today* 1988, 4(4):98-105.
- Lanz-Mendoza H, Hernández-Martínez S, Ku-López M, Rodríguez MC, Herrera-Ortiz A, Rodríguez MH. **Superoxide anion in *Anopheles albimanus* hemolymph and midgut is toxic to *Plasmodium berghei* ookinetes.** *The Journal of Parasitology* 2002, 88(4): 702-6.
- Lavine MD, Strand MR. **Insect haemocytes and their role in immunity.** *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 2002, 32:1295-1309
- Levashina EA, Moita LF, Blandin S, Vriend G, Lagueux M, Kafatos FC. **Conserved role of a complement-like protein in phagocytosis revealed by dsRNA knockout in cultured cells of the mosquito, *Anopheles gambiae*.** *Cell* 2001, 104(5): 709-18.
- Li Y, Hernández-Martínez S, Facundo-Fernández F, Mayoral JG, Topalis P, Priestap H, Perez M, Navare A, Noriega FG. **Biochemical, molecular, and functional characterization of PISCF-allatostatin, a regulator of juvenile hormone biosynthesis in the mosquito *Aedes aegypti*.** *The Journal of Biological Chemistry* 2006, 281(45): 34048 - 34055
- Li Y, Hernandez-Martinez S, Noriega FG. **Inhibition of juvenile hormone biosynthesis in mosquitoes: effect of allatostatic head factors, PISCF- and YXFGL-amide-allatostatins.** *Regulatory Peptides* 2004, 118: 175- 182.
- Li Y, Unnithan GC, Veenstra JA, Feyereisen R, Noriega FG. **Stimulation of JH biosynthesis by the corpora allata of adult female *Aedes aegypti* in vitro: effect of farnesoic acid and *Aedes* allatotropin.** *Journal of Experimental Biology* 2003, 206: 1825-1832.
- Li S, Falabella P, Kuriachan I, Bradleigh Vinson S, Borst DW, Malva C, Pennacchio F. **Juvenile hormone synthesis, metabolism, and resulting haemolymph titer in *Heliothis virescens* larvae parasitized by *Toxoneuron nigriceps*.** *Journal of Insect Physiology* 2003, 49:1021-1030

Luckhart S, Vodovotz Y, Cui L, Rosenberg R. **The mosquito *Anopheles stephensi* limits malaria parasite development with inducible synthesis of nitric oxide.** *Proceedings of the National Academy of Science* 1998, 12; 95(10):5700-5

Manetti AG, Rosetto M, de Filippis T, Marchini CT, Baldari CT, Dallai R. **Juvenile Hormone regulates the expression of the gene encoding Ceratotoxin A, an antibacterial peptide from the female reproductive accessory glands of the medfly *Ceratitis capitata*.** *Journal of Insect Physiology* 1997, 34(43):1161-1167

Matuschewski K. **Getting infectious: formation and maturation of *Plasmodium* sporozoites in the *Anopheles* vector.** *Cellular Microbiology* 2006, 8(10):1547-56

Mayoral JG, Nouzova M, Brockhoff A, Goodwin M, Hernandez-Martinez S, Richter D, Meyerhof W, Noriega FG. **Allatostatin-C receptors in mosquitoes.** *Peptides* 2010, 31: 442-450.

McGettigana J, McLennana RKJ, Brodericka KE, Keana L, Allana AK, Cabreroa P, Regulskib MR, Pollocka VP, Gouldc GW, Daviesa S-A, Dow JAT. **Insect renal tubules constitute a cell-autonomous immune system that protects the organism against bacterial infection.** *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 2005, 35: 741-754.

Medzhitov R, Janeway CA Jr. **Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system.** *Science* 2002, 296(5566):298-300

Meister M, Lemaitre B, Hoffman JA. **Antimicrobial peptide defense in *Drosophila*.** *BioEssays* 1997, 19: 1019-1026

Meister S, Kanzok SM, Zheng XL, Luna C, Li TR, Hoa NT, Clayton JR, White KP, Kafatos FC, Christophides GK, Zheng L. **Immune signaling pathways regulating bacterial and malaria parasite infection of the mosquito *Anopheles gambiae*.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2005, 102: 11420-11425.

Moita LF, Vriend G, Mahairaki V, Louis C, Kafatos FC. **Integrins of *Anopheles gambiae* and a putative role of a new beta integrin, BINT2, in phagocytosis of *E. coli*.** *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 2006, 36(4):282-90

Müller HM, Dimopoulos G, Blass C, Kafatos FC. **A hemocyte-like cell line established from the malaria vector *Anopheles gambiae* expresses six prophenoloxidase genes.** *The Journal of Biology Chemistry* 1999, 274:11727-117

Nappi AJ, Christensen BM. **Melanogenesis and associated cytotoxic reactions: Applications to insect innate immunity.** *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 2005, 35: 443-459.

Nappi AJ, Vass E, Frey F, Caron Y. **Nitric oxide involvement in *Drosophila* immunity.** *Nitric Oxide* 2000, 4(4): 423-430.

Nayar JK, and Bradley TJ. **Comparative study of hemolymph phenoloxidase activity in *Aedes aegypti* and *Anopheles quadrimaculatus* and its role in encapsulation of *Brugia malayi* microfilariae.** *Comp. Biochem. Physiol.* 1994, 109A: 929-938.

Oeh U, Lorenz MW, Dyker H, Lösel P, Hoffmann KH. **Interaction between *Manduca sexta* allatotropin and *Manduca sexta* allatostatin in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*.** *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 2000, 30: 719-727.

Osta MA, Christophides GK, Vlachou D, Kafatos FC. **Innate immunity in the malaria vector *Anopheles gambiae*: comparative and functional genomics.** *Journal of Experimental Biology* 2004b, 207:2551-2563

Ramos-Castañeda J, Cassandra González MA, Jiménez JD, Hernández-Martínez S, Rodríguez MH, Lanz-Mendoza H. **Effect of Nitric Oxide on Dengue Virus Replication in *Aedes aegypti* and *Anopheles albimanus*.** *Intervirology* 2008, 51: 335-341

Rantala MJ, Vainikka A, Kortet R. **The role of juvenile hormone in immune function and pheromone production trade-offs: a test of the immunocompetence handicap principle.** *Proceedings of the Royal Society London B* 2003, 270: 2257-2261

Rizki RM, Rizki TM. **Selective destruction of a host blood cell type by a parasitoid wasp.** *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1984, 81:6154

Schedlowski M, Benschop RJ. **Neuroendocrine system and immune functions: Psychoneuroimmunology.** *Editorial Kluwer Academic/Plenum* 1999, 185-222

Stay B. **A review of the role of neurosecretion in the control of juvenile hormone synthesis: a tribute to Berta Scharrer.** *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 2000, 30:653-62

Shahabuddin M, Fields I, Bulet P, Hoffmann JA, Miller LH. ***Plasmodium gallinaceum*: differential killing of some mosquito stages of the parasite by insect defensin.** *Experimental Parasitology* 1998, 89(1):103-12

Tzou P, De Gregorio E, Lemaitre B. **How *Drosophila* combats microbial infection: a model to study innate immunity and host-pathogen interactions.** *Curr Opin Microbiol* 2002, 5: 102-110.

Vizioli J, Bulet P, Charlet M, Lowenberger C, Blass C, Müller HM, Dimopoulos G, Hoffmann J, Kafatos FC, Richman A. **Cloning and analysis of a cecropin**

**gene from the malaria vector mosquito, *Anopheles gambiae*.** *Insect Molecular Biology* 2000, 9:75-84

Vargas-Villavicencio JA, De León-Nava MA, Morales-Montor J. ***Immunoendocrine mechanisms associated with resistance or susceptibility to parasitic diseases during pregnancy.*** *Neuroimmunomodulation.* 16(2):114-21, 2009

Vargas-Villavicencio JA, Larralde C, Morales-Montor J. ***Gonadectomy and progesterone treatment induce protection in murine cysticercosis.*** *Parasite Immunol.* 28(12):667-74, 2006

Veenstra JA, Costes L. **Isolation and identification of a peptide and its cDNA from the mosquito *Aedes aegypti* related to *Manduca sexta* allatotropin.** *Peptides* 1999, 20: 1145–1151.

Vlachou D, Kafatos FC. **The complex interplay between mosquito positive and negative regulators of *Plasmodium* development.** *Current Opinion in Microbiology* 2005a, 8(4):415-21

WHO 2010, World Health Organization. <http://www.who.int/en/>

Weigent DA, Blalock JE. **Associations between the neuroendocrine and immune systems.** *Journal Leukocyte Biology.* 1995, 58(2):137-50

Weaver RJ, Audsley N. **Neuropeptide regulators of juvenile hormone synthesis: structures, functions, distribution, and unanswered questions.** *Annals of the New York Academy of Sciences* 2009, 1163:316-29

# IX. Apéndices

## 1. *PBS 1X*

140 mM	NaCl
2.6 mM	KCl
1.5 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
20.4 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
pH 7.4	

Se disuelven las sales en H<sub>2</sub>O destilada, se ajusta el pH y se esteriliza por autoclave.

## 2. *Levaduras*

Se pesa 10ug de levaduras *Saccharomyces cerevisiae*, se agrega 2 ml de agua miliQ y se inactivan por calor (10 minutos en baño maría a 100°C). Se cuentan en cámara de Neubauer para obtener alícuotas correspondientes a 4000 lev/ $\mu$ l y se guardan a 4°C.

## 3. *Inhibidores de proteasas*

2mM	fenil metil sulfonil floururo (PMSF)
0.1mM	N $\beta$ -p-tosyl-L-lisine clorometil cetone (TLCK)
1mM	EDTA
0.1 mg/ml	Leupeptina

Las soluciones se preparan y se guardan por separado en alícuotas de 20 $\mu$ l a -20°C.

#### *4. Método de Bradford*

El reactivo se mezcla por agitación antes de utilizarse. Se prepara una curva de concentraciones conocidas de proteínas, diluyendo un Stock de albúmina sérica (BSA, por sus siglas en inglés) en agua destilada. Las concentraciones para la curva son 1, 5, 10, 15, 25  $\mu\text{g/ml}$ . En la placa de ELISA se coloca 100  $\mu\text{l}$  por pozo de blanco (agua destilada), las diluciones de BSA y las muestras problema en una dilución conveniente. Se agregan 100  $\mu\text{l}$  de reactivo de Bradford a cada pozo y se mezcla. Se lee la absorbancia a 595nm.

#### *5. Agua- DEPC*

Por cada 1000 ml de agua se agregar 1ml de 0.1% (v/v) de dietilpirocarbonato (DEPC). Se agita toda la noche y se autoclavea al día siguiente.