

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA

ESCUELA DE SALUD PÚBLICA DE MÉXICO

**PARTICIPACIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO Y PERÓXIDO DE HIDRÓGENO
GENERADOS POR EL INTESTINO DE *Anopheles albimanus* DURANTE
LA INFECCIÓN POR *Plasmodium berghei* EN LA INDUCCIÓN DE
RESPUESTA INMUNE SISTÉMICA DEL MOSQUITO.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

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

P R E S E N T A

M. EN C. ANTONIA HERRERA ORTIZ

Director: Dr. Humberto Lanz Mendoza

Asesores: Dr. Lourival Domingos Possani Postay

Dr. Mario Zurita Ortega

Dr. Jesús Martínez Barnetche

CUERNAVACA, MORELOS

2010

No tenía miedo a las dificultades: lo que la asustaba era la obligación de tener que escoger un camino. Escoger un camino significaba abandonar otros.
Paulo Coelho (1947-?) Escritor brasileño.

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Infección e Inmunidad del Centro de Investigaciones sobre enfermedades infecciosas del Instituto Nacional de Salud Pública, bajo la dirección del Dr. Humberto Lanz Mendoza.

DEDICATORIA

A Miguel, Samuel y Paola:

Con todo mi amor, especialmente para ustedes.

Son una gran bendición, un estímulo muy importante para mí.

Gracias Migue, por compartir tu vida conmigo, por tu gran paciencia, tu amor, el apoyo que me brindas...Te amo.

Chaparritos, gracias por toda la alegría que proyectan, por sus travesuras, sus risas, su amor...

la felicidad que le inyectan a mi vida. Los amo.

A mis padres:

Mary y Doroteo,

Gracias por todo lo que me han dado,
me ayudaron a crecer y ser lo que soy ahora.

Gracias, los amo, admiro y respeto.

A mis hermanos:

Horte, Gela, Chayo y Doro,

Por todo su apoyo, cariño y comprensión.

¡Los quiero mucho!

AGRADECIMIENTOS

- A todos mis maestros de la Escuela de Salud Pública de México, que de alguna manera contribuyeron a mi formación profesional y me siento orgullosa de ser egresada de esta institución.
- Al Dr. Humberto Lanz Mendoza por su dirección y apoyo para la realización de este trabajo.
- A los doctores Mario Zurita, Lourival Possani y Jesús Martínez, quienes formaron parte del comité tutorial, gracias por sus acertados comentarios para el buen desarrollo del trabajo.
- A Dr. Mario H. Rodríguez. Dr. Fidel de la Cruz Hernández y Dra. Alejandra Bravo, quienes revisaron cuidadosamente este escrito y me brindaron sus comentarios y sugerencias para la mejor presentación este trabajo.
- A Rosa Elena Gómez, Salvador Hernández, Maria del Carmen Rodríguez, Marbella Ovilla y todos mis compañeros del grupo de Malaria y Dengue, que me ayudaron y enseñaron mucho sobre el trabajo de investigación.
- Especialmente a Romelia, encargada del insectario, quien me proporcionó mosquitos para la realización de este trabajo.
- A todos mis amigos...

ÍNDICE

	Abreviaturas.	8
I.	Resumen.	9
II.	Introducción.	10
	1. Cuadro clínico de la enfermedad.	
	2. Situación mundial del paludismo.	
	3. El paludismo en México.	
	4. Parásitos causantes del paludismo.	
	5. Ciclo de Vida de <i>Plasmodium</i> .	
	6. Respuesta inmune de mosquitos.	
	A. Mecanismos generales de defensa.	
	B. Mecanismos específicos de defensa.	
	7. Vías de señalización en respuesta inmune	
III.	Antecedentes.	30
	1. Cómo se produce el óxido nítrico.	
	2. Mecanismos de acción del Óxido Nítrico.	
	3. Papel del Óxido Nítrico en la respuesta inmune contra malaria en el humano.	
	4. Papel del Óxido Nítrico en la respuesta inmune en invertebrados	
	5. Peróxido de hidrógeno.	
IV.	Justificación.	41
V.	Hipótesis.	42
VI.	Objetivos.	43
VII.	Resultados.	44
VIII.	Discusión.	58
IX.	Conclusiones.	64
X.	Perspectivas.	55
XI.	Bibliografía.	68
XII.	Anexo 1.	73

ABREVIATURAS

Ag-STAT: STAT de *Anopheles gambiae*

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ARN: Ácido ribonucleico.

cDNA: ADN copia

cGMP: Guanosin monofosfato cíclico.

dATP: Desoxi-adenina trifosfato.

dCTP: Desoxi-citocina trifosfato.

dGTP: Desoxi-guanina trifosfato.

dTTP: Desoxi-timina trifosfato.

DFH: 1-acetil-2 fenilhidracina

DNasa I: Desoxirribonucleasa I.

FAD: Flavin adenin dinucleótido.

FMN: Flavin mononucleótido.

FO: Fenoloxidasas.

GNBP: Proteína de unión a bacterias Gram negativas

HpRT: Hipoxantina ribosil transferasa.

ICHIT: Proteína putativa de unión a quitina.

IGALE20: Lectina gal putativa

IFN- γ : Interferón γ .

IL: Interleucina.

ISPL5: Proteasa de serina.

L-DOPA: Dihidroxifenilalanina.

L-NAME: N (G)-nitro-L- arginine methyl ester

LPS: Lipopolisacárido.

MP: Membrana peritrófica.

NADPH: Dinucleótido de nicotin-adenina-

fosfato reducido.

NF- κ B: Factor nuclear- κ B.

NOS: óxido nítrico sintasa.

NO: Óxido nítrico.

OMS: Organización mundial de la salud.

PAM: Péptidos antimicrobianos

Pb: Pares de bases.

PBS: Solución amortiguadora salina de fosfatos.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

PFO: Profenoloxidasas.

P.M.: Peso molecular.

PMSF: Fenilmetilsulfonilfluoruro.

RACE: Amplificación rápida de los extremos del cDNA.

RNIs: Reactivos intermediarios de nitrógeno.

ROIs: Reactivos intermediarios de oxígeno.

RT-PCR: Transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa.

SSA: Secretaría de salud y asistencia.

STAT: Transductor de señales y activador de la transcripción.

TNF- α : actor de necrosis tumoral α .

TGF- β : Factor de crecimiento tumoral.

TLCK: N α -Tosil-lisina-clorometilcetona.

UNICEF: "United Nations Children's Fund".

RESUMEN

La respuesta inmune de los mosquitos es importante para evitar la transmisión de enfermedades como la malaria y se ha observado que la respuesta celular y humoral y producción de péptidos antimicrobianos (PAM) son fundamentales para enfrentar al parásito. Asimismo se ha observado que la inducción de la inmunidad sistémica en el mosquito interrumpe el desarrollo del parásito de la malaria. Sin embargo, la o las moléculas que inducen la activación de la respuesta inmune en los mosquitos se desconocen. El intestino es la primera barrera de defensa en respuesta a la presencia del parásito de la malaria, y durante la invasión el epitelio intestinal produce óxido nítrico (NO) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Es posible que estas moléculas puedan participar como señales para la activación de la respuesta sistémica mediando la comunicación entre el intestino y los tejidos abdominales. En este trabajo se analizó la expresión de genes que codifican para péptidos antimicrobianos (PAM, atacina, cecropina y gambicina) en mosquitos *A. albimanus* durante la infección con *P. berghei* y el efecto del NO y el H_2O_2 en su expresión, así como su probable papel en la activación de vías de señalización involucradas en respuesta inmune. Se observó que la infección de los mosquitos con *P. berghei* induce la expresión de los PAM analizados en el tejido abdominal desde las primeras horas post-alimentación sanguínea (cuando el parásito se encuentra desarrollándose en el intestino del mosquito), demostrando que existe comunicación celular entre este epitelio y el tejido abdominal que aún no ha tenido contacto con el parásito. El tratamiento con L-NAME (N (G)-nitro-L- arginine methyl ester) y Vitamina C reduce la expresión de los PAM de *A. albimanus*, mientras que el NO y el H_2O_2 exógenos inducen su expresión en abdómenes en cultivo. La presencia de NO y H_2O_2 modifican el patrón de proteínas fosforiladas en treonina y tirosina, pero no en serina. En conclusión, el mosquito *A. albimanus* produce una respuesta inmune sistémica en la que participan el NO y el H_2O_2 , los cuales estimulan la expresión de PAM a través de la fosforilación de proteínas. Es probable que la manipulación del sistema inmune del mosquito, por medio de transgénesis, a través de los radicales libre de oxígeno, permita desarrollar estrategias para bloquear el desarrollo del parásito de la malaria e interrumpir su transmisión.

INTRODUCCIÓN.

La importancia en salud pública de los insectos, y en especial de los mosquitos, radica en que son los vectores artrópodos de enfermedades causantes de más de un millón de muertes anualmente alrededor del mundo (Bremán, 2001). Por ejemplo, la malaria o paludismo humano, causada por la infección por protozoarios parásitos obligados del género *Plasmodium*, siendo *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* y *P. malariae* los agentes causales en humanos (Hoffman, *et al.*, 1997), es transmitida por mosquitos del género *Anopheles*. Se estima que se presentan de 300 a 500 millones de casos clínicos cada año y que más de un millón de personas mueren a causa de esta enfermedad (WHO, 2005; Collins y Paskewitz, 1995). De la misma manera, los nemátodos *Wuchereria bancrofti* y *Brugia malayi* son los principales agentes etiológicos de la filariasis linfática, causando una morbilidad de más de 100 millones de individuos y son transmitidos por los insectos vectores *Aedes*, *Culex*, *Anopheles* y *Mansonia*. Cientos de miles de personas son también infectados por virus, siendo el dengue y la fiebre amarilla las enfermedades virales más importantes transmitidas por mosquitos (de los géneros *Aedes* y *Culex*).

Estas enfermedades y en particular la malaria, son muy importantes en la salud pública y en la economía del mundo y en particular en nuestro país. Se han encontrado diversos problemas para el control de esta enfermedad: 1) los mosquitos han desarrollado resistencia a los insecticidas químicos reduciendo su efectividad; 2) el parásito ha adquirido resistencia a las drogas que se usan para su tratamiento; 3) las

vacunas anti-paludismo hasta ahora probadas no han mostrado el efecto protector esperado (Phillips, 2001; Alonso, 2006). Por estas razones es necesario conocer de manera detallada la o las moléculas involucradas en la interacción del parásito con el vector, para poder desarrollar nuevas estrategias que permitan interrumpir la invasión y el desarrollo del parásito, como son: las vacunas bloqueadoras de la transmisión y la manipulación genética y producción de mosquitos transgénicos (Collins y Besansky, 1994). En fechas recientes, ha crecido el interés en el entendimiento de la respuesta inmune del mosquito pues permitiría identificar moléculas del mosquito que interrumpan el desarrollo del parásito y por lo tanto la transmisión de la enfermedad (Chan, *et al.*, 1994; Collins y Paskewitz, 1995; Richman y Kafatos, 1996; Dimopoulos, 2003).

Los mosquitos presentan diversos mecanismos que les permiten responder de forma activa a ataques microbianos (Dimopoulos, 2003). Actualmente se han obtenido progresos importantes en la identificación de marcadores moleculares de la respuesta inmune de mosquitos. Sin embargo, se conoce poco sobre los mecanismos de reconocimiento de antígenos parasitarios, así como de las moléculas efectoras de la resistencia (Collins y Paskewitz, 1995; Dimopoulos, *et al.*, 1997).

Situación mundial del paludismo.

El paludismo representa un problema importante de salud pública. Aproximadamente el 41% de la población mundial vive en áreas donde existe transmisión de paludismo (107 países), como son, partes de África, Asia, Centro y Sur América y Oceanía (WHO, 2005).

Se ha calculado que cada año se presentan de 350 a 500 millones de casos de malaria mundialmente y más de un millón de personas mueren a causa de la enfermedad, sobre todo niños de África. Por otra parte, más de 125 millones de viajeros no inmunes visitan cada año países donde el paludismo es endémico, y unos 10 000 a 30 000 contraen la enfermedad. El paludismo contribuye de forma indirecta a muchas más muertes, sobre todo en niños pequeños, a través de sus interacciones sinérgicas con otras infecciones y enfermedades. El paludismo es una causa importante de anemia en los niños y las embarazadas, así como de bajo peso al nacer, parto prematuro y mortalidad del lactante. En los países africanos endémicos el paludismo es la causa de un 25% a 35% de las consultas externas, un 20% a 45% de los ingresos hospitalarios y un 15% a 35% de las muertes que se registran en los hospitales, lo cual supone una pesada carga para los sistemas de salud (WHO, 2005).

En América, el paludismo se presenta en 21 países con una población conjunta de 504 millones de habitantes, de los cuales 21.56% (108.7 millones) se encuentra con riesgo de padecer la enfermedad. Durante 2005 se registraron 1 046 955 casos de malaria en la región con 109 muertes, lo que representa un incremento de 15.72% en el número de enfermos y una reducción a menos de la mitad en las defunciones (43.10%) en relación con el año anterior. El mayor número de casos ocurrió en países que comparten la selva amazónica, de los cuales Brasil concentró 57.39% de los casos, seguido por Colombia (11.29%), Perú (8.94%) y Venezuela (4.30%). En la subregión de Mesoamérica y el Caribe, 11.75% de los casos se concentraron en Guatemala (3.78%),

Guyana (3.72%), Haití (2.08%), Honduras (1.54%) y Nicaragua (0.63%). El 26.07% de los casos lo ocasionó *Plasmodium falciparum*, 73.73% *P. vivax* y 0.20% *P. malariae* (2 097 casos). Estos últimos casos fueron registrados en Guyana (61.56%), Surinam (27.75%), Guyana Francesa (3.38%), Guatemala (2.29%), Brasil (2.38%), Venezuela (1.81%) y Colombia (0.81%). México registró en ese mismo año un total de 2 967 casos (0.28%), la mayor parte (99.25%) ocasionados por *P. vivax* (WHO, 2007).

El paludismo en México

En México, el paludismo representa un importante problema de salud pública. Se considera que aproximadamente el 60% del territorio nacional tiene condiciones que favorecen la transmisión de la enfermedad, estando expuesta más de la mitad de la población. Hasta antes de 1956, el paludismo produjo una media de 24.000 muertes por año. A partir de 1957, el gobierno inició un programa de erradicación de la malaria basado en la fumigación extensiva de los hogares con DDT y la terapia contra la enfermedad. Actualmente se tienen menos mil registros anuales (comunicación personal M.H. Rodríguez) y ningún fallecimiento desde 1982 a la fecha. Sin embargo, el riesgo es persistente debido a la presencia de casos graves por *P. falciparum* en Centroamérica por lo que es necesario continuar con los programas de control y vigilancia epidemiológica en todo el país (Rodríguez-Domínguez, 2002).

Parásitos causantes del paludismo.

Los parásitos causantes de la enfermedad de la malaria son micro-organismos del género *Plasmodium*. Existen más de 150 especies de *Plasmodium*, las cuales

pueden infectar muchas especies animales, tales como reptiles, aves, y varios mamíferos. Actualmente se reconocen sólo cuatro especies de *Plasmodium* capaces de infectar al humano, *Plasmodium malariae*, *P. ovale*, *P. falciparum* y *P. vivax*, estas dos últimas, son las de mayor distribución en el mundo (Betanzos, *et al.*, 2008).

Plasmodium falciparum, se encuentra distribuido en regiones tropicales y subtropicales, es la única especie que causa malaria severa, potencialmente mortal. Se estima que cada año entre 700,000 y 2.7 millones de personas mueren por infección con *P. falciparum*, especialmente en África donde esta especie es predominante. *Plasmodium falciparum* puede causar malaria severa porque se multiplica rápidamente en la sangre, dañando los eritrocitos por lo que puede causar anemia. Además los parásitos pueden obstruir pequeños vasos sanguíneos. Cuando esto sucede en el cerebro, resulta en malaria cerebral, una complicación que puede ser fatal (Rodríguez-Domínguez, 2002)

P. vivax, se encuentra principalmente en Asia, America Latina y en algunas partes de África. Se considera que *P. vivax* es el parásito de malaria humana más prevalente, muy probablemente debido a su distribución en países Asiáticos, donde hay una mayor densidad poblacional. *P. vivax* pocas veces llega a ser mortal (frecuentemente debido al daño severo presentado en bazo), pero provoca síntomas que son incapacitantes, por lo tanto la infección con *P. vivax* tiene un impacto social y económico muy importante. *P. vivax*, así como *P. ovale* tienen estadios hepáticos latentes (llamados hipnozoítos) que se pueden re-activar e infectar nuevamente varios

meses después de la infección inicial (Rodríguez-Domínguez, 2002)

Plasmodium ovale se encuentra principalmente en África (especialmente en África occidental) y en las islas del Océano Pacífico Occidental. Este parásito es biológica y morfológicamente muy similar a *P. vivax*. Sin embargo, a diferencia de *P. vivax*, este puede infectar a aquellos individuos que son negativos al grupo sanguíneo Duffy, que es el caso para muchos residentes de África subsahariana. Esto explica el predominio mayor de *P. ovale* (más bien que *P. vivax*) en la mayor parte de África (Rodríguez-Domínguez, 2002)

Plasmodium malariae, es menos frecuente que *P. vivax* o *P. falciparum* y se encuentra principalmente en zonas templadas y subtropicales, distribuido a nivel mundial, es la única especie de parásito de malaria humana que tiene un ciclo cuaternario (el ciclo de tres días), las otras tres especies tiene un ciclo terciario (ciclo de dos días). La infección por *P. malariae* es una infección duradera, crónica que en algunos casos puede ser de por vida. En algunos pacientes *P. malariae* puede causar complicaciones serias como el síndrome nefrótico (Rodríguez-Domínguez, 2002)

Recientemente, se han reportado casos de malaria provocada por *P. knowlesi* (causante de malaria en macacos, *Macaca fascicularis* y *Macaca nemestrina*) en Asia Sudoriental y se le ha reconocido como la quinta especie del parásito causante de malaria en el hombre (Kantele, *et al.*, 2008; Van den Eede, *et al.*, 2009).

Ciclo de vida de *Plasmodium*.

El ciclo de vida del parásito de la malaria implica dos componentes, el agente

vector (mosquitos del género *Anopheles*, siendo en México *Anopheles albimanus* y *Anopheles pseudopunctipennis* las principales especies transmisoras) y el hospedero vertebrado (mamíferos, aves y reptiles); en el primero se lleva a cabo la reproducción sexual del parásito mientras que en el vertebrado se realiza la reproducción asexual.

En el humano, la infección por *Plasmodium* comienza cuando un mosquito *Anopheles* infectado con *Plasmodium*, se alimenta e inyecta los esporozoitos infectivos en la sangre circulante (figura 1). En minutos, los esporozoitos invaden las células hepáticas y mediante multiplicación asexual produce miles de merozoitos. Cuando los hepatocitos invadidos se rompen, los merozoitos son liberados a la circulación periférica. Los merozoitos invaden a los eritrocitos, donde nuevamente se multiplican produciendo más merozoitos. La duración del ciclo esquizogónico eritrocítico depende de la especie. *P. vivax* y *P. ovale* tienen ciclos de 48 horas, *P. malariae*, de 72 horas y *P. falciparum* de 36 a 48 horas. El tiempo requerido para el ciclo intraeritrocítico tiene significado clínico porque la fiebre resulta a consecuencia de la ruptura de los eritrocitos parasitados y liberación de toxinas maláricas pirogénicas (Beier, 1998).

Por otra parte, algunos merozoitos se diferencian en las formas sexuales, macrogametocitos (hembras) y microgametocitos (machos), en un proceso denominado gametocitogénesis, en el cual influyen diferentes factores incluyendo densidad parasitaria, anemia, respuesta inmune del hospedero y drogas utilizadas en el tratamiento médico (Kuehn y Pradel, 2010), sin embargo poco se sabe de los mecanismos moleculares y genes que regulan la gametocitogénesis, pero se cree que

ciertos genes de la súper-familia de genes sub-teloméricos están implicados en el proceso de transición de la etapa de merozoitos a gametocitos (Eksi, *et al.*, 2005).

Los gametocitos son ingeridos con la sangre por otro mosquito cuando éste se alimenta, de modo que en el intestino del mosquito se lleva a cabo el ciclo sexual o esporogónico del parásito. En el intestino, los gametocitos intracelulares emergen de los eritrocitos infectados, para formar gametos extracelulares (fenómeno conocido como exflagelación). En los primeros minutos, el gameto masculino fertiliza al gameto femenino formando un cigoto. El cigoto es el único estado diploide del ciclo de vida del parásito, la meiosis ocurre a las pocas horas de haberse formado el cigoto. En las siguientes 15 a 30 h, el cigoto se diferencia en oocineto, la fase móvil e infectiva del parásito. Para continuar su desarrollo, el oocineto cruza la membrana peritrófica y el epitelio intestinal. El oocineto penetra a través o entre las células epiteliales y se deposita entre las células epiteliales del intestino y la membrana basal, donde el complejo apical, citoesqueleto y otras estructuras del oocineto son re-absorbidas y el parásito adquiere una forma esférica, transformándose en un ooquiste, donde el parásito se replica por múltiples mitosis. El ooquiste crece rápidamente y se rodea por una pared de material extracelular compuesto de proteínas fibrosas, probablemente producidas y secretadas por el parásito. Un ooquiste maduro puede medir hasta 80 μm , siendo casi visible a simple vista. De cada ooquiste se pueden desarrollar 1000 a 10,000 esporozoitos. Después de 12 a 15 días postingestión, dependiendo de la especie y la temperatura, los esporozoitos emergen del ooquiste maduro y son

liberados al hemocele. Los esporozoitos migran hacia la glándula salival, pasan a través de las células secretoras y se acumulan en los ductos salivares, donde permanecen hasta que son inyectados en un hospedero vertebrado durante la alimentación sanguínea (Beier, 1998; Shahabuddin y Kaslow, 1994).

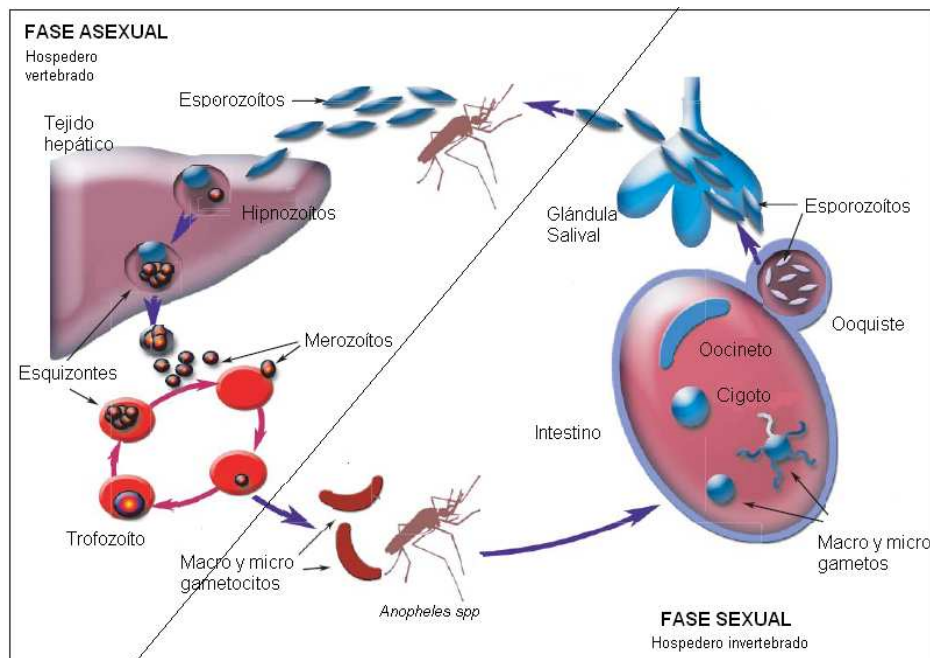


Figura 1. Ciclo de Vida del parásito *Plasmodium*. (Ver texto, imagen modificada de Winzeler, 2008)

Respuesta inmune de mosquitos.

El parásito de la malaria es transmitido de un hospedero a otro por mosquitos anofelinos; existen cerca de 430 especies de mosquitos *Anopheles*, sin embargo, solamente alrededor de 50 están implicadas en la transmisión, y 20 son responsables de la mayoría de las transmisiones de la enfermedad en el mundo (Pages, *et al.*, 2007), puesto que en la mayoría de las especies de mosquitos anofelinos no se desarrolla el ciclo completo del parásito. De modo que existen especies susceptibles, resistentes y

refractarias a la transmisión de la enfermedad. Se define como especie susceptible aquella que es capaz de permitir el desarrollo completo del protozooario y permite su transmisión al hospedero vertebrado (Christensen y Severson, 1993). Una especie resistente es aquella que destruye al parásito mediante la activación de una respuesta inmune, mientras que una especie refractaria es una en la cual existe incompatibilidad fisiológica entre el parásito y el vector potencial, de modo que el desarrollo del parásito puede ser suprimido en uno o varios puntos por diferentes mecanismos (Christensen y Severson, 1993). Estos conceptos han sido revisados recientemente, Sinden y colaboradores (2004) proponen que en la resistencia a la infección por el parásito de la malaria están implicados muchos factores, incluyendo comportamiento, genéticos o inmunes (melanización y fagocitosis) que suprimen la infección y que no se expresan igual en todos los mosquitos, y por lo tanto “todos los mosquitos son resistentes al parásito de la malaria, pero algunos son más resistentes que otros”.

Mecanismos generales de defensa.

Los mosquitos presentan varias barreras para contener las infecciones, y se clasifican en generales y específicas. Los mecanismos generales pueden bloquear infecciones oportunistas e incluyen rasgos anatómicos (por ejemplo, la cutícula) así como procesos fisiológicos (formación de matriz peritrófica) y síntesis de proteasas digestivas en el intestino. Los mecanismos específicos se refieren al sistema inmune innato de los insectos (Richman y Kafatos, 1996).

La membrana o matriz peritrófica (MP) se forma poco después de la ingestión

sanguínea (inicia desde 15 min. post-alimentación y puede estar completa a las 12 horas); está compuesta principalmente de quitina (polímeros de N-acetilglucosamina) y representa una barrera que el oocineto debe atravesar para alcanzar el epitelio intestinal (Berner, *et al.*, 1983), lo cual logra mediante la secreción de una quitinasa, enzima que hidroliza la quitina (Huber, *et al.*, 1991). Por otra parte, aunque la MP constituye una barrera física para el *Plasmodium*, no es el mecanismo refractario más importante en los mosquitos *Anopheles* contra el parásito (Shahabuddin, *et al.*, 1995)

El intestino representa un ambiente hostil para el parásito. La temperatura y el pH cambian repentinamente, las enzimas proteolíticas inician el proceso de digestión y poco después de la ingestión se forma la matriz peritrófica que aísla la sangre ingerida del epitelio intestinal. Además, el intestino es un órgano muy importante en la respuesta inmune, ya que participa en la producción de moléculas citotóxicas, como el óxido nítrico, especies reactivas de oxígeno y péptidos anti-microbianos (Luckhart, *et al.*, 1998; Dimopoulos, *et al.*, 2001). En las células epiteliales del intestino el parásito también es susceptible a ser destruido. Se ha descrito un cepa refractaria de *A. gambiae*, en la que el parásito *P. gallinaceum* muere en el epitelio a través de un mecanismo lítico; el parásito primero aparece vacuolado y entonces aparece como degradado y roto dentro de la célula epitelial, sin embargo el mecanismo exacto que lleva a la lisis del parásito aún se desconoce (Vernick, *et al.*, 1995). Así mismo, la encapsulación melanótica es otro mecanismo que presenta el epitelio intestinal para la destrucción del parásito (Osta, *et al.*, 2004). Por otra parte, en *A. albimanus* se ha

observado la destrucción del parásito *P. vivax* cepa VK2.47 mientras ocurre la migración a través del epitelio intestinal, probablemente debida a la acción de enzimas digestivas o bien por moléculas de defensa del mosquito (González-Cerón *et al.*, 2001).

Mecanismos específicos de defensa.

Por otra parte, en la respuesta inmune de los invertebrados (mecanismos específicos de defensa) pueden distinguirse tres diferentes tipos de respuesta, todas consisten de reacciones reguladas en cascada (figura 2). Primero, cascadas proteolíticas, las cuales provocan una coagulación localizada de la hemolinfa y activación del sistema de la fenoloxidasa, para la encapsulación melanótica de microorganismos (Nigam, *et al.*, 1996; Vernick, *et al.*, 1995; Cerenius, 2004). Segundo, la inducción de síntesis de péptidos anti-microbianos por el cuerpo graso, intestino y hemocitos en respuesta a la presencia de microorganismos (Hultmark, 1993; Hoffman, 1995; Gillespie, *et al.*, 1997; Otvos, 2000). Tercero, reacciones de defensa celular que incluye fagocitosis y formación de nódulos y cápsulas, algunas veces acompañada por la melanización de los microorganismos (Hernández, *et al.*, 1999; Dimopoulos, *et al.*, 2001, Levashina, *et al.*, 2001).

1. Reconocimiento.

La respuesta inmune del mosquito se inicia cuando las moléculas de origen microbiana son reconocidas como extrañas o 'no propias' y es inducida por la unión específica de los receptores de reconocimiento de patrones o PRR (por sus siglas en inglés: Pattern Recognition Receptors) a patrones moleculares asociados a patógeno o

PAMP (por sus siglas en inglés: Pathogen-Associated Molecular Pattern). Estos últimos son estructuras bien conservadas, localizadas en la superficie de los microorganismos y que no están presentes en las células del hospedero, ejemplo de ello son los lipopolisacáridos (LPS) de las bacterias Gram negativas, los péptidoglicanos (PGL) de bacterias Gram positivas y los enlaces β -1,3-glicano para el caso de hongos y levaduras (Medzhitov y Janeway, 1997; Dimopoulos, 2003). Consecutivo al reconocimiento, se lleva a cabo la activación extracelular de cascadas proteolíticas y vías de señalización intracelulares específicas, finalizando con la inducción de la expresión de moléculas efectoras de defensa (Dimopoulos, 2003; Ezekowitz, *et al.*, 2003; Engström, *et al.*, 2004; Shi y Paskewitz, 2006).

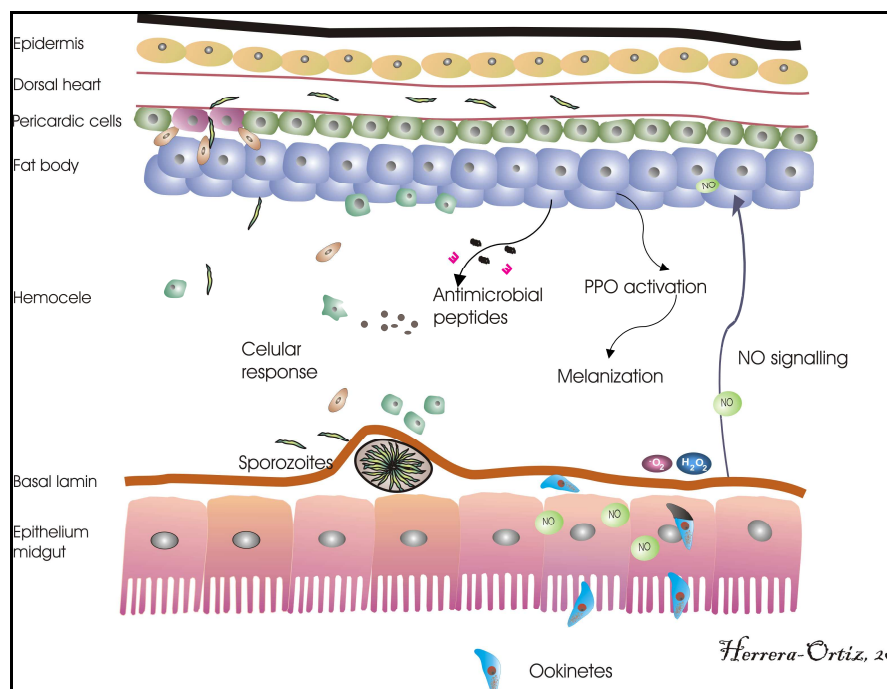


Figura 2. Respuesta inmune de mosquitos. (Ver texto)

2. Vías de señalización en respuesta inmune.

Hasta ahora, en *Drosophila* se tienen identificadas dos vías de transducción de señales relacionadas con inmunidad, las vías de Toll e IMD, y en mosquitos una tercera vía, la vía de STAT también esta involucrada en respuesta inmune (figura 3).

La activación de la vía de señalización de Toll en *Drosophila* es dependiente del corte proteolítico de Spaetzle, el cual se une directamente al receptor transmembranal Toll y lo activa. El dominio intracitoplasmático de Toll, entonces interactúa con tres proteínas MyD88, Tube y Pelle, esta última contiene un dominio serina-treonina cinasa. Este proceso resulta en la activación de dos factores de transcripción citoplasmáticos de la familia Rel/NF- κ B, Dorsal y Dif, las cuales se disocian de la proteína fosforilada Cactus. Dif y/o Dorsal entonces se translocan al núcleo de las células inmunes donde activan genes de inmunidad, tales como drosomicina (Ip, 2005).

En *A. gambiae* se han encontrado los componentes principales de la vía Toll, se han descrito 11 genes *Toll*, aunque su función en respuesta inmune aún no ha sido caracterizada. Durante el análisis del genoma de *A. gambiae* se identificaron los ortólogos de MyD88, Tube, Pelle y Cactus (Christophides, *et al.*, 2002). El ortólogo de Dorsal es Rel 1 (llamado inicialmente Gambif 1), que es translocado al núcleo cuando existen infecciones por bacterias, pero no ocurre lo mismo en la presencia del parásito de la malaria (Christophides, *et al.*, 2004).

En la vía de IMD se encuentra involucrada la proteína Relish de la familia Rel/NF- κ B. La activación de la vía comienza con el reclutamiento de IMD, una proteína con

un dominio de muerte (DD, del inglés death domain, dominio relacionado con apoptosis y señalización celular). Seguida de la activación de la vía Imd por la presencia de bacterias Gram negativas, Relish es rápidamente dividido en dos fragmentos, el dominio C-terminal con repeticiones de anquirina (que se mantiene en el citoplasma) mientras que el N-terminal de Rel se transloca al núcleo. La proteasa que divide a Rel aún no ha sido identificada. Aunque inicialmente se había propuesto un mecanismo de autoproteólisis, actualmente se está explorando la posibilidad de que la separación de Relish sea a través de una caspasa tipo ced-3/Nedd2, relacionada a muerte celular (DREDD). El complejo de señalización involucra a IKKb e IKKg que fosforila a Relish para su separación proteolítica (Naitza y Ligoxygakis, 2004)

Todos los componentes de la vía de IMD descritos para *Drosophila*, están conservados en *Anopheles* (Christophides, *et al.*, 2002) y algunos datos muestran que Rel2, el ortólogo de Relish en *Anopheles*, está involucrado en la defensa anti-bacterial en el mosquito.

Por otra parte, poco se sabe acerca del papel de la vía JAK/STAT en defensa anti-microbiana en insectos. La vía JAK/STAT en *Drosophila* tiene un componente STAT y está involucrado en muchos procesos de desarrollo.

En *A. gambiae* se han identificado STAT1 y STAT2, que al igual que STAT92E de *D. melanogaster*, se encuentran en las primeras etapas del desarrollo así como ante la presencia de parásitos. En mosquitos sin ningún tipo de reto inmune, la proteína STAT se encuentra en el citoplasma y en el núcleo celular, sin embargo, cuando son

retados con bacterias, esta proteína se encuentra sólo en el núcleo. Por otro lado, JAK depende de la activación de STAT, esto en respuesta a un daño en el organismo (Christophides, *et al.*, 2004; Barillas-Mury, *et al.*, 1996).

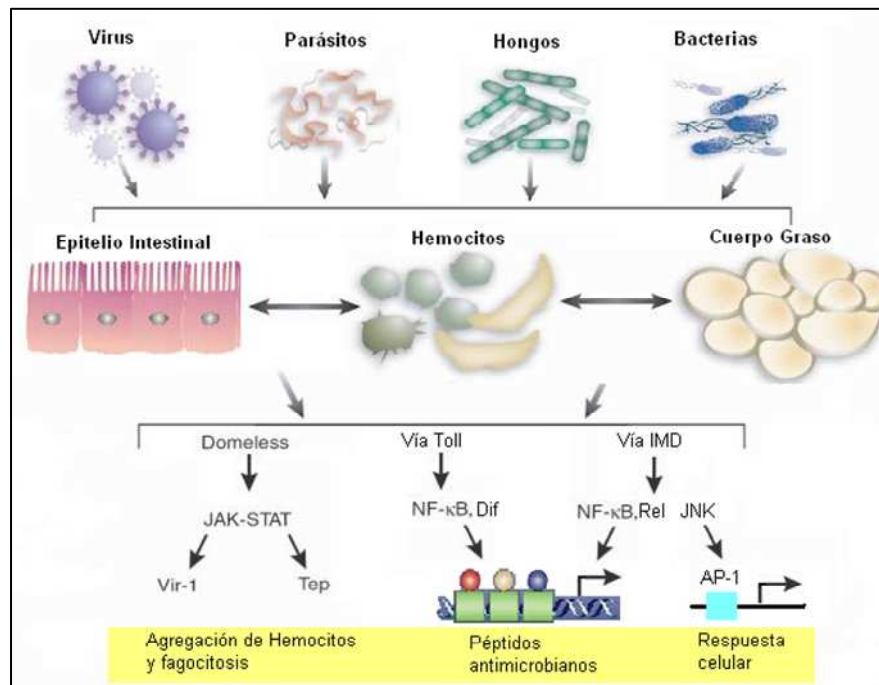


Figura 3. Vías de señalización de respuesta inmune en insectos (modificada de Ip, 2005)

3. Mecanismos efectores.

Uno de los mecanismos de defensa de los insectos mejor caracterizado contra los micro-organismos invasores es la producción de péptidos anti-microbianos. Estos pueden ser clasificados de manera general en: cecropinas, defensinas, atacinas, sarcotoxinas, dipterocinas, coleopterocinas, abaecinas y apidecinas (Hultmark, 1993; Hoffman, 1995; Gillespie, *et al.*, 1997). Excepto por la lisozima, la cual está muy relacionada con las lisozimas tipo C de vertebrados, estas moléculas son compuestos

relativamente nuevos, descubiertos por primera vez en insectos. El mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos aún no es claro, pero se ha sugerido que en la mayoría de los casos lo ejercen a través de un mecanismo similar a detergentes, comprometiendo la integridad de la membrana celular (Dimopoulos, *et al.*, 2001), además los péptidos pueden ser translocados y dentro de la célula pueden interferir en diversos procesos celulares como la síntesis de la pared celular, la síntesis de ácidos nucleicos, la síntesis de proteínas o inhibir la actividad enzimática (Brogden, 2005) .

Entre los factores anti-microbianos más notables, se encuentran las cecropinas, una familia de péptidos de 35-39 aminoácidos (Hultmark, 1993). A concentraciones micromolares son capaces de matar y lisar a la mayoría de las bacterias contra las que han sido probadas, tanto Gram-positivas como Gram-negativas. Las cecropinas son moléculas anfipáticas que interactúan con los lípidos de las membranas, creando canales iónicos de tamaño variable (Hultmark, 1993; Hoffman, 1995; Gillespie, *et al.*, 1997).

Un segundo grupo de moléculas inducibles son las defensinas. Estas son muy activas contra bacterias Gram-negativas (Hultmark, 1993). En un principio fueron consideradas homólogas a las defensinas de mamíferos, pero las estructuras tridimensionales demostraron ser completamente diferentes. En cambio, las defensinas muestran semejanzas estructurales con toxinas del escorpión como la charibdotoxina. Al contrario de las cecropinas, las defensinas matan a las bacterias de manera muy lenta.

El tercer grupo lo forman las proteínas parecidas a las atacinas y constituyen la clase principal de moléculas efectoras que se caracterizan por la presencia de una o más copias de la región conservada G (Hultmark, 1993). En este grupo se incluyen a las sarcotoxinas II, dipterocinas y coleopterocina. Las atacinas afectan la división celular de *E. coli* y de otras bacterias Gram-negativas, ocasionando su crecimiento en forma de largas cadenas. En las abejas se han encontrado dos moléculas con alto contenido de prolina: la apidaecina y la abaecina, que además presentan una gran homología con las dipterocinas (Hultmark, 1993; Hoffman, 1995; Gillespie *et al.*, 1997).

En *A. gambiae*, se han aislado cuatro de estas moléculas, una defensina, dos cecropinas y la gambicina, un péptido anti-microbiano nuevo. Los transcritos de estos péptidos se han localizado en el cuerpo graso, el abdomen y el tórax, así como intestino del mosquito (Dimopoulos, *et al.*, 2001). Al parecer tienen efecto en controlar la flora ingerida durante la alimentación. La cecropina-1 y la gambicina actúan tanto en bacterias Gram-positivas como negativas, mientras que la defensina sólo contra Gram-positivas.

Aunque la existencia de péptidos anti-microbianos ha sido demostrada en insectos vectores, su participación en la eliminación de parásitos no ha sido demostrada. 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 y esporozoítos 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 *Ae. aegypti* (Chalk, *et al.*, 1995). Sin embargo, sólo grandes concentraciones de cecropina B inyectadas en *A. gambiae* consiguieron detener la formación de ooquistes de *Plasmodium*. Rodríguez y cols. (1995) obtuvieron resultados análogos al incubar oocinetos de *P. berghei* con el péptido sintético Shiva-3 (péptido sintético basado en la secuencia de la cecropina B). Así mismo, se demostró que el péptido antimicrobiano escorpina, aislado de la hemolinfa del alacrán *Pandinus imperator*, inhibe el desarrollo de *P. berghei* en las etapas de gametos y oocinetos (Conde, *et al.*, 2000), además la escorpina recombinante tiene un potente efecto tóxico en estadíos sexuales y asexuales de *P. berghei* y *P. falciparum*, respectivamente, así mismo, es capaz de inhibir la replicación del virus DEN-2 en células C6/36 (Carballar-Lejarazú, *et al.*, 2008).

Estos estudios han llevado a la manipulación de mosquitos para la sobre-expresión de péptidos antimicrobianos, con el objetivo de detener el desarrollo del parásito. Mosquitos *A. aegypti* que sobre-expresaban los transgenes defensina A y cecropina A, mostraron ser mas resistentes a la infección con la bacteria Gram negativa *Enterobacter cloacae*, mientras que resultados preliminares mostraron que en los mosquitos transgénicos para defensina A había una reducción del 60-70% en la formación de ooquiste de *P. gallinaceum* (Shin, *et al.*, 2003). Por otra parte, en *An. gambiae* se crearon dos líneas independientes de mosquitos transgénicos sobre-

expresando el gen de *cecA* de *An. gambiae* bajo el promotor de carboxypeptidasa de *Aedes aegypti*. La infección con *Plasmodium berghei* resultó en una reducción del 60% en el número de ooquistes en mosquitos transgénicos en comparación con los mosquitos no transgénicos (Kim, *et al.*, 2004).

Finalmente, se ha observado sobre-expresión de diversos genes posterior a infecciones bacterianas, a los cuales se les ha considerado marcadores de respuesta inmune (Dimopoulos, *et al.*, 1997). La mayoría de estos marcadores también son sobre-expresados después de la infección de mosquitos con el parásito de la malaria, demostrando que el parásito es capaz de inducir la respuesta inmune (Dimopoulos, *et al.*, 1998; Richman, *et al.*, 1997). Estos factores de la respuesta inmune pertenecen a distintas clases funcionales incluyendo componentes anti-microbianos (defensina), proteasas (ISP13 e ISPL5), receptores de reconocimiento (GNBP, IGALE20, ICHIT), factores de transcripción (Ag-STAT y Gambif1) y enzimas (NOS y PPO) (Richman, *et al.*, 1997, Barillas-Mury, *et al.*, 1999; Dimopoulos, *et al.*, 1998). La mayoría de los marcadores se expresan de manera diferencial en tejidos y muestran patrones de expresión distintos durante el desarrollo, reflejando así sus funciones específicas (Dimopoulos, *et al.*, 1999). Durante la infección con *Plasmodium*, la cinética y niveles de inducción son diferentes para cada marcador de la respuesta inmune, probablemente como consecuencia de la regulación diferencial y especificidad tisular y temporal de su expresión, ya que existe una correlación espacial y temporal entre los estadios de desarrollo del parásito y la respuesta inmune (Dimopoulos, *et al.*, 1999).

ANTECEDENTES

Existen estudios que demuestran que la invasión del epitelio intestinal de *Anopheles* por los oocinetos de *Plasmodium* y de la glándula salival por los esporozoitos induce sobre-regulación de varios marcadores de respuesta inmune localmente, así como sistémicamente en distintos tejidos del mosquito (Dimopoulos, *et al.*, 1997, 1998; Richman, *et al.*, 1997). La respuesta sistémica probablemente involucra varios órganos, incluyendo vaso dorsal, cuerpo graso y/o hemocitos. En *Drosophila melanogaster* se observó que la infección con *Crithidia*, la cual se aloja únicamente en estómago, induce una respuesta inmune sistémica, sugiriendo que este tejido puede enviar señales al cuerpo graso, el principal sitio de síntesis de péptidos anti-microbianos (Boulanger, *et al.*, 2001). Estos datos sugieren que además de la respuesta inmune local en el epitelio infectado, existe un proceso de señalización que se propaga a otros tejidos generando una respuesta sistémica. Sin embargo aún no se conocen los factores específicos del mosquito que están involucrados en este proceso. Dos moléculas candidatas que pueden participar en la señalización o activación de la respuesta inmune sistémica son el óxido nítrico (NO) y el peróxido de hidrógeno. Ambas moléculas son producidas por el intestino del mosquito, son pequeñas, liposolubles y difunden rápidamente.

Cómo se produce el óxido nítrico.

El óxido nítrico (NO) es producido por la actividad de la óxido nítrico sintasa (NOS), a través de dos reacciones consecutivas (figura 4). Una molécula de L-arginina

es oxidada para producir N ω -OH-L-arginina como molécula intermediaria y ésta a su vez, se oxida para dar lugar a la formación de NO y L-citrulina. En total, 1.5 moléculas de NADPH y dos moléculas de O₂, ambos sirviendo como sustratos, son convertidos en 1.5 moléculas de NADP⁺ y dos moléculas de agua como coproductos (MacMicking, *et al.*, 1997).

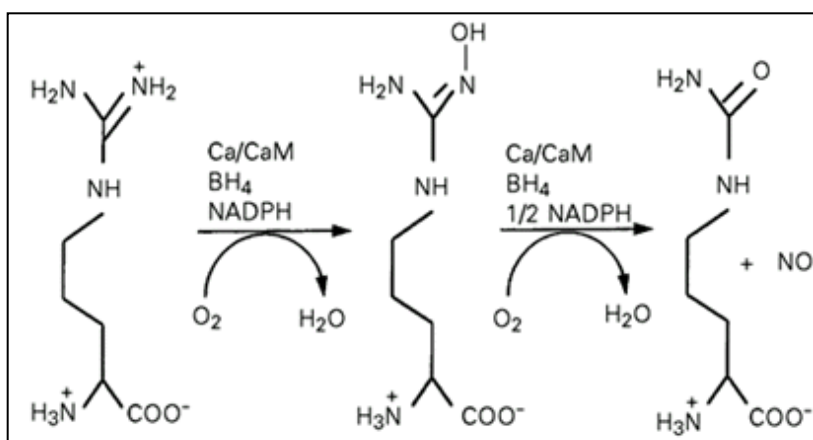


Figura 4. Generación de óxido nítrico por la enzima óxido nítrico sintasa.

En mamíferos, la NOS se presenta en varias isoformas y han sido clasificadas en dos categorías: constitutiva (dependiente de Ca²⁺/calmodulina, NOS endotelial y NOS neuronal) e inducible (independiente de Ca²⁺/calmodulina, NOS de macrófagos) (MacMicking, *et al.*, 1997). Las isoenzimas de NOS difieren en tamaño (130 a 160 kDa), en secuencia de aminoácidos (50 a 60% de identidad), distribución en tejidos, regulación transcripcional y activación por calcio intracelular (Crane, *et al.*, 1997). Sin embargo, comparten componentes estructurales y presentan dos dominios, un dominio oxigenasa en la región amino-terminal, donde tiene sitios de unión a grupo hemo, a

tetrahidrobiopterina (H_4B) y a L-arginina, y un dominio de reductasa en el extremo carboxilo que une flavin mononucleótido (FMN), flavin adenin dinucleótido (FAD), y dinucleótido de nicotin-adenina-fosfato reducido (NADPH). En su región media presenta un sitio de unión a calmodulina que regula la comunicación electrónica entre ambos dominios y es importante para la dimerización de la enzima (Crane, *et al.*, 1997).

Mecanismos de acción del óxido nítrico.

El principal blanco del NO sintetizado por las isoformas constitutivas NOS (endotelial y neuronal) es la guanilato-ciclase soluble. Esta enzima cataliza la formación de guanosin-monofosfato cíclico (cGMP). El NO interactúa con el motivo heme de esta enzima para activarla, y el incremento en la concentración de cGMP provoca cambios en la función celular, afectando frecuentemente las concentraciones intracelulares de calcio (Murad, 1999). El NO puede mediar importantes eventos fisiológicos en mamíferos, relacionados con regulación celular, comunicación célula a célula y señalización. Además el NO puede funcionar como un mensajero intracelular, neurotransmisor y hormonal (Murad, 1999).

El NO sintetizado por la isoforma inducible (iNOS o de macrófagos) también activa la guanilato-ciclase, pero su principal efecto es tóxico, debido a las altas concentraciones en que se produce. Concentraciones elevadas de NO ($>1\mu M$) inactivan enzimas con metales de transición, incluyendo enzimas mitocondriales, como citocromo oxidasa, inhibiendo la respiración mitocondrial o caspasa 3 regulando procesos de apoptosis. El NO sintetizado por iNOS (NOS inducible) de macrófagos murinos

activados es un mecanismo importante de defensa del huésped. Este es capaz de matar patógenos incluyendo *Leishmania*, *Mycobacterium tuberculosis*, el parásito de la malaria y algunos hongos. También media la inmunidad “no-específica” y es tóxico para células tumorales (MacMicking, *et al.*, 1997). El NO, y particularmente su derivado, el peroxinitrito (ONOO-), causa daño en el ADN de patógenos e inhibe la respiración (inhibiendo la producción metabólica de energía necesaria para la división celular) (Bogdan, *et al.*, 2000). Así mismo, puede interrumpir la replicación del ADN y la síntesis de proteínas de virus, como DENV-2, posiblemente bloqueando la actividad de la ribonucleótido reductasa y la generación de intermediarios del ciclo del ácido tricarboxílico (Melkova y Esteban, 1995; Karupiah y Harris 1995). Resultados recientes de nuestro grupo indican que el NO es importante en la inhibición de la replicación del virus dengue en mosquitos no vectores de la enfermedad. En *Aedes aegypti*, se observó que DENV no replica cuando los mosquitos son tratados con 2 mM de nitroprusiato de sodio, un donante de NO; mientras que en *Anopheles albimanus* el virus no es capaz de replicar a menos que los mosquitos fueran tratados con 1 mM de L-NAME (L-N(G)-nitroarginine metil ester, un inhibidor competitivo de la síntesis de NO) (Ramos-Castañeda, *et al.*, 2008).

El NO también regula la función de linfocitos y puede participar en la inhibición de algunas células T ayudadoras (Th). El NO producido por macrófagos de ratón reduce la expresión de genes dependientes de NF- κ B por S-nitrosilación de p50. En contraste, la administración de nitroglicerina a ratas con migraña activa la translocación de la

subunidad p65 de NF- κ B en el núcleo trigémino caudal (Greco, *et al.*, 2005). Así mismo, inhibe la liberación de IL-1b e IL-18. También se puede inhibir la proliferación celular con la presencia de donadores de NO (Bogdan, *et al.*, 2000). En linfocitos, el peroxinitrito (ONOO⁻) puede incrementar la expresión de IL-8 en respuesta a LPS (Filep, *et al.*, 1998).

Papel del Óxido Nítrico en la respuesta inmune contra malaria en el humano.

El óxido nítrico es una molécula que ha sido propuesta como crucial en la patogénesis del paludismo, pero su mecanismo de acción durante la enfermedad es controversial. Por una parte, se ha propuesto que el NO es producido en exceso y mata al parásito *Plasmodium*, pero provocando a su vez efectos por daño oxidativo o señalización aberrante en el cerebro y contribución en anemia, agravando los síntomas. En este caso, inhibidores de la enzima óxido nítrico sintasa (como el L-NAME [NG-nitro-L-arginine methyl ester]) o ‘limpiadores’ de NO (“NO scavengers” como compuestos de rutenio) podrían funcionar como adyuvantes en la terapia para paludismo severo causado por *P. falciparum*. Por otra parte, existen datos que indican que la biodisponibilidad del NO es baja en la vasculatura durante la malaria, debido a que los niveles de producción de NO son bajos por hipoargininemia y por el aumento en la desaparición del NO libre por su interacción con hemoglobina y superóxido. El NO tiene una función importante en el mantenimiento de la homeostasis vascular la cual se rompe durante la patogénesis de la malaria. Por lo tanto la restauración de la biodisponibilidad del NO, por disminución de la desaparición del NO, suministrando NO

exógeno o restableciendo los niveles de arginina, podrían ser un medio eficaz en la terapia contra la enfermedad.

El NO parece ser un importante mediador de la respuesta inmune protectora durante todos los estadios de la infección por *Plasmodium*. La actividad relacionada con NO contra los estadios hepáticos y sexuales sanguíneos es antiparasítico. La disminución de la enfermedad asociada a la producción de NO en fases asexuales sanguíneas en infecciones *in vivo*, al menos en malaria murina, parece deberse más a efectos protectores hacia el hospedero que con un efecto antiparásito. Así mismo, la asociación entre la producción de NO y protección contra la enfermedad mostrada en niños africanos puede ser mediada por la habilidad del NO de inhibir o desregular la expresión de receptores utilizados por eritrocitos parasitados para adherirse al endotelio vascular (Anstey *et al.*, 2002).

Papel del Óxido Nítrico en la respuesta inmune en invertebrados.

Durante la infección con *Plasmodium*, el intestino de *Anopheles* produce NO (Luckhart, *et al.*, 1998; Dimopoulos, *et al.*, 1998; Herrera-Ortiz, *et al.*, 2004). La expresión de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) se induce por la infección con *P. berghei* en *A. gambiae*, *A. stephensi* y *A. pseudopunctipennis* (Dimopoulos, *et al.*, 1998; Han, *et al.*, 2000; Herrera-Ortiz, *et al.*, 2004) y la producción de NO y sus metabolitos limitan el desarrollo del parásito (Luckhart, *et al.*, 1998; Peterson, *et al.*, 2007). Además en *A. stephensi* se observó que la producción de NO induce apoptosis en células epiteliales (Han, *et al.*, 2000). En *Drosophila* se encontró que el óxido nítrico es capaz

de regular la expresión de péptidos anti-*microbianos como diptericina* (Nappi, *et al.*, 2000; Foley y O'Farrell, 2003). Nappi y colaboradores (2000) observaron un incremento en la producción de NO durante la encapsulación melanótica mediada por hemocitos, y encontraron que el NO exógeno es capaz de inducir la expresión del péptido anti-microbiano diptericina. Por otra parte, la infección con bacterias Gram-negativas induce la expresión de la enzima NOS y la inhibición de ésta incrementa la sensibilidad de *Drosophila* a la infección con bacterias Gram negativas y evita la inducción en la expresión de diptericina (Foley y O'Farrell, 2002). Utilizando reporteros para los péptidos anti-microbianos se observó que el NO es capaz de activar la respuesta inmune en larvas no infectadas (Foley y O'Farrell, 2003). En el gusano de la seda *Bombix mori* se observó que la inyección de un donador de NO induce la expresión del gen que codifica para cecropina B (Imamura, *et al.*, 2002). Todos estos datos sugieren que el óxido nítrico producido por los insectos durante la infección está involucrado en la transducción de señales como una molécula de señalización para la expresión de genes de respuesta inmune.

Estudios previos han sugerido funciones de señalización del óxido nítrico en plantas y mamíferos aunque aun no es claro cómo funciona, (Bogdan, *et al.*, 2000). La función del óxido nítrico en mamíferos incluye diversas repuestas fisiológicas, tales como vasodilatación, neurotransmisión y apoptosis. Existen evidencias recientes que indican que el NO regula varios procesos biológicos por modificación directa de proteínas. El óxido nítrico y especies relacionadas pueden oxidar, nitrar o nitrosilar

proteínas. La nitración se refiere a la adición de un grupo NO_2 a un residuo de tirosina o triptófano, mientras que la nitrosilación se refiere a la unión de un grupo NO a un metal de transición o a un residuo de cisteína (u otro tiol). La nitración de tirosinas es una modificación irreversible que puede ser responsable de algunos efectos tóxicos del NO. En contraste la nitrosilación es una modificación reversible que juega un papel central en la señalización mediada por óxido nítrico. Se ha propuesto que la nitrosilación/desnitrosilación de proteínas puede funcionar como un “switch off/on” para la función de las proteínas, tal como lo hace la fosforilación (Mannick y Schonhoff, 2002).

Peróxido de Hidrógeno.

El peróxido de hidrógeno puede ser otro de los factores o moléculas que participan en la regulación de la respuesta inmune sistémica. En mosquitos, las catecolaminas son las principales moléculas participantes en los procesos de encapsulación y melanización de microorganismos o agentes extraños. (Munkirs, *et al.*, 1990). Una de las más abundantes en insectos es la dihidroxifenilalanina (L-DOPA).

Durante la oxidación de la L-DOPA se generan diferentes radicales libres de oxígeno, entre ellos, superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogeno (H_2O_2) y radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$). El $\cdot\text{OH}$ es extremadamente tóxico para las células causando la peroxidación de lípidos de membrana (Rikans y Hornbrook, 1997), el H_2O_2 lleva a la iodación de proteínas bacterianas, a la formación de aldehídos y a la degradación de cadenas polipeptídicas, además puede interactuar con la vitamina C formado

compuestos tóxicos para muchas especies bacterianas. Recientemente se observó que la hemolinfa y el intestino de mosquitos anofelinos, incluyendo *A. albimanus* generan anión superóxido en presencia de L-DOPA y que éste resulta tóxico para los oocinetos de *P. berghei* (Lanz-Mendoza, *et al.*, 2002, Kumar y Barillas-Mury, 2005).

En *A. gambiae* los niveles de H_2O_2 se incrementan dramáticamente después de la alimentación sanguínea, probablemente debido al incremento metabólico durante el proceso de la digestión de la sangre y la ovogénesis (DeJong, *et al.*, 2007), y como un mecanismo de defensa por el incremento bacteriano en el intestino, posterior a la alimentación sanguínea. Además, los niveles de peróxido a 24 h post-alimentación sanguínea difiere significativamente entre cepas de *A. gambiae*, probablemente debido a diferencias fisiológicas relacionadas con la producción y detoxificación de radicales libres de oxígeno (Kumar, *et al.*, 2003). Se ha observado que la cepa genéticamente seleccionada (S), por ser altamente susceptible al desarrollo del parásito *Plasmodium*, tiene significativamente niveles más bajos de H_2O_2 que la cepa no seleccionada susceptible (G3) 24 horas después de la alimentación. Además la cepa refractaria (R) tiene niveles significativamente más altos (dos a tres veces) que las otras dos cepas. La cepa R expresa prematuramente superóxido dismutasa, por lo que el anión superóxido generado, rápidamente es convertido en peróxido de hidrógeno; la catalasa también se induce de manera temprana y persistente, de modo que el peróxido de hidrógeno no se acumula en la hemolinfa, sugiriendo que el sistema de detoxificación es muy eficiente en esta cepa (Kumar, *et al.*, 2003). Por otra parte, niveles altos de H_2O_2 están asociados

con la resistencia del mosquito a la infección con el parásito y confiere resistencia al reto bacteriano, además los radicales libres de oxígeno pueden interactuar con el NO producido por la NOS de los mosquitos durante los procesos de respuesta inmune.

Las vías de señalización de respuesta inmune en insectos hasta ahora descritas, son principalmente la vía IMD y la vía de Toll, ambas tienen como factores de transcripción a miembros de la familia Rel/NF- κ B. Desde el descubrimiento en 1991 de que el H₂O₂ puede activar a este factor de transcripción en mamíferos, se han realizado muchos estudios para investigar el mecanismo molecular por el cual se lleva a cabo esta activación. En mamíferos, el H₂O₂ activa NF- κ B y facilita la unión de este factor al motivo κ B en la región promotora de genes de respuesta inmune de la fase aguda, llevando al inicio de la transcripción (Gloire, *et al.*, 2006).

En insectos también se ha observado la activación de factores de transcripción por peróxido de hidrógeno. Por ejemplo, en *Hyalophora cecropia*, el factor de inmunorespuesta (CIF) el cual se une específicamente a secuencias “ κ B-like” es activado por el H₂O₂, de manera similar a mamíferos (Sun y Faye, 1995). CIF no se detectó en insectos no retados, pero se indujo fuertemente cuando las pupas de *H. cecropia* se retaron con bacterias, lo que sugiere que CIF es un factor de transcripción crucial para la expresión de genes involucrados en respuesta inmune (genes inmunes). En *Sarcophaga peregrina*, la expresión de genes inmunes de fase aguda fue inhibida por 2-mercaptoethanol, indicando que la inducción de genes inmunes es mediada por tiol-oxidación. De manera interesante, un daño o herida en el integumento del insecto

activa genes inmunes de fase aguda (Natori, *et al.*, 1999). El efecto de ROS en la inducción de factores de transcripción en mosquitos aún no ha sido estudiado. En *A. gambiae*, el factor de transcripción Rel1 es translocado al núcleo en células de cuerpo graso en respuesta a un reto bacteriano y tiene habilidad de unirse a sitios “ κ B-like” *in vitro* (Barilla-Mury, *et al.*, 1996). Sin embargo la activación de Rel1 por H₂O₂ u otros radicales libres no ha sido estudiada.

En el presente trabajo, estamos interesados en entender el papel de los radicales libres de nitrógeno y oxígeno en la regulación de la respuesta inmune sistémica en el mosquito. En el laboratorio hemos demostrado que el intestino del mosquito *A. albimanus* en cultivo es capaz de generar NO cuando los mosquitos son retados con diferentes microorganismos, incluyendo bacterias (*Micrococcus luteus* y *Serratia marcescens*), levaduras y oocinetos de *P. berghei*. En este caso, los mosquitos fueron inoculados vía enema y una hora después de la inoculación se obtuvieron los intestinos y se colocaron en cultivo, 48 horas después se cuantificó NO liberado al sobrenadante por reacción de Griess, siendo mayor la producción de NO en los mosquitos retados que en los no retados (datos no publicados). Así mismo, *A. albimanus* genera ROIs, como anión superóxido y peróxido de hidrógeno (Lanz, *et al.*, 2002). Por lo que probablemente el NO y el H₂O₂ podrían tener un papel importante en la regulación de la respuesta inmune sistémica del mosquito cuando es infectado por *P. berghei*.

JUSTIFICACIÓN

La respuesta inmune de los mosquitos es muy importante para evitar la transmisión del paludismo así como de otras enfermedades de relevancia en salud pública. Se ha observado que las respuestas celular y humoral (melanización y producción de PAM) son fundamentales para enfrentar al parásito. Así mismo, existen antecedentes de que la inducción de la inmunidad sistémica en el mosquito interrumpe el desarrollo del parásito. Sin embargo, la o las moléculas que inducen la activación de la respuesta inmune en los mosquitos se desconocen. Durante la infección del mosquitos con el parásito *Plasmodium*, el intestino es la primera barrera de defensa en respuesta, y durante la invasión el epitelio intestinal por los oocinetos, éste genera óxido nítrico (NO) y H₂O₂. Es posible que estas moléculas puedan participar como señales para la activación de la respuesta sistémica mediando la comunicación entre el intestino y los tejidos abdominales.

A pesar de los esfuerzos que se han realizado para el control de la malaria, esta enfermedad sigue siendo un problema de muy importante de salud pública a nivel mundial, por lo que es fundamental incrementar el conocimiento de la respuesta inmune de los mosquitos, para desarrollar nuevas estrategias que permitan interrumpir la invasión y el desarrollo del parásito.

III. HIPÓTESIS.

El intestino del mosquito *A. albimanus* produce y libera óxido nítrico y peróxido de hidrógeno durante la infección con *P. berghei*, y estas moléculas participan en la inducción de la respuesta inmune sistémica en el mosquito.

IV. OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL.

Evaluar la producción de NO y H₂O₂ en el mosquito *A. albimanus*, así como su participación en la inducción de la respuesta inmune sistémica en el mosquito, durante la infección con oocinetos de *P. berghei*.

OBJETIVOS PARTICULARES:

1. Determinar el patrón de expresión de los marcadores de respuesta inmune (gambicina, cecropina A y atacina) en el mosquito *A. albimanus* durante la infección con *P. berghei*.
2. Analizar la producción de óxido nítrico y H₂O₂ en el intestino y hemolinfa de *A. albimanus* durante la infección con *P. berghei*.
3. Examinar el efecto del óxido nítrico y H₂O₂ exógenos en la expresión sistémica de los marcadores moleculares de respuesta inmune en el cuerpo graso del mosquito *A. albimanus*.
4. Demostrar que el NO y H₂O₂ que se generan en el mosquito *A. albimanus* durante la infección con *P. berghei* induce la expresión de los MRI en cuerpo graso.

RESULTADOS

Los resultados del presente trabajo se presentan en dos partes, en la primera parte se describe la identificación de los péptidos antimicrobianos (PAM) atacina, cecropina y gambicina, utilizados como marcadores de respuesta inmune. La segunda parte de los resultados se presenta en un artículo.

1. Identificación de marcadores de respuesta inmune en el mosquito *A. albimanus*.

Para medir la inducción de respuesta inmune en el mosquito *A. albimanus*, se seleccionaron tres genes a partir de una base de datos de EST de *A. albimanus* (disponible en el sitio de Instituto Nacional de Salud Publica, http://imm.insp.mx:8008/gdav_albimanus_v1/ y NCBI.) los cuales codifican para tres péptidos antimicrobianos y han sido reportados como marcadores de respuesta inmune en el mosquito *A. gambiae* (Dimopoulos, *et al.*, 1997). Las secuencias individuales de estos genes de interés (gambicina, cecropina y atacina) se analizaron por BlastX contra *A. gambiae* (Agam P3.46) y *Drosophila melanogaster* (BDGP4.3.46). Las clonas correspondientes a los marcadores de respuesta inmune se recuperaron y secuenciaron nuevamente. De esta manera se obtuvo la secuencia completa del homólogo de gambicina de *A. albimanus* a partir de la clona correspondiente, mientras que para los genes atacina y cecropina las secuencias obtenidas correspondieron a una región parcial del gen.

Para obtener el gen completo de estos, se realizó la técnica de RACE-5' con el sistema SMART II RACE (Clontech), utilizando los oligonucleótidos 5R-Atta 5' GGTCCCGTAGCCGTCCTCATGGGTGG-3' para el gen de atacina y C3_5R5'-

GCCGCCTTGAACACATTCCGACCCAGC-3' para el correspondiente a cecropina. Los productos fueron clonados utilizando el sistema Topo, para su posterior secuenciación.

Las secuencias obtenidas fueron ensambladas y anotadas en INTERPRO usando Vector NTI (Invitrogen). Los números de acceso correspondientes de GenBank son Aa-Gambicin (EF686019); Aa-Cecropin (EF686020); y Aa-Attacin (EF686018).

El análisis de secuencia muestra que estos genes, atacina, cecropina y gambicina presentan una alta porcentaje de similitud (83, 80 y 76.9% respectivamente) con los correspondientes a *A. gambiae* y se encuentra altamente conservado con respecto a otros insectos. Las secuencias de la proteína predichas corresponden a péptidos de 10.11, 3.84 y 6.6 Kd para atacina, cecropina y gambicina, respectivamente.

Una vez obtenidas las secuencias de los mensajeros que codifican para los PAM se diseñaron oligonucleótidos específicos para caracterizar su expresión.

Para caracterizar la expresión de los PAM durante el ciclo de vida de los mosquitos se obtuvo el ARN total de los diferentes estadios del mosquito, de huevo (2000 huevos), larvas estadios 1 a 4, pupas y adultos machos y hembras (20 a 100 organismos completos por estadio). El análisis de expresión se realizó por RT-PCR en tiempo real, donde se observó que los tres péptidos antimicrobianos, atacina, gambicina y cecropina, se expresaron en las etapas larvaria (de L1 a L4) pero no en huevo ni en el estadio de pupa, (figura 5). Así mismo se expresaron tanto en adultos machos como en hembras (3 días de edad), sin embargo, el tratamiento con antibiótico-antimicótico por tres días en los adultos hembra redujo la expresión de los péptidos antimicrobianos.

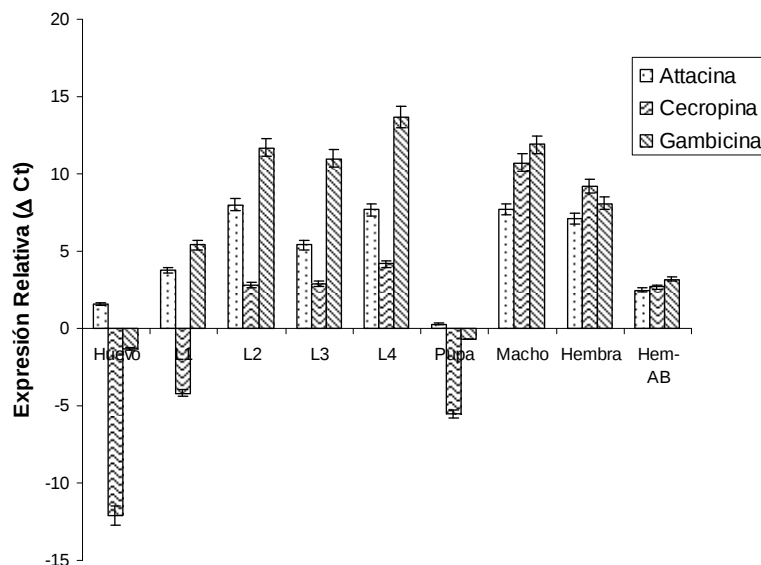


Figura 5. Expresión de los PAM durante el ciclo de vida del mosquito *A. albimanus*. La expresión de los PAM fue determinada por PCR en tiempo real a partir de RNA extraído de los diferentes estadios del ciclo de vida y está expresada como ΔCt , que representa la expresión del gen con respecto al gen endógeno (actina). L, larva; Hem-AB, hembras tratadas durante 2 días con antibiótico.

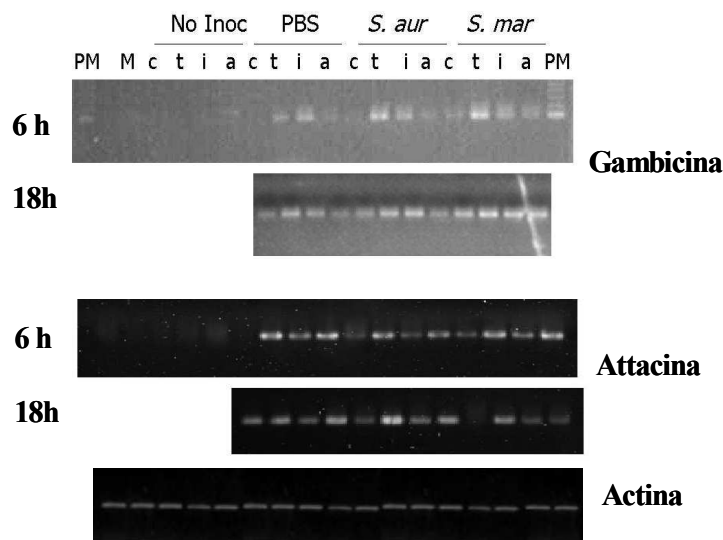


Figura 6. Expresión de los PAM en el mosquito *An. albimanus*. Expresión de Gambicina y Atacina a 6 y 18 horas post-inoculación bacteriana. Mosquitos fueron inoculados intratorácicamente con PBS, *S. aureus* o *S. marcescens* y se obtuvo el RNA de diferentes partes del cuerpo (c, cabeza; t, tórax; i, intestino y a, abdomen) a 6 y 18 horas post infección. La expresión se determinó por RT-PCR punto final.

Para evaluar la pertinencia de usar los PAM como marcadores de respuesta inmune se analizó la expresión de genes en mosquitos hembras de 3 días post-emergencia; para lo cual los mosquitos fueron tratados con antibiótico-antimicótico durante 3 días previos al experimento, para evitar la expresión debida a la flora intestinal normal; al cabo de este tiempo los mosquitos fueron infectados intratoráxicamente con una aguja de disección 'humedecida' en una solución de PBS que contenía bacterias muertas por calor, *S. aureus* (Gram positiva) o *S. marcescens* (Gram negativa). A 6 y 18 horas post-inoculación se disecaron los mosquitos (obteniendo cabeza, tórax, intestino y abdomen) y se extrajo el ARN de cada tejido. Los resultados de RT-PCR punto final (figura 6), mostraron que en los mosquitos no inoculados no se expresaron estos genes, y que 6h post-inoculación, tanto PBS (control de manipulación y vehículo de infección) como las bacterias *S. aureus* y *S. marcescens* llevaron a la inducción de la expresión tanto de gambicina como de atacina, principalmente en tórax, el sitio de inoculación. A las 18 horas, se puede observar que la expresión de ambos genes es prácticamente sistémica, expresándose en todos los tejidos. Estos resultados, aunque no se hicieron cuantitativos nos sugieren que se inducen bajo un estímulo inmune, y que la manipulación *per se* (o estrés), también puede inducir la expresión de estos péptidos en los mosquitos. Por otro lado, también se analizó la inducción de la expresión de los PAM cuando los mosquitos fueron infectados con *P. berghei* (ver abajo).

2. The effect of Nitric Oxide and Hydrogen Peroxide in the activation of the systemic immune response of *Anopheles albimanus* infected with *Plasmodium berghei*.

Antonia Herrera-Ortiz, Jesús Martínez-Barnetche, Nienke Smit, Mario H. Rodríguez and Humberto Lanz-Mendoza. En la revista Developmental and Comparative Immunology, y fue aceptado para su publicación el 4 Agosto de 2010 (Anexo 1)

En este artículo se describe el papel de las moléculas NO y H₂O₂ generadas por el mosquito *A. albimanus* durante la infección con *P. berghei*, en la regulación de la respuesta inmune sistémica.

A. Generación de NO y H₂O₂.

Primeramente se investigó si el mosquito *A. albimanus* es capaz de generar óxido nítrico *in vivo*, durante la infección con *P. berghei*. Para tal efecto, mosquitos pre-tratados con antibiótico-antimicótico, se alimentaron con ratones BALB/c infectados con *P. berghei* (parasitemia del 10%; cepa ANKA-1 PbGFP_{CON}; Franke-Fayard *et al.*, 2004); como control se utilizaron mosquitos alimentados con sangre no infectada. Veinticuatro horas post-alimentación se obtuvo la hemolinfa de 100 mosquitos por perfusión y se cuantificó la concentración de nitritos y nitratos por medio de la reacción de Griess. Los resultados mostraron que 24 h después de la alimentación sanguínea se puede encontrar NO en la hemolinfa de mosquitos alimentados con sangre infectada (17 µM NO) en contraste de los mosquitos alimentados con sangre no infectada (Figura 7a). Adicionalmente, los mosquitos fueron alimentados con 1 mg/ml, L-NAME, este

tratamiento redujo la generación de NO, indicando que el efecto observado se debe a la actividad de la enzima NOS.

La generación de H₂O₂ fue ensayada en sobrenadantes de cultivo de intestinos de mosquitos no infectados e infectados con *P. berghei*. Para tal efecto, se inocularon 10 mosquitos vía enema con 1000 oocinetos en RPMI, se incluyeron dos grupos control, mosquitos inoculados con solo RPMI y mosquitos no inoculados. Una hora después de la inoculación, los intestinos se disecaron y se colocaron en cultivo. Veinticuatro horas después, los sobrenadantes se colectaron para la cuantificación del H₂O₂ utilizando el kit Amplex Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay (Molecular Probes). Se observó que mosquitos inoculados con oocinetos o sólo RPMI, incrementaron la concentración de H₂O₂ con respecto al grupo no inoculados (no inoc, 19 µM, RPMI, 108 µM, Oocinetos 135 µM; figura 7b) pero los intestinos de mosquitos inoculados generaron 25 % más H₂O₂ que los inoculados sólo con RPMI (p=0.015).

B. Expresión de los péptidos antimicrobianos (PAM) en el mosquito *Anopheles albimanus* infectado con *P. berghei*.

Para determinar si la infección con *P. berghei* induce la expresión de los PAM se realizó análisis por RT-PCR en tiempo real. Los mosquitos fueron tratados previamente con antibiótico-antimicótico por 2 días, entonces se alimentaron con ratones BALB/c infectados con *P. berghei* (parasitemia del 15%; cepa ANKA-1 PbGFP_{CON}; Franke-Fayard *et al.*, 2004), como control se utilizaron mosquitos alimentados con sangre no

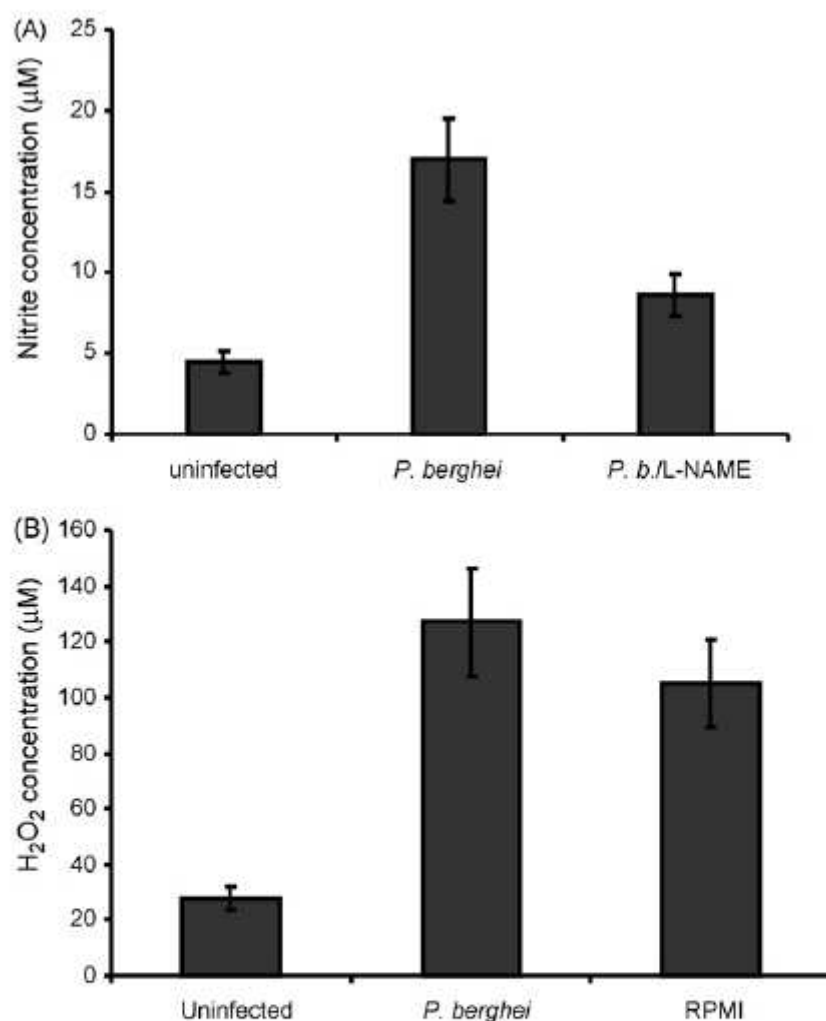


Fig. 1. Production of NO in haemolymph and H₂O₂ in midgut of *A. albimanus* is induced by *P. berghei* infection. (A) Mosquitoes were fed with blood from uninfected or *P. berghei*-infected mice and treated with L-NAME as described in Section 2. At 24h post-infection, their haemolymph was collected and NO concentration was evaluated. (B) Mosquitoes were inoculated by enema with either *P. berghei* ookinetes in RPMI or RPMI alone; not inoculated mosquitoes were included as a control. The midguts were dissected and placed in culture. Twenty-four hours later, culture supernatants were collected for quantification of H₂O₂.

Figura 7. Producción de óxido nítrico y peróxido de hidrógeno en el mosquito *A. albimanus*

infectada. Treinta intestinos y 30 abdómenes fueron disecados a diferentes tiempos (0, 6, 12, 18, 24 y 48 h post-alimentación) y se extrajo el ARN. La expresión relativa fue determinada por el método $\Delta\Delta C_t$ (Pfaffl, 2006) y se expresó como $XP.b./Xn.i.$, donde $XP.b.$ es la media del nivel de expresión del gen en mosquitos infectados y $Xn.i.$ es la media del nivel de expresión del gen en mosquitos no infectados. Los resultados mostraron (figura 8) que la presencia del parásito *P. berghei* en el mosquito induce la expresión de los PAM tanto en intestino como en tejido abdominal (cuerpo graso). Se observó que los PAM tienen cinéticas de expresión diferente en ambos tejidos, mientras que en el intestino la expresión de atacina se induce desde las 0 h, con un pico máximo de expresión a las 18 h (8 veces más que en los mosquitos no infectados, $p=0.002$), cecropina muestra su pico máximo de expresión a las 6h (25 veces más que los mosquitos no infectados, $p=0.001$) y gambicina hasta las 12 h (23 veces más que los mosquitos no infectados $p=0.001$), en tanto que en el tejido abdominal el pico máximo de expresión de gambicina, cecropina y atacina es a las 6, 12 y 18 h respectivamente. Los niveles de expresión que muestran estos genes en los mosquitos infectados versus los no infectados son de 18, 40 y 25 veces para gambicina, cecropina y atacina, respectivamente ($p=0.001$).

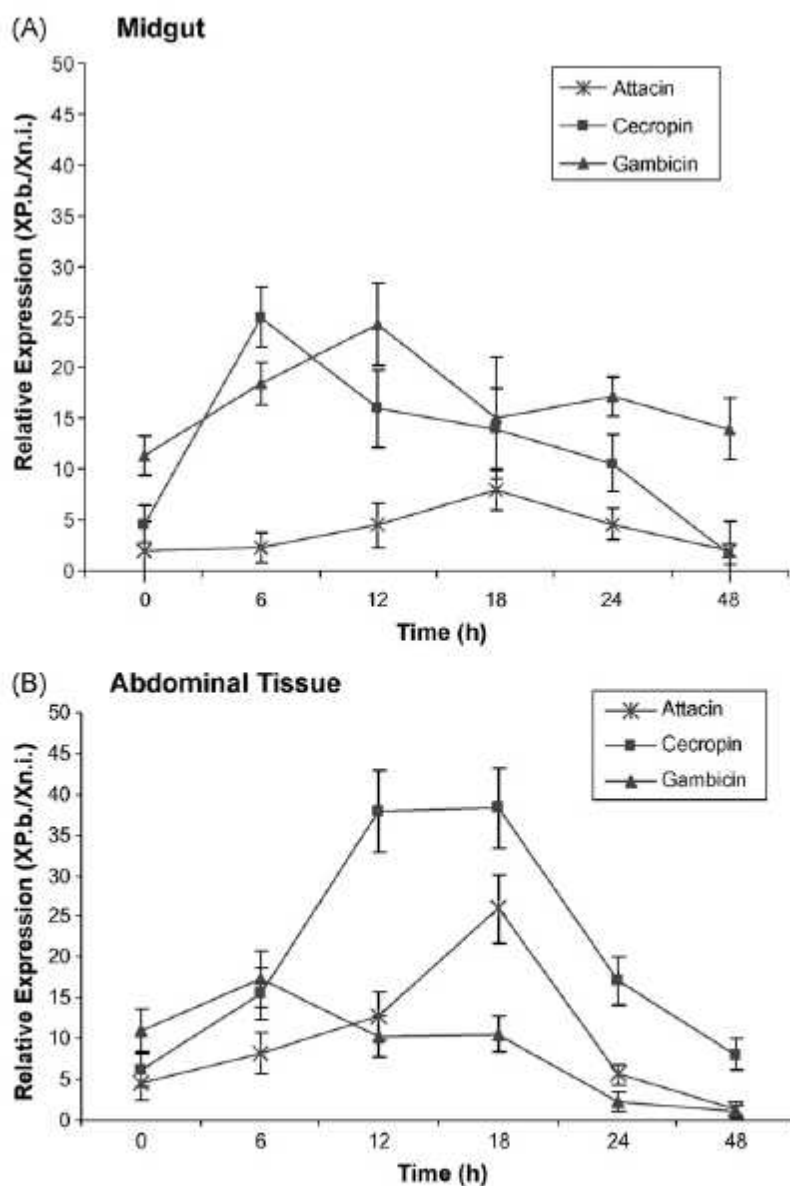


Fig. 2. Expression of mRNA antimicrobial peptides (AMPs) in midgut and abdominal tissues of *A. albimanus* is induced by *P. berghei* infection. Mosquitoes were fed with *P. berghei*-infected mouse blood. (A) Midguts and (B) abdominal tissues were dissected and RNA extracted (as described in Section 2) at different times of post-feeding. AMP's expression was measured by real-time PCR. The figure depicts the relative AMP's expression of organs from infected mosquitoes in relation to that of not-infected ones.

Figura 8. Expresión de los péptidos antimicrobianos (PAM) en el mosquito *A. albimanus* durante la infección con *P. berghei*.

C. Efecto de la inhibición *in vivo* de la generación de NO y H₂O₂ en la expresión de los PAM.

Para evaluar si los radicales generados por el intestino del mosquito participan en la inducción de la expresión de los PAM en el cuerpo graso, se inhibió la producción de radicales libres, tanto de NO como H₂O₂, mediante el tratamiento con L-NAME y vitamina C. Para lo cual los mosquitos se alimentaron durante tres días previos al experimento con 25 mg/ml de vitamina C, “scavenger” de H₂O₂ (Molina-Cruz *et al.*, 2008) o con 1 mg/ml de L-NAME, inhibidor de NOS (Luckhart *et al.*, 1998). Entonces los mosquitos fueron infectados como se menciona antes y se mantuvo el tratamiento con L-NAME y vitamina C hasta el término del ensayo. Se encontró (figura 9) que los mosquitos que habían sido tratados con L-NAME (inhibidor competitivo de la enzima NOS) no sobre-expresaron gambicina, efecto mostrado desde las 6h de manera significativa cuando se compara con los mosquitos infectados no tratados ($p=0.001$); la sobre-expresión de atacina y cecropina también se modificó, sin embargo la inhibición no fue tan evidente como en gambicina. Por otra parte, el tratamiento con vitamina C (molécula antioxidante y que se ha usado para la eliminación de H₂O₂ en mosquito; Kumar *et al.*, 2004) inhibió de manera significativa la expresión de los tres PAM aunque la inhibición en la expresión de atacina fue parcial.

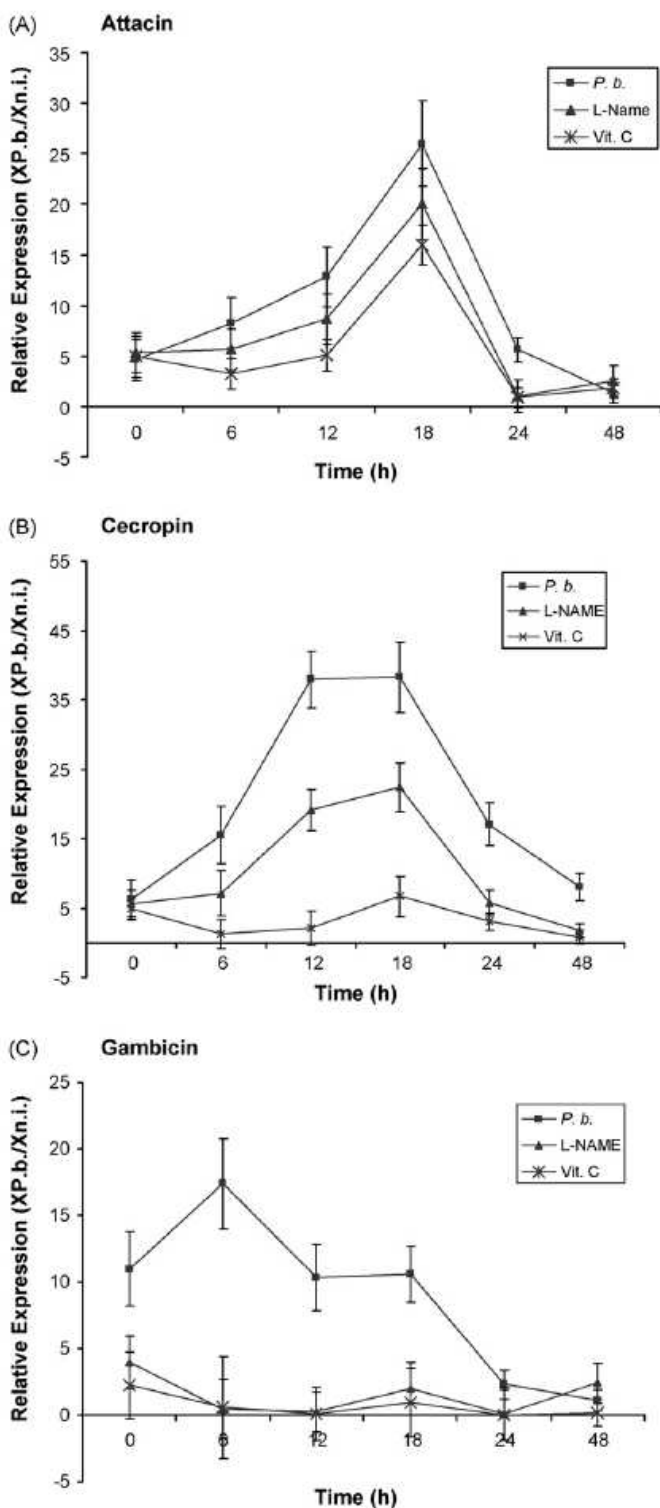


Fig. 3. The expression of mRNA antimicrobial peptides induced in abdominal tissues by *P. berghei* infection is reduced by treatment with NO synthase inhibitor and a H_2O_2 scavenger. Mosquitoes were fed with L-NAME (1 mg/ml) and vitamin C (25 mg/ml) during two days before to the end of the experiment. Mosquitoes were infected with *P. berghei* by the same procedure used in Fig. 2; and AMP's mRNA expression was measured by real-time PCR. The figure depicts the relative AMP's expression of organs from infected mosquitoes in relation to that of not-infected ones.

Figura 9. Inhibición de la expresión de péptidos antimicrobianos por L-NAME y Vitamina C.

D. Efecto de H₂O₂ y NO exógenos en la expresión de PAM en cuerpo graso *in vitro* y de la generación de NO en la el intestino de *A. albimanus*

El efecto del H₂O₂ y NO exógenos sobre el tejido abdominal (principalmente cuerpo graso) fue evaluado *in vitro*. Los abdómenes fueron disecados y colocados en placas de 96 pozos (5 abdómenes/pozo en 200 µl de medio Schneider) y cultivados en presencia o ausencia de 2µM de H₂O₂ y/o 0.8 y 8 U/ml de catalasa (la cual convierte el H₂O₂ en H₂O) durante 24 h, tiempo al cual los tejidos fueron colectados y procesados para la extracción de ARN. También, se cultivaron abdómenes en presencia de diferentes concentraciones de SNP (nitroprusiato de sodio, donador de NO) por 24 h. Las concentraciones de SNP usadas fueron 0, 5, 10 y 20 µM. En el tejido abdominal en cultivo se observó que el H₂O₂ induce la sobre-expresión de los tres péptidos antimicrobianos 4.5 veces más con respecto al control (sin ningún tratamiento, p=0.001; figura 10 a), mientras que la presencia de catalasa, inhibió el efecto del H₂O₂ llevando la expresión de los genes al nivel del control. Resultados similares se obtuvieron cuando los abdómenes fueron cultivados en presencia de diferentes concentraciones de SNP (figura 10 b). La respuesta del tejido abdominal a la presencia de NO exógeno fue dosis respuesta, es decir a mayor concentración de SNP mayor expresión de los PAM; notablemente, gambicina fue inducida hasta 35 veces con respecto al control con la concentración más elevada de SNP (20 µM).

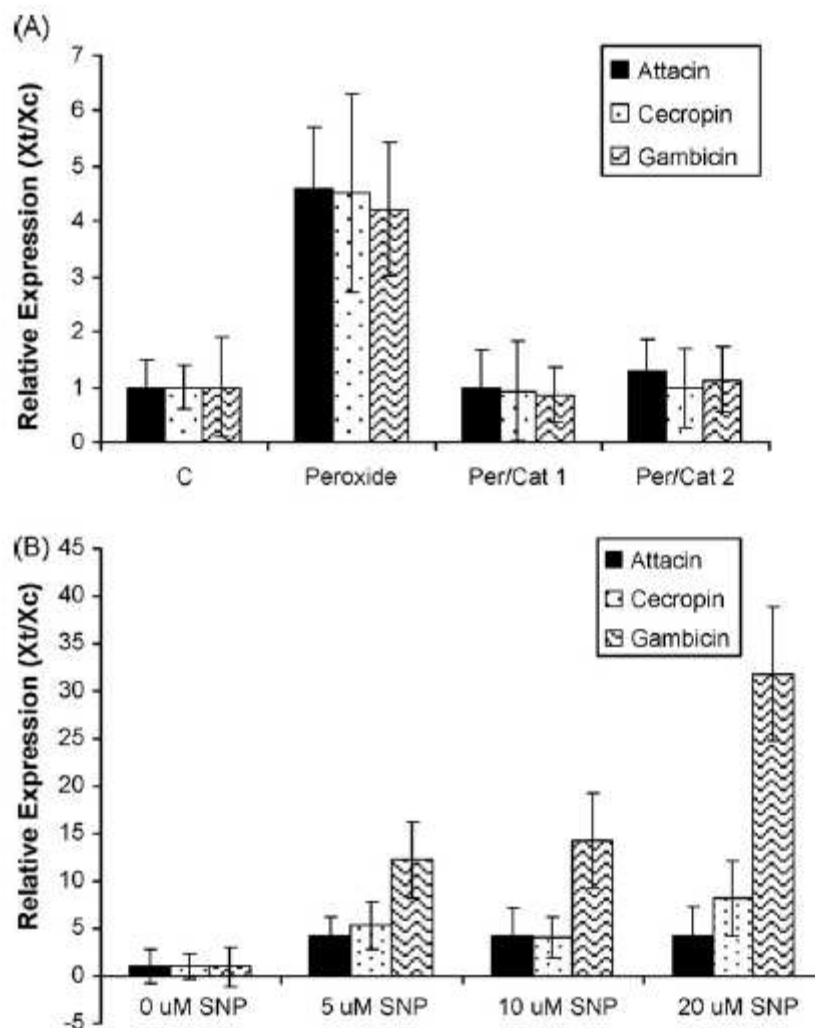


Fig. 4. Exogenous H_2O_2 and NO induce the expression of antimicrobial peptides mRNA in mosquito abdominal tissues *in vitro*. (A) Mosquito abdomens were cultured in the presence or absence of $2 \mu M H_2O_2$ during 24 h. The total RNA was obtained for AMP's expression analysis by real-time PCR. As a control catalase was added to two different concentrations (Per/Cat 1: 0.8 U/ml and Per/Cat 2: 8.0 U/ml, respectively). (B) Abdomen cultures were added with SNP (5, 10 and $20 \mu M$) and 24 h later, the total RNA was obtained for the analysis of AMP's expression by real-time PCR. The figure depicts the relative AMP's expression of treated organs in relation to that of not-treated ones.

Figura 10. Efecto *in vitro* de H_2O_2 y NO exógenos en la expresión de PAM en tejido abdominal del mosquito *A. albimanus*.

Finalmente, también se evaluó el efecto del H_2O_2 sobre la generación de NO en intestino *in vitro*. Con este objetivo, 10 intestinos/pozo de *A. albimanus* se cultivaron en una placa de 24 pozos en presencia o ausencia de 2mM H_2O_2 y/o 0.8 y 8.0 U/ml de catalasa. La concentración de nitritos fue medida por reacción de Griess, 24 h después de iniciado el cultivo. Los intestinos de mosquitos cultivados en presencia de H_2O_2 produjeron más NO que los intestinos no tratados (20 μM ; $p=0.001$; figura 11) y este efecto se revierte cuando se adiciona catalasa en el medio ($p=0.001$).

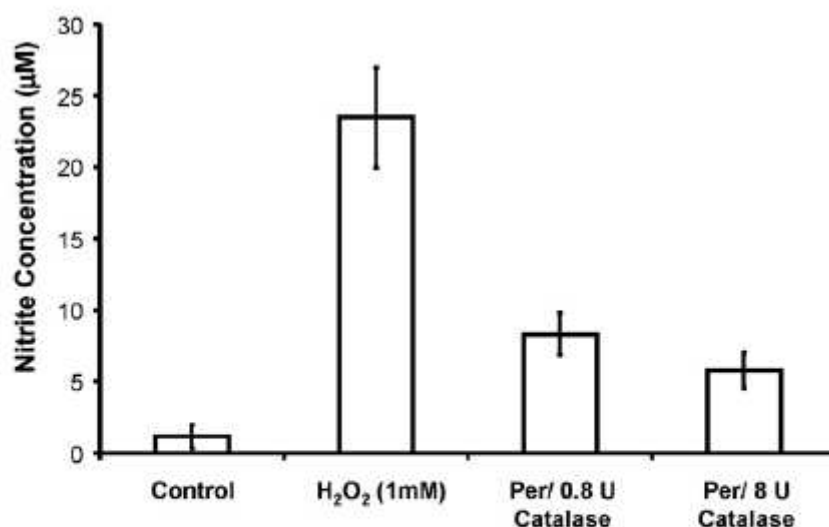


Fig. 5. Exogenous H_2O_2 induces the generation of NO in the midgut of *A. albimanus*. Mosquito midguts were cultured in the presence of 2 μM H_2O_2 . Midguts without treatment were cultured as control. In order to verify specific effects, midguts were cultured in the presence of 0.8 and 8 U/ml catalase. The concentration of nitrite and nitrate ($\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$) was quantified using the Griess reaction, 24 h after beginning the culture.

Figura 11. Efecto del H_2O_2 exógeno en la generación de NO en cultivo de intestino del mosquito *A. albimanus*.

DISCUSIÓN

La respuesta inmune del mosquito *Anopheles* tiene un papel muy importante en el desarrollo del parásito *Plasmodium*. Se ha demostrado que la capacidad inmunológica de los mosquitos es un factor determinante en su capacidad vectorial; por lo tanto, la comprensión de los mecanismos moleculares de la respuesta inmune de *Anopheles* contra el parásito puede ayudar en el desarrollo de nuevas estrategias para el control de la enfermedad.

En el presente trabajo, se utilizaron tres marcadores de respuesta inmune, que corresponden a tres péptidos antimicrobianos, atacina, cecropina y gambicina en el vector *A. albimanus*. Estos péptidos ya han sido descritos para otros insectos, incluyendo *A. gambiae*, el principal vector de la malaria en África (Vizioli, *et al.*, 2001; Fallon y Sun, 2001; Luna, *et al.*, 2006). La expresión de los PAM en el mosquito *A. albimanus* es de particular interés debido a que existe evidencia que presentan actividad contra *Plasmodium* (Boman, *et al.*, 1989). Gambicina es un péptido específico de mosquitos, y tiene actividad antimicrobiana y anti-*Plasmodium* (Vizioli, *et al.*, 2001; Christophides, *et al.*, 2002). Además, en nuestro grupo hemos observado la presencia del péptido cecropina en la hemolinfa de mosquitos infectados (Lanz-Mendoza, *et al.*, datos no publicados), indicando su probable participación en la eliminación del parásito. Por otra parte, hay evidencias que las regiones promotoras de la mayoría de los péptidos antimicrobianos presentan sitios NF- κ B, los cuales pueden ser regulados por H₂O₂ (Gloire, *et al.*, 2006)

El cuerpo graso es considerado uno de los principales órganos inmune en mosquitos. En este trabajo observamos que la infección con el parásito *P. berghei* induce la expresión de los PAM en el tejido abdominal en el mosquito *A. albimanus*. Así mismo se ha observado que durante la invasión del intestino del mosquito *A. gambiae*, por el oocineto de *P. berghei*, el cuerpo graso es capaz de sobre-expresar varios genes relacionados con inmunidad (Dimopoulos, *et al.*, 1999). La sobre-expresión de los PAM en el cuerpo graso a tiempos muy tempranos de la infección (6 a 18 h) cuando aún el parásito no ha atravesado el epitelio intestinal, sugiere que existe comunicación entre ambos tejidos, muy probablemente a través factores que son liberados por el epitelio intestinal que activan cascadas de señalización en el cuerpo graso. Otra posibilidad a investigar, es que moléculas o factores liberados por los parásitos sean los que activan la respuesta inmune.

El mosquito *A. albimanus* es capaz de generar NO y H₂O₂ en respuesta a la infección por *P. berghei* lo cual ha sido documentado en otros mosquitos, incluyendo *A. pseudopunctipennis* y *A. stephensi* (Herrera-Ortíz, *et al.*, 2004; Luckhart, *et al.*, 1998; Lanz-Mendoza, *et al.*, 2002). También se ha demostrado que ambas moléculas resultan tóxicas para el parásito y que ayudan a limitar la infección eliminando al parásito (Luckhart, *et al.*, 1998; Kumar, *et al.*, 2003; Herrera-Ortíz, *et al.*, 2004). Sin embargo, también existen evidencias que pueden activar el sistema inmune. El NO y H₂O₂ son moléculas que en mamíferos y plantas participa en señalización. Los resultados obtenidos sugieren la participación de estas moléculas en la regulación de la expresión

de los PAM, pues la inhibición *in vivo* de la generación de NO y H₂O₂ bloquea la sobre-expresión observada durante la infección, particularmente del gen que codifica para gambicina, mientras que se observa un bloqueo parcial en la sobre-expresión de atacina y cecropina, indicando que otros factores pueden estar involucrados en la regulación de la expresión de estos genes. Además el H₂O₂ y NO aplicados exógenamente en cultivo de cuerpo graso, inducen la expresión de los PAM, sugiriendo que estas molécula efectivamente puede regular la expresión de los PAM en el cuerpo graso.

El NO también puede tener participación en la activación de vías de señalización y comunicación celular, puesto que es una molécula pequeña altamente soluble en membrana, capaz de difundir hasta por 10µm para interactuar con otras moléculas, distancia suficiente para alcanzar el cuerpo graso (Hernández-Martínez, com. per.)

Por otra parte, en *Drosophila* la expresión de PAM está regulada por dos vía de señalización principales, la vía de Toll que lleva a la expresión del péptido drosomicina y es importante para la defensa contra infecciones por hongos y bacterias Gram-positivas, y la vía IMD, que regula la expresión de defensina, cecropina y atacina, siendo importante para controlar las infecciones por bacterias Gram-negativas (Naitza y Ligoxygakis, 2004). Ambas vías tienen como principal factor transcripcional a Dorsal y Rel respectivamente, miembros de la familia Rel/NFκB, lo que los hace susceptibles a ser regulados por radicales libres de oxígeno (ROS) incluyendo H₂O₂. Este sistema dual ROS/Péptidos antimicrobianos es esencial para la respuesta inmune de *Drosophila*

(Ryu, *et al.*, 2006). Aquí proponemos que un mecanismo de activación de las vías NF- κ B es mediada por ROS y básicamente por H₂O₂, pues demostramos que la adición de H₂O₂ exógeno a los cultivos de abdomen llevan a la expresión de los péptidos antimicrobianos y el efecto es revertido por catalasa. Se conoce que los ROS son generados en el epitelio intestinal durante la invasión del parásito de la malaria tanto en *A. gambiae* (Kumar, *et al.*, 2003), como en *A. albimanus* (Lanz-Mendoza, *et al.*, 2002), por lo que en intestino podría estar regulando la expresión de los péptidos antimicrobianos observada cuando hay infección con *P. berghei*.

Por otra parte, en este trabajo, demostramos que la adición directa de H₂O₂ en sistemas *in vitro*, es capaz de inducir la producción de NO el intestino de mosquitos, así como de los péptidos antimicrobianos en el cuerpo graso, sugiriendo que el H₂O₂ puede estar regulando la expresión de estos genes, probablemente vía NF- κ B. En *A. pseudopunctipennis* se demostró que el H₂O₂ liberado durante la oxidación de L-DOPA induce la expresión de la enzima NOS y esta inducción se disminuye cuando se le adiciona catalasa y su efecto se puede observar de igual manera cuando se cuantifica el NO producido por el intestino bajo estas condiciones (Herrera-Ortiz, *et al.*, 2004). Estos datos confirma la importancia del H₂O₂ en la regulación de la enzima responsable de la producción de NO.

De acuerdo al los resultados obtenidos sugerimos que la infección en el mosquito induce la generación de H₂O₂ en las primeras horas post-alimentación sanguínea. El H₂O₂ puede tener dos efectos, por una parte actuar de manera local, en el propio

intestino y directamente activar la expresión de PAM a través de los sitios NF- κ B presentes en diversos genes incluyendo los PAM y la NOS, activando una respuesta inmune local con la producción de PAM y generación de NO; de manera paralela, el H₂O₂ puede difundir hacia la hemolinfa y alcanzar cuerpo graso, donde también podría activar la expresión de PAM vía NF- κ B. Por su parte el NO generado en el intestino, puede tener su efecto tóxico sobre el parásito en las células epiteliales o de la misma manera difundir y llegar a cuerpo graso, donde puede activar alguna o algunas vías de señalización activando la respuesta inmune sistémica del mosquito (figura 12).

Desde el descubrimiento del ciclo de vida del parásito de la malaria hace más de un siglo, se ha avanzado mucho en el conocimiento del mismo y de la enfermedad, sin embargo la mortalidad por paludismo sigue representando uno de los problemas más importantes de salud pública a nivel mundial. Existe la posibilidad de manipular genes como los que codifican para péptidos antimicrobianos como estrategias de control genético usando mosquitos transgénicos. Así mismo, puesto que péptidos antimicrobianos presentan actividad anti-*plasmodium*, especialmente cecropina y gambicina, pueden tener aplicaciones terapéuticas útiles. Finalmente, el conocimiento en la actividad biológica del NO y H₂O₂ y su función en los mosquitos transmisores de enfermedades nos ayudará en la generación de nuevas estrategias para el control de la transmisión, mediante la regulación de la respuesta inmune sistémica en el mosquito. En ese sentido, la generación de mosquitos transgénicos que sean resistentes al parásito de la malaria, es una posibilidad para el control de la enfermedad.

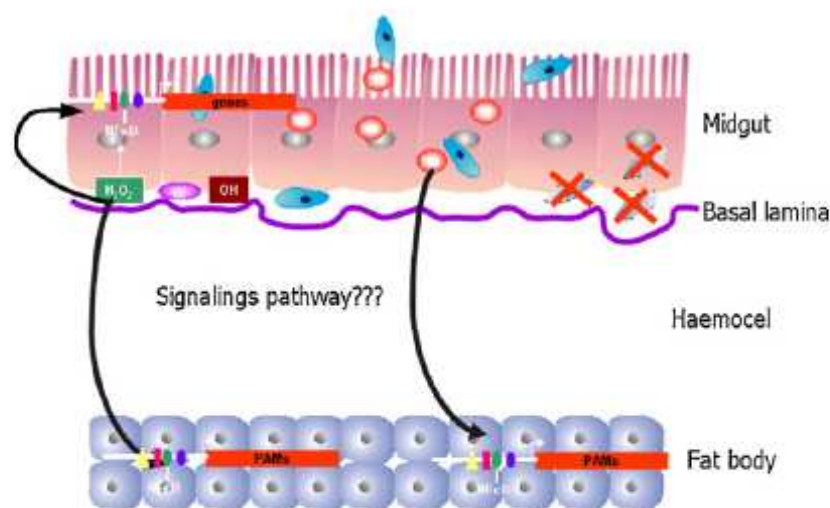


Fig. 6. Proposed role of H_2O_2 and NO in the immune response of *A. albimanus* to *P. berghei*. The mosquito infection induces the generation of H_2O_2 in the first hours post-blood feeding. The H_2O_2 can have two effects: (1) it can act locally in the midgut and directly activate the expression of AMPs and the enzyme nitric oxide synthase, which produces NO; (2) the H_2O_2 can diffuse into the haemolymph and reach the fat body, and activate one or more signaling pathways, thus activating the immune system of the mosquito.

Figura 12. Modelo propuesto para el papel de H_2O_2 y NO en la respuesta inmune de *A. albimanus* contra *P. berghei*.

CONCLUSIONES

1. Se identificaron tres genes marcadores de la respuesta inmune en el mosquito *A. albimanus*, los cuales corresponden a los péptidos antimicrobianos cecropina, gambicina y atacina.
2. El intestino del mosquito *A. albimanus* genera NO y H₂O₂ en presencia del parásito de malaria murina, *Plasmodium berghei*.
3. Los péptidos antimicrobianos atacina, gambicina y cecropina se sobre-expresan durante las primeras etapas de la infección del mosquito *A. albimanus* con el parásito *P. berghei* en el intestino y cuerpo graso.
4. La inhibición de la generación de NO y de la estabilidad de H₂O₂ disminuyen la expresión de los PAM observada por la presencia de *P. berghei* en el mosquito.
5. El H₂O₂ y NO exógenos son capaces de inducir la expresión de PAM en tejido abdominal en cultivo. Además, el peróxido de hidrógeno induce la generación de NO en intestino en cultivo.
6. El NO y H₂O₂ participan de manera relevante en la regulación de la expresión de atacina, cecropina y gambicina en el mosquito y probablemente en la activación de la respuesta inmune sistémica.

PERSPECTIVAS

En el presente trabajo se demostró que el mosquito *A. albimanus* genera NO y H₂O₂ y que además estas moléculas pueden regular la respuesta inmune del mosquito. Estudios recientes han mostrado la relevancia de los radicales libres de oxígeno y nitrógeno en la regulación de la expresión de numerosos factores. Sin embargo se desconocen los mecanismos de acción de estos, y aunque hay varios modelos propuestos, en insectos y en particular en mosquitos no se ha investigado.

Las modificaciones en cisteínas son el blanco principal del NO y H₂O₂, y las modificaciones en proteínas conteniendo este residuo pueden alterar su función, convirtiéndose así en un mecanismo de señalización.

La S-Nitrosilación es una modificación que se da por la unión de un grupo NO a un residuo de cisteína (u otro tiol), es una modificación reversible que juega un papel central en la señalización mediada por óxido nítrico. Se ha propuesto que la nitrosilación/desnitrosilación de proteínas puede funcionar como un “switch off/on” para la función de las proteínas, tal como lo hace la fosforilación (Mannick y Schonhoff, 2002). Existen numerosos ejemplos de proteínas que son nitrosiladas y que tienen efecto en vías de señalización, entre ellas NF- κ B, por lo que conocer en una primera etapa el “nitrosoproteoma” de los tejidos de mosquitos podría ayudar a determinar que proteínas están participando en la señalización mediada por NO en el mosquito *A. albimanus* durante la respuesta ante *P. berghei*.

De la misma manera, las reacciones llevadas por H₂O₂ con biomoléculas

representa un mecanismo de cómo las células pueden detectar cambios en el balance redox. Las cisteínas de las proteínas son particularmente sensibles a la oxidación, la interacción del grupo tiol de la cisteína con peróxido de hidrógeno lleva a la formación de ácidos sulfénicos (SO_2H), los cuales están implicados en un número importante de transformaciones bioquímicas, llevando a modificaciones post-traduccionales adicionales, como la “S-glutatiolación”, ácido sulfinico y sulfónico, así como la formación de disulfuros (Paulsen y Carroll, 2010).

Por otro lado, alteraciones en el patrón de fosforilación de las proteínas es uno de los mecanismos que se conocen en que actúan los radicales libres.

En el grupo de trabajo estamos interesados en conocer los mecanismos de cómo podrían estar actuando el NO y el H_2O_2 , así empezamos a trabajar con las técnicas apropiadas como la detección de proteínas S-Nitrosiladas, y proteínas fosforiladas. En resultados preliminares hemos encontrado que en cultivo de abdomen el NO y H_2O_2 exógenos tuvieron un efecto en el patrón de proteínas fosforiladas en treonina y tirosina, pero no en serina. Se observó una proteína de aproximadamente 130 kDa que es fosforilada en treonina así como dos proteínas de 35 y 170 kDa aproximadamente (figura 13), fosforiladas en tirosina en el tratamiento con NO y H_2O_2 . La identidad de dichas moléculas se desconoce por el momento, pero se está trabajando en la identificación de las mismas.

Manipular el sistema inmunitario innato de mosquitos puede afectar negativamente su capacidad de servir de anfitriones para el desarrollo de la enfermedad-causando los

microbios. El conocimiento de cómo funciona este sistema en mosquitos nos puede ayudar a desarrollar nuevas estrategias para bloquear el desarrollo del parásito en el mosquito y por lo tanto la transmisión.

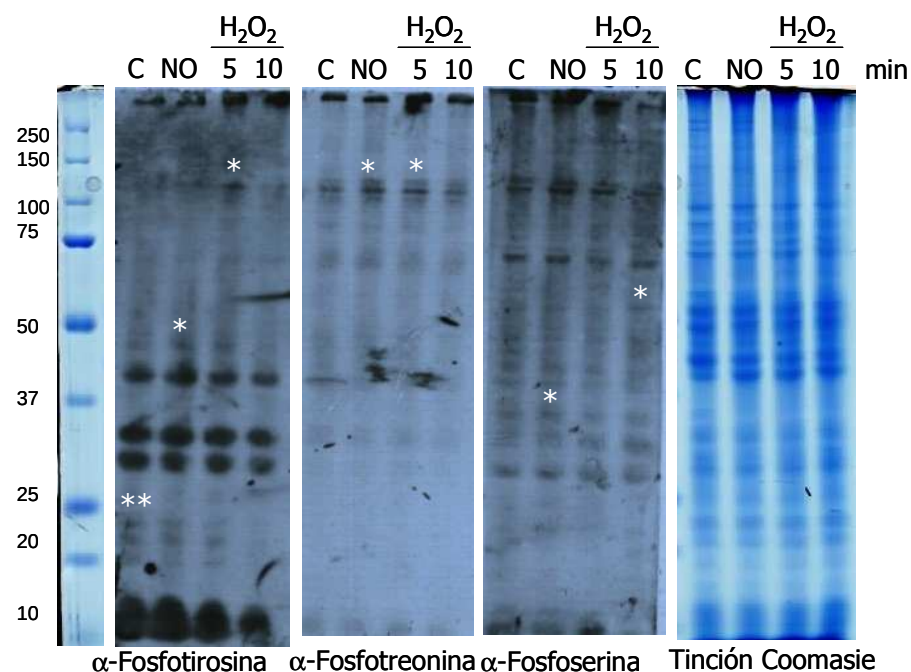


Figura 13. Efecto del NO y H₂O₂ en el patrón de proteínas modificadas por fosforilación en tejido abdominal del mosquito *A. albimanus*. Las proteínas fueron obtenidas a partir de cultivo de abdomen tratado con SNP y H₂O₂ por 5 y 10 minutos. Las proteínas se extrajeron en Buffer RIPA 1X y se transfirieron a membrana de nitrocelulosa. Se utilizaron anticuerpos anti-fosfotirosina, anti-fosfotreonina y anti-fosfoserina para la detección de las proteínas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Alonso, P.L. (2006). Malaria: deploying a candidate vaccine (RTS,S/AS02A) for an old scourge of human kind. *International Microbiology* 9: 83-93.
2. Anstey, N.M., Weinberg, J.B., Granger, D.L. (2002). Nitric Oxide in Malaria. In: Nitric Oxide and Infections Ed. Ferric C. Fang Univ. Color. Health Scienc. C. Denver, Colorado KLUWER. 311-341.
3. Barillas-Mury, C., Charlesworth, A., Gross, I., Richman, A., Hoffmann, J.A., Kafatos, F.C. (1996). Immune factor Gambif1, a new rel family member from the human malaria vectors *Anopheles gambiae*. *EMBO J.* 15: 4961-4701.
4. Barillas-Mury, C., Han, Y-S., Seeley, D., Kafatos, F.C. (1999). *Anopheles gambiae* AgSTAT, a new insect member of the STAT family, is activated in response to bacteria infection. *EMBO J.* 18: 959-967.
5. Beier, J.C. (1998). Malaria parasite development in mosquitoes. *Annu. Rev. Entomol.* 43: 519-543.
6. Bogdan, C., Rölinghoff, M., Diefenbach, A. (2000). Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates en innate and specific immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 12: 64-76.
7. Breman, J.G. (2001). The ears of the hippopotamus: manifestations, determinants, and estimates of the malaria burden. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 64: 1-11.
8. Brogden, K. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?. *Nature Reviews Microbiology* 3: 238-250.
9. Carballar-Lejarazú, R., Rodríguez, M.H., Hernández-Hernández, F. de la Cruz, Ramos-Castañeda, J., Possani, L.D., Zurita-Ortega, M., Reynaud-Garza, E., Hernández-Rivas R, Loukeris, T., Lycett G. Lanz-Mendoza, H. (2008). Recombinant scorpine: a multifunctional antimicrobial peptide with activity against different pathogens. *Cell. Mol. Life Sci.* 65: 3081 – 3092.
10. Cerenius, L., Söderhäll, K. (2004). The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunol. Rev.* 198: 116-126.
11. Chan, A. S. T., Rodríguez, M.H. Torres, J.A. Rodríguez, M. D.C., Villareal, C. (1994). Susceptibility of three laboratory strains of *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae) to coindigenous *Plasmodium vivax* in southern Mexico. *J. Med. Entomol.* 31: 400-403.
12. Christensen, B.M., Severson, D.W. (1993). Biochemical and molecular basis of mosquito susceptibility to *Plasmodium* and filarioid nematodes. EN: *Parasites and Pathogens of Insects*, (eds. Beckage, N., B. Federici and S.N. Thompson), Academic Press, pp. 245-266.
13. Christophides, G.K., Zdobnov, E., Barillas-Mury, C., Birney, E., *et al.* (2002). Immunity-related genes and gene families in *Anopheles gambiae*. *Science.* 298 (5591): 159-165.
14. Christophides, G.K., Vlachou, D., Kafatos, F.C. (2004). Comparative and functional genomics of the innate immune system in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Immunol. Rev.* 198: 127-148.
15. Collins, F.H., Besansky, N.J. (1994). Vector biology and the control of malaria in Africa. *Science* 264: 1874-1875.
16. Collins, F.H., Paskewitz, S.M. (1995). Malaria: Current and future prospects for control. *Ann. Rev.*

- Entomol. 50: 195-219.
17. Conde, R., Zamudio, F.Z., Rodríguez, M.H., Possani, L.D. (2000). Scorpine, an anti-malaria and anti-bacterial agent purified from scorpion venom. *FEBS Lett.* 471: 165–168.
 18. Crane, B.R., Arvai, A.S., Gachhui, R., Wu, C., Ghosh, D.K., Getzoff, E.D., Stuehr, D. ., Tainer, J.A. (1997). The structure of nitric oxide synthase oxygenase domain and inhibitor complexes. *Science.* 17; 278 (5337): 425-431.
 19. DeJong, R.J., Miller, L.M., Molina-Cruz, A., Gupta, L., Kumar, S., Barillas-Mury, C. (2007). Reactive oxygen species detoxification by catalase is a major determinant of fecundity in the mosquito *Anopheles gambiae*. 1: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 13; 104 (7): 2121-2126.
 20. Dimopoulos, G., Richman, A., Müller, H.M., Kafatos, F.C. (1997). Molecular immune responses of the mosquito *Anopheles gambiae* to bacteria and malaria parasites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94 (21): 11508-11513.
 21. Dimopoulos, G., Seeley, D., Wolf, A., Kafatos F.C. (1998). Malaria infection of the mosquito *Anopheles gambiae* activates immune-responsive genes during critical transition stages of the parasites life cycle. *EMBO J.* 17 (21): 6115-6123.
 22. Dimopoulos, G., Müller, H.M. Kafatos, F.C. (1999). How does *Anopheles gambiae* kill malaria parasites?. *Parassitologia* 41: 169-175.
 23. Dimopoulos, G., Müller, H.M., Levashina E.A., Kafatos, F.C. (2001). Innate immune defense against malaria infection in the mosquito. *Curr. Opin. Immunol.* 13: 79-88.
 24. Dimopoulos, G. (2003). Insect immunity and its implication in mosquito-malaria interactions. *Cell Microbiol.* 5 (1): 3-14.
 25. Eksi, S., Haile, Y., Furuya, T., Ma, L., Su, X., Williamson, K.C. (2005). Identification of a subtelomeric gene family expressed during the asexual-sexual stage transition in *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 143 (1): 90-99.
 26. Engström, Y., Loseva, O., Theopold, U. (2004). Proteomics of the *Drosophila* immune response. *Trends Biotech.* 22 (11): 600-605.
 27. Ezekowitz, R., Alan, B., Hoffmann, J.A. (2003). *Innate Immunity*. Human Press Totowa. 137-153.
 28. Foley, E., O'Farrell P.H. (2003). Nitric oxide contributes to induction of innate immune responses to gram-negative bacteria in *Drosophila*. *Genes Dev.* 17: 115-125.
 29. Filep, J. G., Beauchamp, M., Baron, C., Paquette, Y. (1998). Peroxynitrite mediates IL-8 gene expression and production in lipopolysaccharide-stimulated human whole blood. *J. Immunol.* 161(10):5656-5662.
 30. Gillespie, J. P.; Kanost, M., Trenczek, T. (1997). Biological mediators of insect immunity. *Annu. Rev. Entomol.* 42: 611-643.
 31. Gloire, G., Legrand-Poels, S., Piette, J. (2006). NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later. *Biochemical pharmacology* 72: 1493–1505.
 32. Gonzalez-Ceron, L., Rodriguez, M.H., Santillan, F., Chavez, B., Nettel, J.A., Hernandez-Avila, J.E.,

- Kain, K.C. (2001). *Plasmodium vivax*: ookinete destruction and oocyst development arrest are responsible for *Anopheles albimanus* resistance to circumsporozoite phenotype VK247 parasites. *Exp. Parasitol.* 98(3): 152-1561.
33. Greco, R., Tassorelli, C., Cappelletti, D., Sandrini, G., Nappi, G. (2005). Activation of the transcription factor NF-kappaB in the nucleus trigeminalis caudalis in an animal model of migraine. *Neurotoxicology* 26 (5): 795-800.
34. Han, Y.S., Thompson, J., Kafatos, F.C., Barillas-Mury C. (2000). Molecular interactions between *Anopheles stephensi* midgut cells and *Plasmodium berghei*: the time bomb theory of ookinete invasion of mosquitoes. *EMBO J.* 19 (22): 6030-6040.
35. Herrera-Ortíz, A., Lanz-Mendoza, H., Martínez-Barnette, J., Hernández-Martínez, S., Villarreal-Treviño, C., Aguilar-Marcelino, L., Rodríguez, M.H. (2004). *Plasmodium berghei* ookinetes induce nitric oxide production in *Anopheles pseudopunctipennis* midguts cultured in vitro. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34 (9): 893-901.
36. Hernández, S., Lanz, H., Rodríguez, M.H., Torres, J. A., Martínez-Palomo, A., Tsutsumi, V. (1999). Morphological and cytochemical characterization of female *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae) hemocytes. *J. Med. Entomol.* 36: 426-434.
37. Hoffman, J.A. (1997). Innate immunity of insects. *Curr. Opin. Immunol.* 7 (1): 4-10.
38. Hultmark, D. (1993). Immune reactions in *Drosophila* and other insects: a model for innate immunity. *Trends. Genet.* 9 (5): 178-183.
39. Imamura, M., Yang, J., Yamakawa, M. (2002). cDNA cloning, characterization and gene expression of nitric oxide synthase from the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Mol. Biol.* 11 (3): 257-265.
40. Ip, T. (2005). *Drosophila* innate immunity goes viral. *Nat. Immun.* 6 (9): 863 – 864.
41. Kantele, A., Marti, H., Felger, I., Müller, N., Jokiranta, T.S. (2008). Monkey Malaria in a European Traveler Returning from Malaysia. *Emerging Infectious Diseases* 14 (9): 1434-1436.
42. Karupiah, G., Harris, N. (1995). Inhibition of viral replication by nitric oxide and its reversal by ferrous sulfate and tricarboxylic acid cycle metabolites. *J. Exp. Med.* 181 (6): 2171-2179.
43. Kim, W., Koo, H., Richman, A.M., Seeley, D., Vizioli, J., Klocko, A.D., O'brochta, D.A. (2004). Ectopic Expression of a Cecropin Transgene in the Human Malaria Vector Mosquito *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae): Effects on Susceptibility to *Plasmodium*. *J. Med. Entomol.* 41 (3): 447-455.
44. Kuehn, A., Gabriele P. (2010). The Coming-Out of Malaria Gametocytes. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. Article ID 976827, 11 p
45. Kumar, S., Christophides, G.K., Cantera, R., Charles, B., Han, Y.S., Meister, S., Dimopoulos, G., Kafatos, F. C., Barillas-Mury, C. (2003). The role of reactive oxygen species on *Plasmodium* melanotic encapsulation in *Anopheles gambiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100: 14139–14144.
46. Kumar, S., Barillas-Mury, C. (2005). Ookinete-induced midgut peroxidases detonate the time bomb in anopheline mosquitoes. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35 (7): 721-727.
47. Lanz-Mendoza, H., Hernández-Martínez, S., Ku-López, M., Rodríguez, M. d. C., Herrera-Ortíz, A.,

- Rodríguez, M. H. (2002). Superoxide anion in *Anopheles albimanus* hemolymph and midgut is toxic to *Plasmodium berghei* ookinetes. J. Parasitol. 8 (4): 702-706.
48. Levashina, E.A., Moita, L.F., Blandin, S., Vriend, G., Lagueux, M., Kafatos, F.C. (2001) Conserved role of a complement-like protein in phagocytosis revealed by dsRNA knockout in culture cells of the mosquito, *Anopheles gambiae*. Cell 104: 709-718.
49. Luckhart, S., Vodovotz, Y., Cui, L., Rosenberg, R. (1998). The mosquito *Anopheles stephensi* limits malaria parasite development with inducible synthesis of nitric oxide. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95: 5700-5705.
50. Luna, C., Hoa, N.T., Lin, H., Zhang, L., Nguyen, H.L.A., Kanzok, S.M., Zheng, L. (2006). Expression of immune responsive genes in cell lines from two different Anopheline species. Insect Mol. Biol. 15 (6): 721-729.
51. MacMicking, J., Xie, Q.W., Nathan, C. (1997). Nitric oxide and macrophage function. Annu. Rev. Immunol. 15: 323-350.
52. Mannick, J.B., Schonhoff, C.M. (2002). Nitrosylation: the next phosphorylation?. Arch. Biochem. Biophys. 408: 1-6.
53. Medzhitov, R., Janeway, C.A. Jr. (1997). Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. Cell, 91: 295-298.
54. Müller, H.M., Dimopoulos, G., Blass C., Kafatos F.C. (1999). A hemocyte-like cell line established from the malaria vector *Anopheles gambiae* expresses six prophenoloxidase genes. J. Biol. Chem. 274: 11727-11735.
55. Munkirs, D.D., Christensen, B.M., Tracy, J.W. (1990). High-pressure liquid chromatographic analysis of hemolymph plasma catecholamines in immune-reactive *Aedes aegypti*. J. Invertebr. Pathol. 56 (2): 267-279
56. Murad, F. (1999). Discovery of some of the biological effects of nitric oxide and its role in cell signaling. Biosci. Rep. 19 (3): 133-154.
57. Naitza, S., Ligoxygakis, P. (2004). Antimicrobial defenses in *Drosophila*: the story so far. Molecular Immunology 40: 887-896.
58. Nappi, A.J., Vass, E., Frey, F., Carton, Y. (2000). Nitric Oxide involvement in *Drosophila* immunity. Nitric Oxide 4: 423-430.
59. Natori, S., Shiraishi, H., Hori, S., Kobayashi, A. (1999). The roles of *Sarcophaga* defense molecules in immunity and metamorphosis. Dev. Comp. Immunol. 23 (4-5): 317-328.
60. Nigam, Y., Azambuja, P., Ratcliffe, N.A. (1996) Insect Vector Immunity. En: New Directions in Invertebrate Immunology. Ed. by: Söderhäll, K., et al. SOS Publications, New Jersey. p.p. 401-442.
61. Osta, M. A., Christophides, G. K., Vlachou, D., Kafatos, F. C. (2004). Innate immunity in the malaria vector *Anopheles gambiae*: comparative and functional genomics. J. Exp. Biol. 207: 2551-2563.
62. Otvos, L. Jr. (2000). Antibacterial peptides isolated from insects. J. Peptide Sci., 6: 497-511.
63. Pages, F., Orlandi-Pradines, E., Corbel, V. (2007). Vectors of malaria: biology, diversity, prevention,

- and individual protection. *Med. Mal. Infect.* 37 (3):153-161.
64. Peterson, T.M.L., Grow, A.J., Luckhart, S. (2007). Nitric oxide metabolites induced in *Anopheles stephensi* control malaria parasite infection. *Free Radical Biology and Medicine*, 42: 132-142.
65. Phillips, R.S. (2001). Current status of malaria and potential for control. *Clin Microbiol Rev.* 14 (1): 208-226.
66. Ramos-Castañeda, J., González, C., Jiménez, M.A., Duran, J, Hernández-Martínez, S., Rodríguez M. H., Lanz-Mendoza, H. (2008). Effect of nitric oxide on Dengue virus replication in *Aedes aegypti* and *Anopheles albimanus*. *Intervirology.* 51 (5): 335-341.
67. Richman, A.M., Kafatos, F.C. (1996). Immunity to eukaryotic parasites in vector insects. *Curr. Opin. Immunol.* 8: 14-19.
68. Richman, A.M., Dimopoulos, G., Seeley, D., Kafatos F.C. (1997) *Plasmodium* activates the innate immune response of *Anopheles gambiae* mosquitoes. *EMBO J.* 16 (20): 6114-6119.
69. Rikans, L.E., Hornbrook, K.R. (1997). Lipid peroxidation, antioxidant protection and aging. *Biochem. Biophys. Act.* 31; 1362 (2-3): 116-127.
70. Shahabuddin, M., Kaslow, D.C. (1994). Biology of the development of *Plasmodium* in mosquito midgut: a molecular and cellular view. *Bulletin de l' Institut Pasteur.* 92: 119.
71. Shi, L., Paskewitz, S.M. (2006). Proteomics and insect immunity. *ISJ*, 3: 4-17.
72. Shin, S.W., Kokoza, V.A., Raikhel, A.S. (2003). Transgenesis and reverse genetics of mosquito innate immunity. *J. Exp. Biol.* 206: 3835-3843
73. Sinden, R.E., Alavi, Y., Raine, J.D. (2004). Mosquito-malaria interactions: a reappraisal of the concepts of susceptibility and refractoriness. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34 (7): 625-629.
74. Sun, S.C., Faye, I. (1995). Transcription of immune genes in the giant silkworm, *Hyalophora cecropia*, is augmented by H₂O₂ and diminished by thiol reagents. *Eur. J. Biochem.* 231 (1): 93-98
75. Van den Eede, P., Van, J.N., Van Overmeir, Ch., Vythilingam, I., Duc, T.N., Hung, L.X., Manh, N., Anné, J., D'Alessandro, H., Erhart, A. (2009) Human *Plasmodium knowlesi* infections in young children in central Vietnam. *Malaria Journal* 8: 249
76. Vernick, K.D., Fujikoa, H., Seeley, D.C., Tandler, B., Aikawa, M., Miller, L.H. (1995). *Plasmodium gallinaceum*: a refractory mechanism of ookinete killing in the mosquito *Anopheles gambiae*. *Exp. Parasitol.* 80 (4): 583-595.
77. Vizioli, J., Bulet, P., Hoffmann, J.A., Kafatos, F.C., Müller, H.M., Dimopoulos, G. (2001). Gambicin: a novel immune responsive antimicrobial peptide from the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98 (22): 12630-12635.
78. Winzeler, E. A. (2008). Malaria research in the post-genomic era. *Nature.* 455: 751-756.
79. World Health Organization, Unicef, RBM. World malaria report 2005.
80. World Health Organization, (2007). Global Malaria Programme. Epidemics and emergencies. <http://www.who.int/paludismo/epidemicsandemergencies.html>.

ANEXO 1



The effect of nitric oxide and hydrogen peroxide in the activation of the systemic immune response of *Anopheles albimanus* infected with *Plasmodium berghei*

Antonia Herrera-Ortiz, Jesús Martínez-Barnette, Nienke Smit,
Mario H. Rodriguez, Humberto Lanz-Mendoza*

Centro de Investigaciones sobre enfermedades Infecciosas, I.N.S.P., Avenida Universidad No. 655, Col. Santa María Ahuacatlán, Cuernavaca, Morelos C.P. 62100, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 May 2010

Received in revised form 2 August 2010

Accepted 4 August 2010

Available online 13 August 2010

Keywords:

Immune response

Nitric oxide

Hydrogen peroxide

Anopheles

Antimicrobial peptides

ABSTRACT

The expression of genes encoding the antimicrobial peptides (AMPs) attacin, cecropin and gambicin, as well as the effects of NO and H₂O₂ on their expression was investigated in midguts and fat bodies of *Anopheles albimanus* during the midgut infection with *Plasmodium berghei*. Midgut infection induced an increase in the expression of the three AMPs in both tissues; while NO and H₂O₂ were present in haemolymph. Treatment with L-NAME and vitamin C reduced the effect of *P. berghei* infection on the AMP's expression, and exogenous NO and H₂O₂ induced their expression in the mosquito fat body. The induction of AMPs in abdominal tissues, while the malaria parasites are in the mosquito midgut, suggests communication between the midgut epithelial cells and the abdominal tissue which has not yet had direct contact with the parasites. Free radical production in mosquito midgut and haemolymph during *Plasmodium* infection and their inductive effect on AMPs in abdominal tissues indicates the possible participation of these radicals in mediating a systemic immune response in this mosquito.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Malaria parasites are transmitted by *Anopheles* mosquitoes. *Plasmodium* male and female gametocytes are ingested during blood feeding and form extracellular gametes within the insect midgut. After fertilization, the resulting zygotes differentiate into ookinetes. These motile forms cross the peritrophic membrane and the intestinal epithelium and establish themselves between the epithelial cells and the basal membrane where they develop into oocysts. After 12–15 days post-infected blood ingestion, sporozoites emerge from mature oocysts into the haemocoel. Sporozoites migrate to the salivary glands and accumulate in the salivary ducts until they are injected into a vertebrate host during blood feeding (Beier, 1998; Shahabuddin and Kaslow, 1994).

During the infection, the mosquito mounts a very strong immune response and parasites abundance experiences a bottle neck, resulting in large losses during its development in the mosquito (Sinden and Billingsley, 2001). A small percentage of ingested gametocytes develop into ookinetes and of these only a portion reach the oocysts stage. At the later phases of infection, more than 80% of the haemocoel sporozoites do not succeed to reach the salivary glands and they are rapidly cleared from the

haemolymph (Sinden and Billingsley, 2001; Dimopoulos, 2003). These losses occur at the moment of mosquito immune responses peak and these responses have been linked to parasite elimination.

The mosquito's immune response is complex involving melanization, phagocytosis, production of antimicrobial peptides (AMPs), and the participation of several organs such as the midgut, fat body, dorsal vessel and haemocytes (reviewed in Dimopoulos, 2003). The exact mechanisms for the induction and regulation of these responses have not yet been fully characterized (reviewed by Yassine and Osta, 2010).

In *A. gambiae*, hydrogen peroxide (H₂O₂) levels increase dramatically after a blood meal, this is probably due to an increase in the metabolic processes associated with blood digestion and oogenesis (DeJong et al., 2007), as well as the defense mechanism induced by bacterial growth in the midgut after blood feeding.

It has been suggested that H₂O₂ participates in mosquito defenses; levels of H₂O₂ significantly increases in an *A. gambiae* malaria refractory strain (compared to a susceptible strain) after an infected bloodmeal (Kumar et al., 2003). Also, in the presence of L-DOPA, the haemolymph and midgut of anopheline mosquitoes, including *A. albimanus*, generate superoxide anion that is toxic to *P. berghei* ookinetes (Lanz-Mendoza et al., 2002; Kumar and Barillas-Mury, 2005). The involvement of H₂O₂ in the activation of the acute phase of the immune response via NF-κB is well documented (Gloire et al., 2006). However, its participation in the activation of the mosquito systemic immune response remains uncharacterized.

* Corresponding author. Tel.: +52 777 3293074; fax: +52 777 3175485.
E-mail address: humberto@insp.mx (H. Lanz-Mendoza).

Nitric oxide (NO) is produced in *Anopheles* midguts during *Plasmodium* infection (Luckhart et al., 1998; Dimopoulos et al., 1998; Herrera-Ortiz et al., 2004), and this molecule and its metabolites limit the parasite development (Luckhart et al., 1998; Peterson et al., 2007). In *Drosophila*, infection with Gram-negative bacteria induces the expression of nitric oxide synthase (NOS) and the inhibition of NOS activity decreased larval survival to Gram-negative bacterial infection. Also, NO produced during infection is involved in signal transduction for the expression of immune response genes as NOS activity inhibition prevents the induction of dipterin (Nappi et al., 2000; Foley and O'Farrell, 2003), exogenous NO induces the production of this antimicrobial peptide in uninfected *Drosophila* larvae (Foley and O'Farrell, 2003), and the injection of a NO donor induced the expression of the cecropin B gene in *Bombix mori* (Imamura et al., 2002).

In this paper, we report the induction and increase of the transcript abundance of the AMPs attacin, gambicin and cecropin genes and their induction by exogenous NO and H₂O₂ in the midgut and abdominal tissues of *A. albimanus* (a major malaria vector in Mexico and Central America) infected with *P. berghei*. These findings are indicative that NO and H₂O₂, produced in mosquito midgut during infection, function as signals for the activation of the mosquito systemic immune response.

2. Material and methods

2.1. Insects

Anopheles albimanus adult mosquitoes, age range 3–7 days post-emergence, from the insectary at the Centro de Investigaciones sobre Enfermedades Infecciosas (INSP), were used in all experiments. They were maintained at 27 °C and 75% relative humidity with 12 h light/dark cycle and fed on a 5% sucrose solution.

2.2. Infection of mosquitoes with *P. berghei*

Mosquitoes were treated with a 5% sucrose solution supplemented with antibiotic–antimycotic (GIBCO) (100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 0.25 µg/ml amphotericin) for two days. Mosquitoes were fed with a BALB/c mouse infected (10% parasitemia) with a recombinant *Plasmodium berghei*, PbGFP_{CON} (Franke-Fayard et al., 2004) (provided by R. E. Sinden, Imperial College UK), during 30 min, this point was considered time 0 h for the analysis of the parasite development kinetics over 48 h. Mosquitoes' infection was determined after 48 h by the presence of oocysts in their midguts under a fluorescent microscope (Leica DM 1000, Germany).

In some cases, mosquitoes were inoculated by enema into the midgut lumen, with approximately 1000 *P. berghei* ookinetes in RPMI, using a fine glass needle (Herrera-Ortiz et al., 2004). One hour after inoculation, midguts were removed and cultured. RPMI-inoculated and non-inoculated midguts were included as control. Cultured *P. berghei* ookinetes were obtained as described by Rodríguez et al. (2002).

2.3. Mosquito tissue culture

Midguts were collected from female adult mosquitoes. Prior to dissection, mosquitoes were cold-anesthetized and abdomens were washed with 70% ethanol and air-dried. Midguts were dissected in 20 µl of PBS (2.6 mM KCl, 1.5 mM KH₂PO₄, 140 mM NaCl and 8.2 mM NaH₂PO₄) containing protease inhibitors (2 mM phenylmethylsulfonyl-fluoride [PMSF], 0.1 mM Na-p-tosyl-L-lysine chloro-methyl ketone [TLCK], 1 mM EDTA and 0.1 mg/ml leupeptin [Sigma, St. Louis, MO]). To obtain abdominal tissues, the abdomen was separated from the mosquito body and cut longitudinally

with the bevel edge of a needle through the pleural membrane; the abdomen wall was placed in culture with the cuticle side up and the fat body in contact with Schneider culture medium (Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum (SFB) and antibiotic–antimycotic mixture (100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 0.25 µg/ml amphotericin). Tissues were cultured at 22–24 °C for 60 min and their viability was assessed by observing their motility and by superoxide anion generation using 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H tetrazolium bromide (MTT, Sigma Chem.) reduction assay, as described by Lanz-Mendoza et al. (2002).

2.4. Identification of antimicrobial peptides expressed in *A. albimanus*

Antimicrobial peptides were identified in an *A. albimanus* EST database (Martínez-Barnette, manuscript in preparation) available at the National Institute of Public Health website http://funcgen.vectorbase.org/ESTs/Anopheles_albimanus/INSP/v1 and NCBI. The sequences of individual genes of interest (gambicin, cecropin and attacin) were analyzed by BlastX against *A. gambiae* (Agam P3.46) and *D. melanogaster* (BDGP4.3.46).

The complete sequence of the *A. albimanus* homologue of gambicin was obtained from the corresponding clone. Incomplete sequence clones of attacin and cecropin were completed by RACE-5' technique (SMART RACE II, Clontech) using the oligonucleotides 5' Atta-5R'-GGTCCCGTAGCCGTCTCATGGGTGG-3' and C3_5R5'-GCCGCCTTGAACACATTCCGACCCAGC-3' for attacin and cecropin, respectively. The sequences were assembled and annotated in InterPro using Vector NTI (Invitrogen). Access numbers corresponding to GenBank are Aa-Gambicin (accession EF686019), Aa-Cecropin (EF686020) and Aa-Attacin (EF686018). Once gene sequences were completed, specific oligonucleotides were designed to amplify each gene by RT-PCR using the Vector NTI (Invitrogen).

2.5. Reverse transcription real-time PCR

Total RNA from 10 whole female mosquitoes or their tissues (20 midguts and 20 abdominal tissues) was obtained by Trizol method (Invitrogen) and then re-purified using RNA Clean-Up Kit (Zymo Research). cDNA was synthesized by reverse transcription using 1 µg of RNA, 100 ng of oligonucleotide dT, and 200 U of the enzyme reverse transcriptase RNase H-SuperScript II (Gibco BRL). For real-time PCR, 2.5 µl of (cDNA from the previous reaction) was used in Syber Green I Kit (Applied Biosystems) following the kit instructions. The primers used were for gambicin (AGAP008645) RT-Gam.F (CGTGCGATGGTCAGACGAT) and RT-Gam.R (CGCCGCGTTTACAAGAA); for attacin (AGAP005620) Atta.F (CGC TAC AAA GGC AAG ATG AAC) and Atta.R (TGT TTC CGC TCG CAC TCT TC); and for cecropin (AGAP000694) Cec3.F (GAAATTGGCAAACGACGTGAA) and Cec3.R (GCGATGCTAAAAGAC-TAAGGGC). As an internal control, a fragment of actin was amplified using primers RT-ActU.R (CGA TCC ACT TGC AGA GCC AGT) and RT-Act3.2.F (TAC GCC AAC ATT GTC ATG TCC). The amplification and detection of specific products was performed on ABI Prism 7900 HT real-time PCR system (Applied Biosystems, USA), using the following conditions: 1 cycle at 48 °C for 10 min, 1 cycle at 95 °C for 10 min, 40 cycles at 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. The fold changes in expression were calculated using the comparative "delta delta Ct" (ΔΔCt) method against the bloodfed control (Pfaffl, 2006) using three replicates per sample. Two independent experiments were done. The data represents the average fold-change relative to the control group. The amplification efficiency was similar between the test and control genes.

2.6. Determination of NO production in mosquitoes fed with *P. berghei*

Haemolymph was obtained by perfusion from 100 *P. berghei*-infected mosquitoes 24 h after a mouse-infected bloodmeal. Mosquitoes fed on uninfected mice were used as controls. For NOS inhibition experiments, mosquitoes were fed with *N*-nitro-L-arginine methyl ester (1 mg/ml, L-NAME, Sigma) since two days before blood feeding (Luckhart et al., 1998) and maintained until perfusion was carried out. Haemolymph concentrations of NO was indirectly determined by quantifying nitrite and nitrate ($\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$) using the Griess reaction (Eckmann et al., 2000). Fifty microliters of haemolymph were mixed with 50 μl of 1% sulfanilamide and 50 μl of 0.1% naphthylethylenediamine (Sigma, St. Louis, MO) and incubated for 10 min at room temperature. The absorbance was recorded at 540 nm in a plate reader (Labsystems, Multiskan Vienna, VA). NO was quantified using a NaNO_2 (1–100 μM) standard reference curve for each assay. This experiment was carried out in triplicate.

2.7. Determination of H_2O_2 production in in vitro cultured midguts of mosquitoes inoculated with *P. berghei*

The concentration of H_2O_2 was measured in cultured midguts; 10 mosquitoes were inoculated by enema with either 1000 *P. berghei* ookinetes in RPMI or RPMI without parasites; not inoculated mosquitoes were included as a control. One hour after inoculation, the midguts were dissected and placed in culture (Herrera-Ortiz et al., 2004). Twenty-four hours later, the supernatants were collected for quantification of H_2O_2 using amplex Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit (Molecular Probes), according to manufacturer instructions. Briefly, 50 μl of supernatant was placed in a 96 well plate and 50 μl of reaction mixture (100 μM amplex red and 0.2 U/ml HRP in reaction buffer) were added to each well. The plate, protected from light, was incubated for 30 min at room temperature and read at 540 nm (Dynex revelations). A standard curve was made of H_2O_2 concentrations varying from 0 to 300 μM in 50 μl of reaction buffer (0.05 M sodium phosphate, pH 7.4). This experiment was carried out in triplicate.

2.8. Expression of AMPs mRNA in *A. albimanus* infected with *P. berghei*

Mosquitoes were fed with *P. berghei*-infected mouse blood during 30 min, as described above, this point was considered time 0 h. Control mosquitoes were fed in the same manner with an uninfected mouse. Thirty midguts and 30 abdominal tissues were dissected at different times (6, 12, 18, 24 and 48 h post-feeding) and RNA extracted. AMP's expression was measured by real-time PCR. The relative expression was determined by the $\Delta\Delta\text{Ct}$ method and was expressed as $\text{XP.b.}/\text{Xn.i.}$ where XP.b. is the mean gene expression level in infected mosquitoes and Xn.i. is the mean gene expression level in uninfected mosquitoes. This experiment was carried out in duplicate.

2.9. Antioxidant supplementation effect on expression of AMPs mRNA in *A. albimanus* infected with *P. berghei*

Dietary supplementation of female *A. albimanus* with antioxidants was used to decrease levels of H_2O_2 and NO. Mosquitoes were fed with 10% sugar solution supplemented with either 25 mg/ml vitamin C, H_2O_2 scavenger (Molina-Cruz et al., 2008) or 1 mg/ml L-NAME, NOS inhibitor (Luckhart et al., 1998) beginning three days post-emergence until the end of the experiment. Mosquitoes were fed with *P. berghei*-infected or uninfected blood two days after the beginning of the treatment. Thirty abdominal tissues were dis-

sected at different times (6, 12, 18, 24 and 48 h post-feeding) and their RNA extracted. AMP's expression was measured by real-time PCR as described above. This experiment was carried out in duplicate.

Furthermore, the treatment effect was evaluated by measuring NO and H_2O_2 generation in 100 mosquitoes as described in Sections 2.6 and 2.7, respectively.

2.10. Effect of H_2O_2 and NO on the AMPs mRNA expression in abdominal tissues in culture

The effect of H_2O_2 and NO on the expression of antimicrobial peptides was evaluated *in vitro*. Abdomens dissected as mentioned above were placed in 96 well plates (5 abdomens/well in 200 μl Schneider's medium) and cultured in the presence or absence of 2 μM H_2O_2 and/or 0.8 and 8 U/ml catalase for 24 h; time at which the tissues were collected and processed for RNA extraction. Also, abdomens were cultured in the presence of different concentrations of SNP (sodium nitroprusiate, NO donor) by 24 h. The SNP concentrations used were 0, 5, 10 and 20 μM . The expression of genes coding for AMPs was assessed by RT-PCR. This experiment was carried out in triplicate.

2.11. Effect of H_2O_2 in the NO production in midguts

To evaluate the effect of H_2O_2 on *in vitro* NO production, 10 midguts of *A. albimanus* were placed per well and cultured in the presence or absence of 2 mM H_2O_2 and, 0.0, 0.8 and 8.0 U/ml catalase. The concentration of nitrite and nitrate was quantified using the Griess reaction, 24 h after the beginning of the culture. This experiment was carried out in triplicate.

2.12. Statistical analysis

A *t*-test was used to analyze differences between observed mean values of both NO and H_2O_2 production in infected mosquitoes and controls, $p < 0.01$, 99.9% confidence were considered statistically significant. Analysis was made using the statistical program GraphPad Prism. To analyze real-time PCR data, a distribution-free Wilcoxon test was used to compare the mean fold-change relative to the control group.

3. Results

3.1. Generation of free radicals during infection

The mean NO concentration in the haemolymph of *A. albimanus* infected with *P. berghei* ($17 \pm 2.5 \mu\text{M}$) was over threefold higher than in haemolymph of uninfected mosquitoes ($4.5 \pm 1.5 \mu\text{M}$); and L-NAME treatment inhibited the NO generation in infected mosquitoes ($8.6 \pm 3.2 \mu\text{M}$) ($p = 0.0001$, Fig. 1A). The mean levels of H_2O_2 (135 μM) in supernatants of midgut cultures of mosquitoes inoculated with *P. berghei* ookinetes was higher than in the supernatants of those inoculated with RPMI alone (109 μM) and of those non-inoculated controls (19 μM), $p = 0.015$ (Fig. 1B).

3.2. Expression of AMPs mRNA in *A. albimanus* infected with *P. berghei*

All AMPs mRNAs were expressed in midguts at time 0 h (Fig. 2A). Mean attacin mRNA expression reached a peak at 18 h (eight times more in infected mosquitoes than uninfected mosquitoes, $p = 0.002$), but returned to the basal level at 48 h. Cecropin mRNA showed a mean high expression at 6 h (25 times higher than uninfected mosquitoes, $p = 0.001$) but returned to basal level at 48 h. Gambicin mRNA reached the mean maximum expression at

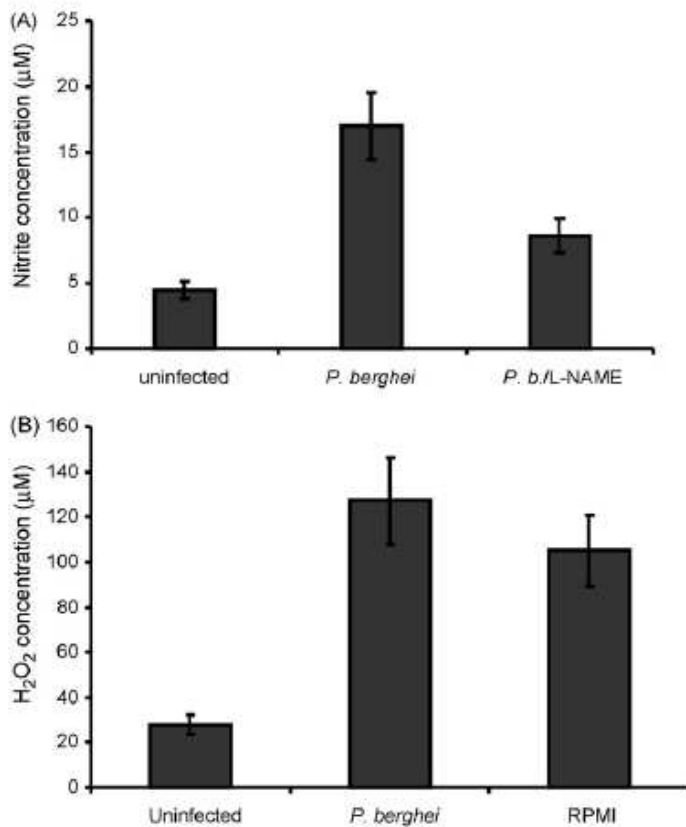


Fig. 1. Production of NO in haemolymph and H₂O₂ in midgut of *A. albimanus* is induced by *P. berghei* infection. (A) Mosquitoes were fed with blood from uninfected or *P. berghei*-infected mice and treated with L-NAME as described in Section 2. At 24 h post-infection, their haemolymph was collected and NO concentration was evaluated. (B) Mosquitoes were inoculated by enema with either *P. berghei* ookinetes in RPMI or RPMI alone; not inoculated mosquitoes were included as a control. The midguts were dissected and placed in culture. Twenty-four hours later, culture supernatants were collected for quantification of H₂O₂.

12 h (23 times higher than uninfected mosquitoes, $p = 0.001$) and remained elevated at 48 h. All AMPs were also expressed at 0 h in the abdominal tissues (Fig. 2B); the peak expression of mRNA gambicin, cecropin and attacin expression occurred at 6, 12 and 18 h, respectively. The expression levels of these genes in infected mosquitoes versus those fed with uninfected blood were 18, 40 and 25 times higher for gambicin, cecropin and attacin, respectively ($p = 0.001$).

3.3. Effect of NO and H₂O₂ on the AMPs mRNA expression in the mosquitoes abdominal tissues and midgut

We tested the hypothesis that increased levels of NO and H₂O₂ induce the expression of AMPs in the abdominal tissues. Abdominal tissues of mosquitoes infected with *P. berghei* expressed attacin and cecropin mRNAs that peaked at 18 h and gambicin RNA at 6 h. The expression of these mRNAs in *P. berghei*-infected mosquitoes treated with L-NAME (a competitive inhibitor of the enzyme NOS) and vitamin C (which removes H₂O₂, Kumar et al., 2003) was lower than those observed in *P. berghei*-infected mosquitoes (Fig. 3). This inhibition was significant between 6 and 18 h after the infected blood meal ($p = 0.001$). Cecropin and gambicin mRNAs levels were lower at all times in L-NAME and vitamin C treated mosquitoes (Fig. 3B and C, respectively), although the inhibition of attacin expression was less pronounced, while gambicin was strongly inhibited by both, L-NAME and vitamin C (Fig. 3). In addition, treatment with L-NAME and vitamin C effectively reduced

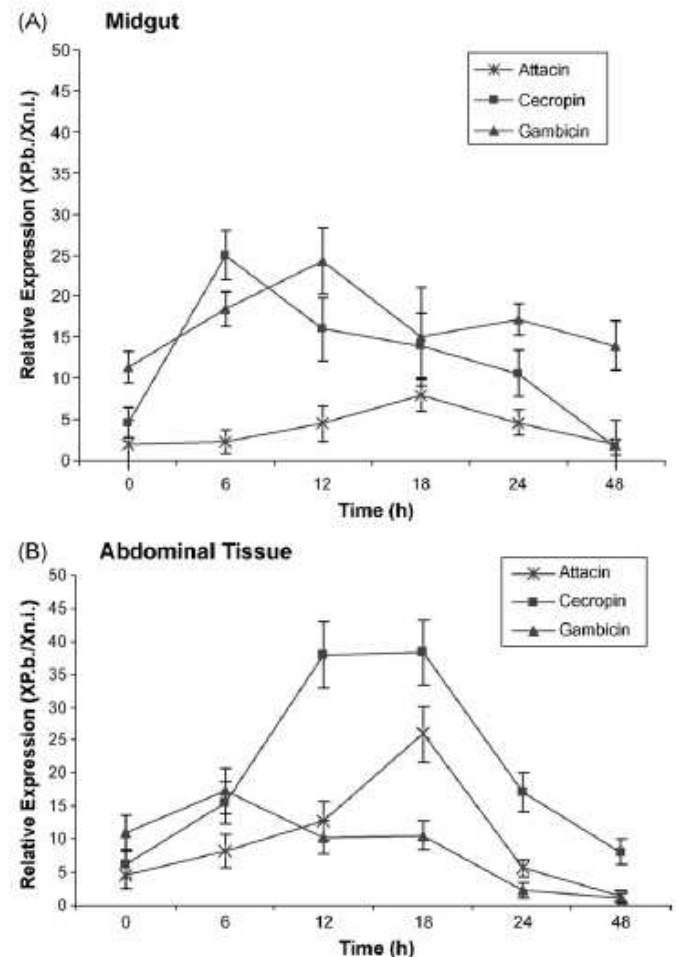


Fig. 2. Expression of mRNA antimicrobial peptides (AMPs) in midgut and abdominal tissues of *A. albimanus* is induced by *P. berghei* infection. Mosquitoes were fed with *P. berghei*-infected mouse blood. (A) Midguts and (B) abdominal tissues were dissected and RNA extracted (as described in Section 2) at different times of post-feeding. AMP's expression was measured by real-time PCR. The figure depicts the relative AMP's expression of organs from infected mosquitoes in relation to that of not-infected ones.

the NO generation and the presence of H₂O₂ (data not shown), suggesting that these molecules may regulate the AMP's expression.

3.4. Effect of exogenous H₂O₂ and NO on AMPs mRNA expression in mosquito abdominal tissues in vitro

In abdominal tissues cultured *in vitro* in the presence of H₂O₂, the mean expression of AMPs mRNA was 4.5 times higher than in the not-treated control group ($p = 0.001$), whereas the addition of catalase (which converts H₂O₂ to H₂O) inhibited the effect of H₂O₂ (Fig. 4A). The expression of AMPs mRNA also was induced by SNP, a NO donor, in a dose-dependent manner (Fig. 4B), notably, gambicin was induced up to 35 times with the highest SNP concentration (20 µM).

3.5. Effect of exogenous H₂O₂ on production of NO in mosquito midgut in vitro

Mosquito midguts cultured in the presence of 1 µM of H₂O₂ for 24 h produced more NO than untreated midguts (20 (M, $p = 0.001$); and this effect was reversed when catalase was added to the cultures (6.2 µM, $p = 0.001$) (Fig. 5).

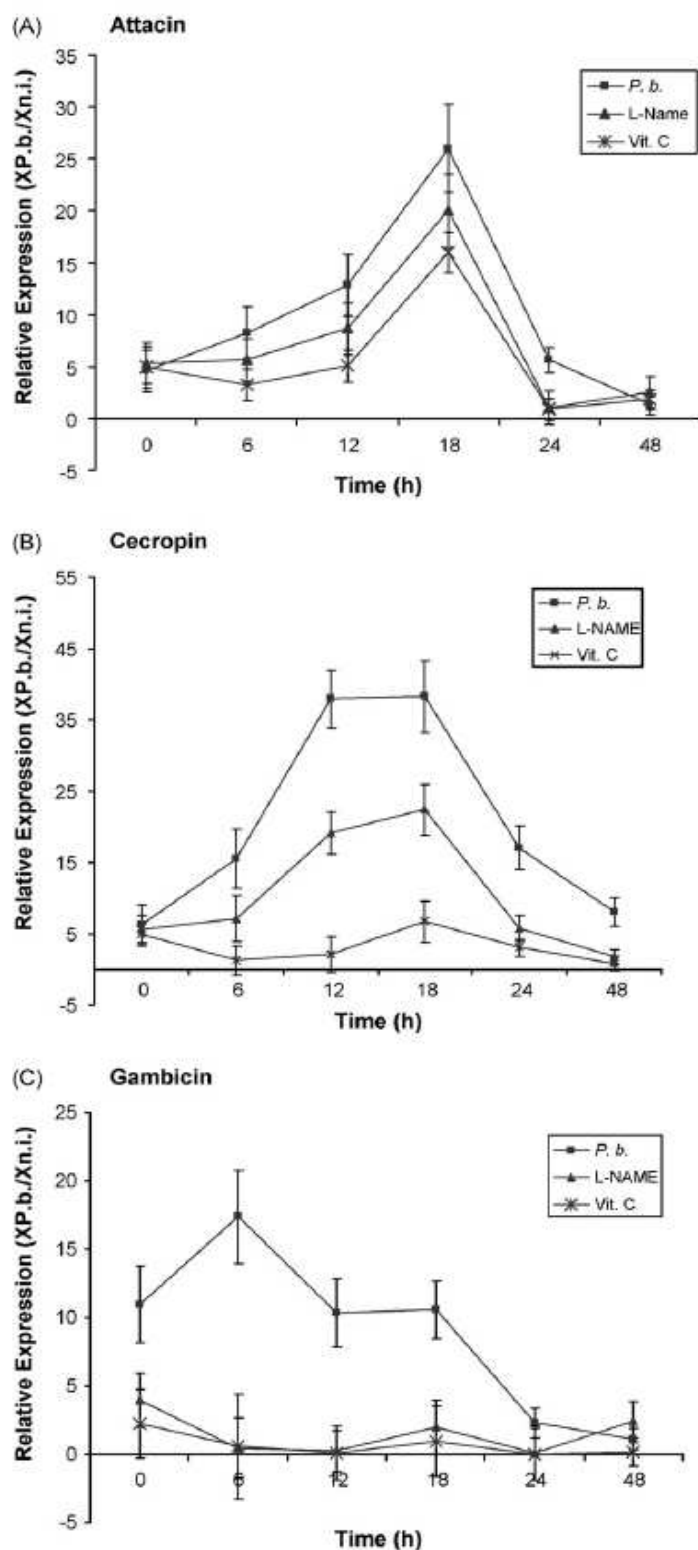


Fig. 3. The expression of mRNA antimicrobial peptides induced in abdominal tissues by *P. berghei* infection is reduced by treatment with NO synthase inhibitor and a H_2O_2 scavenger. Mosquitoes were fed with L-NAME (1 mg/ml) and vitamin C (25 mg/ml) during two days before to the end of the experiment. Mosquitoes were infected with *P. berghei* by the same procedure used in Fig. 2; and AMP's mRNA expression was measured by real-time PCR. The figure depicts the relative AMP's expression of organs from infected mosquitoes in relation to that of not-infected ones.

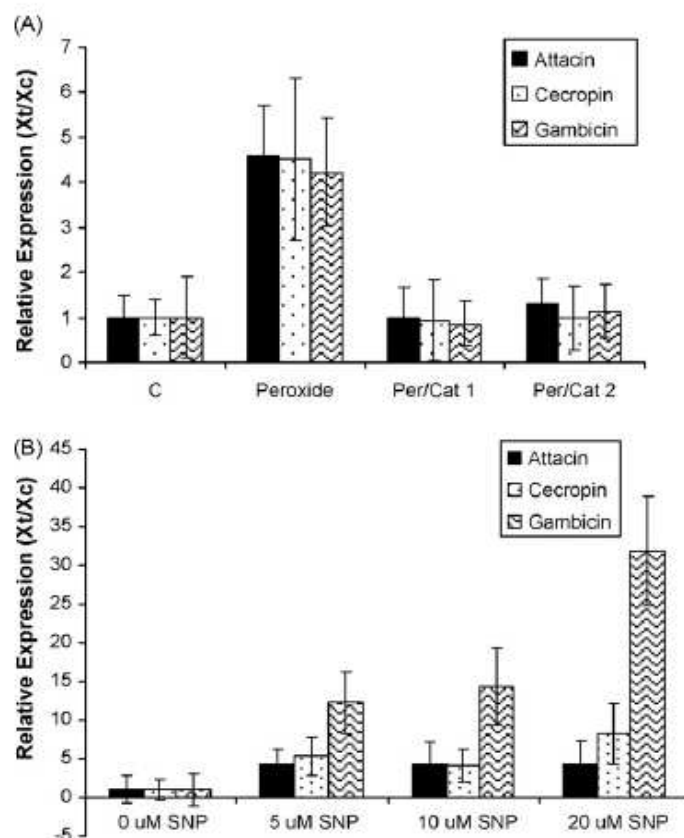


Fig. 4. Exogenous H_2O_2 and NO induce the expression of antimicrobial peptides mRNA in mosquito abdominal tissues *in vitro*. (A) Mosquito abdomens were cultured in the presence or absence of $2 \mu M H_2O_2$ during 24 h. The total RNA was obtained for AMP's expression analysis by real-time PCR. As a control catalase was added to two different concentrations (Per/Cat 1; 0.8 U/ml and Per/Cat 2; 8.0 U/ml, respectively). (B) Abdomen cultures were added with SNP (5, 10 and 20 μM) and 24 h later, the total RNA was obtained for the analysis of AMP's expression by real-time PCR. The figure depicts the relative AMP's expression of treated organs in relation to that of not-treated ones.

4. Discussion

We documented that the infection of the mosquito *A. albimanus* with *P. berghei* resulted in a robust induction of RNAs encoding antimicrobial peptides (attacin, cecropin and gambicin) in the midgut and abdominal tissues. A marked systemic immune response was observed in the mosquito carcass (containing the fat body, one of the main immune organs of mosquitoes) when the parasite was still confined to the midgut compartment. It was also observed that NO and H_2O_2 activated the expression of these three immune response markers analyzed in the absence of *P. berghei*. These peptides have been described for other insects, including *A. gambiae* (Vizioli et al., 2001a,b; Fallon and Sun, 2001; Luna et al., 2006). The *P. berghei* induced expression of AMPs in *A. albimanus* carcasses is in accordance to the expression of several immune genes in *A. gambiae* infected with the same parasites (Dimopoulos et al., 1999).

The expression of the AMPs in *A. albimanus* is of particular interest because there is evidence of their toxic activity against *Plasmodium* (Boman et al., 1989; Kokoza et al., 2010). Gambicin is a peptide specific to mosquitoes, and has antimicrobial as well as anti-*Plasmodium* properties (Dimopoulos et al., 2000; Vizioli et al., 2001a,b; Christophides et al., 2002). Also the presence of cecropin in the haemolymph of infected mosquitoes has been observed (Lanz-Mendoza et al., unpublished data), indicating their likely participation in the response against the parasite.

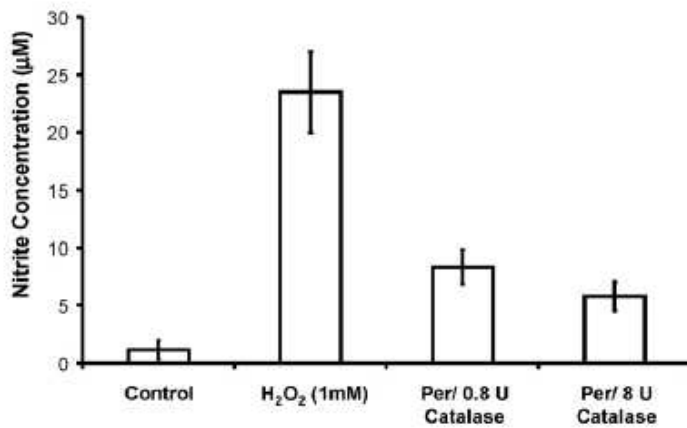


Fig. 5. Exogenous H₂O₂ induces the generation of NO in the midgut of *A. albimanus*. Mosquito midguts were cultured in the presence of 2 µM H₂O₂. Midguts without treatment were cultured as control. In order to verify specific effects, midguts were cultured in the presence of 0.8 and 8 U/ml catalase. The concentration of nitrite and nitrate (NO₂⁻/NO₃⁻) was quantified using the Griess reaction, 24 h after beginning the culture.

Our results suggest that NO and H₂O₂ are important molecules participating in the induction of the mosquito systemic immune response during the infection with malaria parasites. H₂O₂ and NO are small molecules highly soluble in lipid membranes that can rapidly diffuse up to 10 (m, the distance between the midgut and the body fat (Hernández-Martínez, personal communication). They are produced by the mosquito midgut during parasite invasion; at a time when distant tissues that produce AMPs have no direct contact with the parasites or their products. Other pieces of evidence support this theory: (1) exogenous H₂O₂ or NO added to abdominal tissue cultures *in vitro* induced the expression of AMPs, (2) the reduction of H₂O₂ and NO with vitamin C and L-NAME reduced the over-expression of infection-induced immune genes, and (3) the expression of AMPs was reduced in mosquitoes fed with NO inhibitor (L-NAME) and H₂O₂ scavenger (vitamin C). However, an incomplete blockage in the over-expression of attacin and cecropin *in vivo* indicates that other factors may be involved in the regulation of these AMPs' expressions (García Gil de Muñoz et al., 2008).

In *Drosophila* the AMPs expression is regulated by two major signaling pathways: the Toll pathway, which leads to the expression of the peptide drosocin, important for defense against fungi and Gram-positive bacteria, and the IMD pathway, which regulates the expression of defensins, cecropin and attacin and is important in controlling Gram-negative bacteria infections (Naitza and Ligoxygakis, 2004). Both pathways have two major transcription factors, Dorsal and Rel, respectively, members of Rel/NFκB family, which can be regulated by H₂O₂ and reactive oxygen species (ROS) (Gloire et al., 2006).

Previous experiments have documented the induction of the NOS gene expression by malaria parasites in *A. pseudopunctipennis* (Herrera-Ortiz et al., 2004), *A. gambiae* and *A. stephensi* (Luckhart et al., 1998; Dimopoulos et al., 1998). The production of H₂O₂ is more likely responsible of this induction. In our experiments, the addition of H₂O₂ to *A. albimanus* midguts cultivated *in vitro* induced the generation of NO; a induction of up to fivefold NOS mRNA expression by H₂O₂ released during the oxidation of L-DOPA has been documented in *A. pseudopunctipennis* (Herrera-Ortiz et al., 2004), and a dose-dependent induction of up to fivefold NOS mRNA expression by H₂O₂ in vertebrate endothelial cells has been documented (Drummond et al., 2000).

The regulation of NOS activity is probably via NF-κB, since the mosquito NOS gene has several NF-κB sites in its promoter (Luckhart and Rosenberg, 1999). In *Hyalophora cecropia*, the

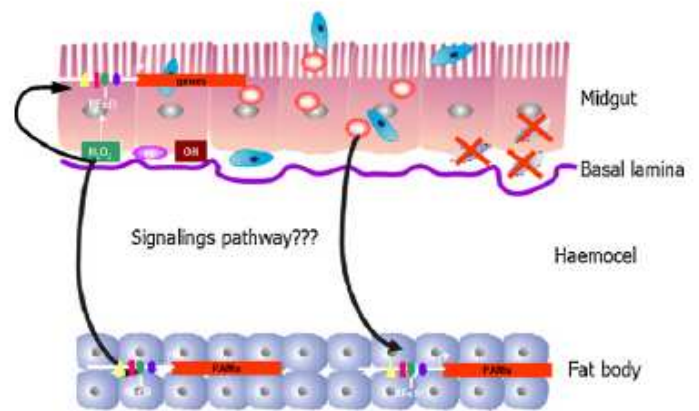


Fig. 6. Proposed role of H₂O₂ and NO in the immune response of *A. albimanus* to *P. berghei*. The mosquito infection induces the generation of H₂O₂ in the first hours post-blood feeding. The H₂O₂ can have two effects: (1) it can act locally in the midgut and directly activate the expression of AMPs and the enzyme nitric oxide synthase, which produces NO; (2) the H₂O₂ can diffuse into the haemolymph and reach the fat body, and activate one or more signaling pathways, thus activating the immune system of the mosquito.

immunoresponse factor (CIF) which joins to "κ B-like" sequences is activated by the H₂O₂, in a way similar to that in mammals (Sun and Faye, 1995). However, the activation mechanisms have not been identified. H₂O₂ has capacity to reduce tyrosine phosphatases via the oxidation of cysteine residues in their catalytic domain, which consecutively activates tyrosine kinases and downstream signaling. Depending on the ROS concentration, different redox-sensitive transcription factors are activated. NF-κB was the first transcription factor shown to be redox-regulated. The classical NF-κB-activating pathway is induced by a diversity of immunity mediators. They all converge to the activation of the IκB-kinase (IKK) complex. Once activated by phosphorylation, the IKK-complex phosphorylates IκBa, releasing NF-κB. This factor is translocated into the nucleus where it activates the transcription of target genes. These observations suggest that NF-κB activation by H₂O₂ is highly cell-type specific and involves quite different mechanisms (review in Gloire et al., 2006). However, the inhibition of attacin, cecropin and gambicin mRNAs expression with L-NAME and vitamin C was different for each gene (Fig. 3), suggests that the induction of these AMPs by oxygen free radical is not regulated in the same pathway, and the mechanisms involved in their transcriptional regulation await clarification.

This dual system, involving ROS/antimicrobial peptide, is essential to the *Drosophila* immune response (Ryu et al., 2006). Different reports of ROS in mosquitoes (Luckhart et al., 1998; Herrera-Ortiz et al., 2004; Lanz-Mendoza et al., 2002; Kumar et al., 2003; Molina-Cruz et al., 2008) and *Drosophila* (Nappi et al., 2000; Davies and Dow, 2009) in addition to the results presented here, are indicative that NO and H₂O₂ participate in the immune response modulation in insects. H₂O₂ could participate at two sites of the mosquito response to infection: (1) it can act locally in the midgut and directly activate the expression of AMPs and NOS through NF-κB sites in their genes, thus activating a local immune response with the generation of NO with a toxic effect on parasites within midgut epithelial cells; and (2) H₂O₂ can diffuse into the haemolymph and reach the fat body, where it could activate one or more signaling pathways of the systemic immune system (Fig. 6).

Understanding the biological activity of NO and H₂O₂ and their role in immune regulation of disease-transmitting mosquitoes will help to generate new strategies for controlling disease transmission. The molecular mechanisms that induce the activation of AMPs through NO and H₂O₂ require further investigation.

Acknowledgements

We thank M.C. Rodríguez and M.T. Ovilla-Muñoz for their assistance in the mice infection with *P. berghei*. We thank K. Van Ryzin for reviewing the manuscript. Finally we thank M.A. Sánchez-Alemán for helping in the statistical analysis.

References

- Beier, J.C., 1998. Malaria parasite development in mosquitoes. *Annu. Rev. Entomol.* 43, 519–543.
- Boman, H.G., Wade, D., Boman, I.A., Wahlin, B., Merrifield, R.B., 1989. Antibacterial and antimalarial properties of peptides that are cecropin-melittin hybrids. *FEBS Lett.* 259 (1), 103–106.
- Christophides, G.K., Zdobnov, E., Barillas-Mury, C., Birney, E., Blandin, S., Blass, C., Brey, P.T., Collins, F.H., Danielli, A., Dimopoulos, G., Hetru, C., Hoa, N.T., Hoffmann, J.A., Kanzok, S.M., Letunic, I., Levashina, E.A., Loukeris, T.G., Lycett, G., Meister, S., Michel, K., Moita, L.F., Müller, H.M., Osta, M.A., Paskewitz, S.M., Reichhart, J.M., Rzhetsky, A., Troxler, L., Vernick, K.D., Vlachou, D., Volz, J., von Mering, C., Xu, J., Zheng, L., Bork, P., Kafatos, F.C., 2002. Immunity-related genes and gene families in *Anopheles gambiae*. *Science* 298 (5591), 159–165.
- Davies, S.A., Dow, J.A.T., 2009. Modulation of epithelial innate immunity by autocrine production of nitric oxide. *Gen. Comp. Endocrinol.* 162, 113–121.
- DeJong, R.J., Miller, L.M., Molina-Cruz, A., Gupta, L., Kumar, S., Barillas-Mury, C., 2007. Reactive oxygen species detoxification by catalase is a major determinant of fecundity in the mosquito *Anopheles gambiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104 (7), 2121–2126.
- Dimopoulos, G., Seeley, D., Wolf, A., Kafatos, F.C., 1998. Malaria infection of the mosquito *Anopheles gambiae* activates immune-responsive genes during critical transition stages of the parasite life cycle. *EMBO J.* 17 (21), 6115–6123.
- Dimopoulos, G., Müller, H.M., Kafatos, F.C., 1999. How does *Anopheles gambiae* kill malaria parasites? *Parassitologia* 41, 169–175.
- Dimopoulos, G., Casavant, T.L., Chang, S., Scheetz, T., Roberts, C., Donohue, M., Schultz, J., Benes, V., Bork, P., Ansorge, W., Soares, M.B., Kafatos, F.C., 2000. *Anopheles gambiae* pilot gene discovery project: identification of mosquito innate immunity genes from expressed sequence tags generated from immune-competent cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97 (12), 6619–6624.
- Dimopoulos, G., 2003. Insect immunity and its implication in mosquito-malaria interactions. *Cell Microbiol.* 5 (1), 3–14.
- Drummond, G.R., Cai, H., Davis, M.E., Ramasamy, S., Harrison, D.G., 2000. Transcriptional and posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase expression by hydrogen peroxide. *Circ. Res.* 86, 347–354.
- Eckmann, L., Laurent, F., Langford, T.D., Hetsko, M.L., Smith, J.R., Kagnoff, M.F., Gillin, F.D., 2000. Nitric oxide production by human intestinal epithelial cells and competition for arginine as potential determinants of host defense against the lumen-dwelling pathogen *Giardia lamblia*. *J. Immunol.* 164 (3), 1478–1487.
- Fallon, A.M., Sun, D., 2001. Exploration of mosquito immunity using cells in culture. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31 (3), 263–278.
- Foley, E., O'Farrell, P.H., 2003. Nitric oxide contributes to induction of innate immune responses to gram-negative bacteria in *Drosophila*. *Genes Dev.* 17, 115–125.
- Franke-Fayard, B., Trueman, H., Ramesar, J., Mendoza, J., van der Keur, M., van der Linden, R., Sinden, R., Waters, A.P., Janse, C.J., 2004. A *Plasmodium berghei* reference line that constitutively expresses GFP at a high level throughout the complete life cycle. *Mol. Biochem. Parasitol.* 137 (1), 23–33.
- García Gil de Muñoz, F.L., Martínez-Barnette, J., Lanz-Mendoza, H., Rodríguez, M.H., Hernández-Hernández, F.C., 2008. Prostaglandin E2 modulates the expression of antimicrobial peptides in the fat body and midgut of *Anopheles albimanus*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 68 (1), 14–25.
- Gloire, G., Legrand-Poels, S., Piette, J., 2006. NF- κ B activation by reactive oxygen species: fifteen years later. *Biochem. Pharmacol.* 72, 1493–1505.
- Herrera-Ortiz, A., Lanz-Mendoza, H., Martínez-Barnette, J., Hernández-Martínez, S., Villarreal-Treviño, C., Aguilar-Marcelino, L., Rodríguez, M.H., 2004. *Plasmodium berghei* ookinetes induce nitric oxide production in *Anopheles pseudopunctipennis* midguts cultured in vitro. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34 (9), 893–901.
- Imamura, M., Yang, J., Yamakawa, M., 2002. cDNA cloning, characterization and gene expression of nitric oxide synthase from the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Mol. Biol.* 11 (3), 257–265.
- Kokoza, V., Ahmed, A., Woon Shin, S., Okafor, N., Zou, Z., Raikhel, A.S., 2010. Blocking of *Plasmodium* transmission by cooperative action of Cecropin A and Defensin A in transgenic *Aedes aegypti* mosquitoes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*
- Kumar, S., Christophides, G.K., Cantera, R., Charles, B., Han, Y.S., Meister, S., Dimopoulos, G., Kafatos, F.C., Barillas-Mury, C., 2003. The role of reactive oxygen species on *Plasmodium melanotic* encapsulation in *Anopheles gambiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 14139–14144.
- Kumar, S., Barillas-Mury, C., 2005. Ookinete-induced midgut peroxidases detonate the time bomb in anopheline mosquitoes. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35 (7), 721–727.
- Lanz-Mendoza, H., Hernández-Martínez, S., Ku-López, M., Rodríguez, M.D.C., Herrera-Ortiz, A., Rodríguez, M.H., 2002. Superoxide anion in *Anopheles albimanus* haemolymph and midgut is toxic to *Plasmodium berghei* ookinetes. *J. Parasitol.* 8 (4), 702–706.
- Luckhart, S., Vodovotz, Y., Cui, L., Rosenberg, R., 1998. The mosquito *Anopheles stephensi* limits malaria parasite development with inducible synthesis of nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 5700–5705.
- Luckhart, S., Rosenberg, R., 1999. Gene structure and polymorphism of an invertebrate nitric oxide synthase gene. *Gene* 232, 25–34.
- Luna, C., Hoa, N.T., Lin, H., Zhang, L., Nguyen, H.L.A., Kanzok, S.M., Zheng, L., 2006. Expression of immune responsive genes in cell lines from two different *Anopheles* species. *Insect Mol. Biol.* 15 (6), 721–729.
- Molina-Cruz, A., DeJong, R.J., Charles, B., Gupta, L., Kumar, S., Jaramillo-Gutierrez, G., Barillas-Mury, C., 2008. Reactive oxygen species modulate *Anopheles gambiae* immunity against bacteria and *Plasmodium*. *J. Biol. Chem.* 283 (6), 3217–3223.
- Naitza, S., Ligoxygakis, P., 2004. Antimicrobial defenses in *Drosophila*: the story so far. *Mol. Immunol.* 40, 887–896.
- Nappi, A.J., Vass, E., Frey, F., Carton, Y., 2000. Nitric oxide involvement in *Drosophila* immunity. *Nitric Oxide* 4, 423–430.
- Peterson, T.M.L., Grow, A.J., Luckhart, S., 2007. Nitric oxide metabolites induced in *Anopheles stephensi* control malaria parasite infection. *Free Radic. Biol. Med.* 42, 132–142.
- Pfaffl, M.W., 2006. Relative quantification in: real-time PCR. In: Dorak, T. (Ed.), *International University Line*, pp. 63–82.
- Rodríguez, M.C., Margos, G., Compton, H., Ku, M., Lanz, H., Rodríguez, M.H., et al., 2002. *Plasmodium berghei*: routine production of pure gametocytes, extracellular gametes, zygotes, and ookinetes. *Exp. Parasitol.* 101 (1), 73–76.
- Ryu, J.H., Ha, E.M., Oh, C.T., Seol, J.H., Brey, P.T., Jin, I., Lee, D.G., Kim, J., Lee, D., Lee, W.J., 2006. An essential complementary role of NF- κ B pathway to microbicidal oxidants in *Drosophila* gut immunity. *EMBO J.* 25 (15), 3693–3701.
- Shahabuddin, M., Kaslow, D.C., 1994. Biology of the development of *Plasmodium* in mosquito midgut: a molecular and cellular view. *Bull. Inst. Pasteur* 92, 119.
- Sinden, R.E., Billingsley, P.F., 2001. *Plasmodium* invasion of mosquito cells: hawk or dove? *Trends Parasitol.* 17 (5), 209–212.
- Sun, S.C., Faye, I., 1995. Transcription of immune genes in the giant silkworm, *Hyalophora cecropia*, is augmented by H₂O₂ and diminished by thiol reagents. *Eur. J. Biochem.* 231 (1), 93–98.
- Vizioli, J., Bulet, P., Charlet, M., Lowenberger, C., Blass, C., Müller, H.M., Dimopoulos, G., Hoffmann, J., Kafatos, F.C., Richman, A., 2001a. Cloning and analysis of a cecropin gene from the malaria vector mosquito *Anopheles gambiae*. *Insect. Mol. Biol.* 9 (1), 75–84.
- Vizioli, J., Bulet, P., Hoffmann, J.A., Kafatos, F.C., Müller, H.M., Dimopoulos, G., 2001b. Gambicin: a novel immune responsive antimicrobial peptide from the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98 (22), 12630–12635.
- Yassine, H., Osta, M.A., 2010. *Anopheles gambiae* innate immunity. *Cell. Microbiol.* 12 (1), 1–9.

*...buscaba una respuesta,
ahora tengo muchas
preguntas...*