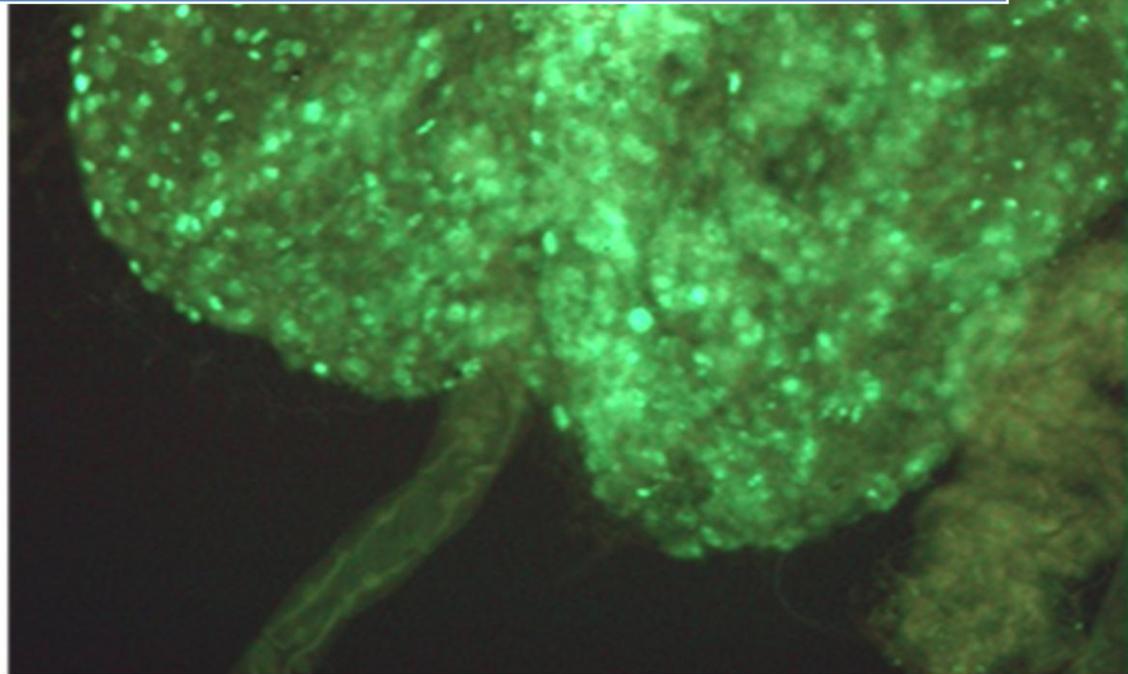


Síntesis de DNA en mosquitos *Anopheles albimanus* infectados con *Plasmodium berghei*



María Isabel Martínez Villa

Director: Humberto Lanz Mendoza

Asesores: Dr. Salvador Martínez Hernández

Dra. María del Carmen Rodríguez G.

9 de Diciembre del 2011

Síntesis de DNA en mosquitos
Anopheles albimanus infectados
con Plasmodium berghei

María Isabel Martínez Villa

Director: Dr. Humberto Lanz Mendoza

Asesores: Dr. Salvador Hernández Martínez

Dra. María del Carmen Rodríguez G.

DICIEMBRE-2011.

CISEI/INSP

**Síntesis de DNA en mosquitos *Anopheles albimanus*
infectados con *Plasmodium berghei***

Índice

	PAGINA
INTRODUCCION	1
Malaria	1
Epidemiología	2
Agente etiológico	5
<i>Ciclo biológico del parásito</i>	5
Vector	10
Cuadro clínico	11
Diagnóstico	12
Tratamiento y control	12
Respuesta inmune en mosquitos	14
<i>Barreras físico-químicas</i>	15
<i>Sistema inmune</i>	16
ANTECEDENTES	21
JUSTIFICACIÓN	26
OBJETIVOS	27
MATERIAL Y METODOS	28
Mosquitos	28
Obtención de cultivos de oocinetos de <i>Plasmodium berghei</i> (cepa ANKA 2.34)	28

Obtención de cultivos de oocinetos de <i>P. berghei</i> recombinantes que expresan constitutivamente la proteína verde fluorescente (GFP)	29
Alimentación de mosquitos con oocinetos e incorporación de BrdU	30
Disección de mosquitos.	31
Inmunodetección de la incorporación de BrdU.	32
Extracción fenólica de DNA.	33
Cuantificación relativa de la incorporación de BrdU por ELISA.	34
RESULTADOS	35
DISCUSIÓN	57
CONCLUSIONES	65
PERSPECTIVAS	67
REFERENCIAS	69
APENDICES	76

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por bendecirme a cada momento y en cada instante de mi vida; por permitirme concluir con este proyecto, llena de satisfacciones personales y profesionales.

A mi esposo, Angel Ramírez Castellanos, por estar junto a mí en cada momento, por su apoyo incondicional y por ser el elemento más importante en mi vida.

A mis padres, Amelia Villa y Enrique Martínez; y hermanos, Oscar y Omar Martínez, por su apoyo y motivación constante por ser la base de mi esencia y el pilar que me sostiene en cada paso de mi vida. A Natalia Martínez y Lido Najera, por su entusiasmo y apoyo incondicional.

A mis amigos y compañeros, Minerva Zavaleta, Martha Cruz, Edgar Vergara, Juan Carlos Catalan, por permitirme compartir momentos personales y profesionales durante este curso, por su amistad, gracias!

A los Doctores Salvador Martínez, Humberto Lanz y María del Carmen Rodríguez, por permitirme formar parte de este proyecto y sobre todo por su asesoría, enseñanza y apoyo.

INTRODUCCION

Las enfermedades infecciosas transmitidas por vectores artrópodos se desarrollan cuando se presenta una interacción, de manera exitosa y bajo condiciones ambientales favorables, entre el agente etiológico, el vector y el humano.

Entre las principales enfermedades transmitidas por vectores, consideradas como problema de salud pública en México, se encuentran la malaria, ocasionada por protozooario *Plasmodium vivax*, el cual es transmitido por el mosquito *Anopheles albimanus* y *An. pseudopunctipennis* principalmente; enfermedad de chagas, causada por *Trypanosoma cruzi* y transmitida en México por insectos del género *Triatoma*; fiebre por virus dengue, transmitido por el mosquito *Aedes aegypti*, entre otras. (Ramos-Garcia, 2007; Rodriguez-Gutierrez MC, 2007).

Malaria

La malaria o paludismo es una enfermedad parasitaria que ha afectado a los humanos desde tiempos remotos, ya que se han encontrado registros de casos de malaria en las escrituras chinas y los papiros egipcios (Joy *et al*, 2003). Sin embargo, fue hasta 1847, cuando en Italia, Torti asignó el nombre de Malaria a esta enfermedad, pues se creía que era causada por el “aire malo” (en italiano, *mal aria*) o “miasmas” que se desprendían de las aguas estancadas y terrenos pantanosos. Así mismo, el nombre de Paludismo o fiebres palúdicas, fue dado debido a que las fiebres predominaban entre los pobladores de las zonas cercanas a pantanos, cuyo nombre en italiano es “palude” y en latín “palus” (Roncalli, 2001).

En 1880, Alphonse Laveran descubrió que el agente etiológico del paludismo es el protozoo *Plasmodium*, tal descubrimiento lo hizo acreedor al premio Nobel en 1907 ([En línea]: <http://www.cdc.gov/malaria/about/history/laveran.html>). De igual manera Ronald Ross, descubridor del transmisor del paludismo en 1897, recibió el premio Nobel en 1902 ([En línea: <http://www.cdc.gov/malaria/about/history/ross.html>]).

Epidemiología

Los registros que se han realizado sobre los casos de malaria indican una afección global entre el 40 y 55% de la población mundial afectando al menos a 90 países. Cada año más de 300 millones de personas se ven afectadas por casos agudos, 500 millones de personas presentan la enfermedad de malaria severa en todo el mundo y al menos un millón de muertes son atribuidas a esta enfermedad (Breman, 2001). En el reporte realizado por la Organización Mundial de la Salud (OMS), se estimaron 225 millones de casos y 781,000 muertes por malaria en el 2009 (World Malaria Report 2010)

A pesar de que esta enfermedad puede ser transmitida a personas de cualquier edad, la población infantil es la más afectada, junto con las mujeres embarazadas; lo que coloca a la malaria como primer causa de muerte en niños menores de 5 años en África (Greenwood *et al*, 2005; Rodríguez-Morales *et al*, 2006; Hay *et al*, 2004). A su vez, la malaria causa una pérdida de 1.3% de la economía anual en países en desarrollo con transmisión intensa, no solo como causa de los costos del tratamiento, prevención y control, si no por los

gastos secundarios que se presentan cuando la población productiva económicamente se ve afectada.

Más del 80% de los casos y muertes de malaria se registran en áreas estables y de intensa transmisión, tal es el caso de África. Sin embargo en Asia, parte de Europa y América también resultan afectados.

En América, la transmisión de malaria es inestable. Ésta se caracteriza porque en las áreas endémicas existen cambios moderados de temperatura, humedad relativa y densidad vectorial, trayendo como consecuencia endemidad a diferentes grados; la incidencia de malaria presenta variaciones marcadas de un lugar a otro y de un año a otro. De los 35 países miembros de la organización Panamericana de la salud, 21 reporta áreas con transmisión activa de malaria. En América Latina se reportaron 560, 298 casos de malaria en el 2008 (Report on the situation of Malaria in the Americas, 2008).

En 1957, en México se logró una notable disminución de casos de malaria tras la implementación del programa de erradicación establecido por la comisión nacional de erradicación del paludismo. Durante esta campaña se iniciaron operaciones de rociado con dicloro difenil tricloroetano (DDT) en cobertura nacional, observándose una notable reducción de la tasa general de mortalidad (del 65% de 1960 a 1961) (Conly 1964). Sin embargo, en 1985 se presentó un pico endémico que encendió los focos rojos con 140,000 casos. Tras el huracán Paulina (1998), nuevamente se presentaron 14,000 casos en el país, la mayoría de ellos concentrados en menos del 5% de la población de Oaxaca y un número importante de casos fueron repetidores (recaídas y reinfecciones (Programa de acción: enfermedades transmitidas por vector, 2001). Actualmente, los informes del sistema nacional de vigilancia epidemiológica reportan 1193 casos hasta la semana 52 del 2010 (Sistema

Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica. 2010); respecto al 2011 se llevan reportados 552 casos de paludismo hasta la semana epidemiológica 33. (SINAVE/DGE/SALUD 2011), los cuales se encuentran distribuidos en Chiapas, Chihuahua, Durango, Jalisco, Nayarit, Oaxaca, Quintana Roo, Sinaloa, Tabasco y Tamaulipas; siendo Oaxaca el estado que ha aportado el mayor número de casos de la enfermedad.

Agente etiológico

Actualmente se conocen más de 175 especies de *Plasmodium* (Chavatte *et al* 2007), siendo solamente cuatro especies las que tienen la capacidad de infectar al humano y provocar la malaria (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* y *P. ovale*). *Plasmodium vivax* es el principal responsable de los casos de malaria en México, aunque, en años anteriores, se han reportado algunos casos producidos por *P. falciparum*.

Ciclo biológico del parásito

El parásito tiene dos huéspedes en su ciclo de vida: el huésped vertebrado, donde se lleva a cabo el ciclo asexual del parásito; y el mosquito o huésped definitivo, en el que *Plasmodium* desarrolla su ciclo sexual. Es un ciclo complicado en el que los huéspedes pueden limitar la infección en las diferentes fases de desarrollo del parásito ([En línea]: <http://www.dpd.cdc.gov/DPDx/html/Malaria.htm>).

Cuando la hembra de *Anopheles* infectada y portadora de esporozoitos de *Plasmodium* en sus glándulas salivares se alimenta de un sujeto susceptible, los esporozoitos entran en la persona a través de la saliva del

mosquito. Dichos esporozoítos pueden entrar directamente a vasos sanguíneos y migrar al hígado e infectar células hepáticas. En estas desarrollan una vacuola que los protege en el citoplasma de los hepatocitos, se multiplican rápidamente por medio de una división asexual múltiple o esquizogonia, transformándose en merozoítos. Éstos son liberados de las células infectadas lisadas, lo que permite que los merozoítos entren en el torrente sanguíneo infectando a los eritrocitos. En estas células, seguirá llevándose a cabo la multiplicación; inicialmente las células eritrocíticas infectadas tendrán formas típicamente anulares (trofozoitos). Tras una división asexual múltiple se producirá un número variable de merozoitos según la especie de *Plasmodium*, que provoca la ruptura del eritrocito. Algunos merozoítos se transforman en unas células circulares relativamente grandes en comparación con los merozoítos, los cuales son llamados gametocitos femeninos (macrogametocitos) y masculinos (microgametocitos), llegando a esta etapa, los parásitos dejan de multiplicarse (Koneman *et al*, 2001; Tay *et al*, 2002).

El resto del ciclo biológico, la fase sexual (figura 1), inicia cuando una hembra del mosquito *Anopheles* se alimenta de un vertebrado infectado, el cual contiene fases sexuales diferenciadas del parásito (gametocitos). La transformación de gametocitos a gametos maduros y funcionales se produce en la porción media del intestino de mosquito, 10 minutos después de la ingesta de sangre. La microgametogénesis (maduración de gametos masculinos) es desencadenada por la disminución de temperatura y el aumento en el pH; además se presenta la exflagelación (Carter *et al*, 1977). La macrogametogénesis (maduración de gametos femeninos) implica la salida de gametos procedentes de los eritrocitos infectados (Sinden, 1983). Figura 1, A.

La fertilización y producción del cigoto ocurre rápidamente, en la 1 h posterior a la ingesta de sangre (Canning *et al*, 1973; Koneman *et al*, 2001). El desarrollo de oocinetos inmaduros a oocinetos maduros (fase móvil del protozoo) se da en el transcurso de hasta 30 h (Vaughan *et al*, 1994); en este momento, el oocineto tiene la capacidad de atravesar el epitelio intestinal esto antes de la formación de la membrana peritrófica; dicha membrana se forma al momento de la ingestión de la sangre y se presenta como barrera física, impidiendo el daño celular por parásitos y por los procesos bioquímicos durante la digestión de la sangre. Shahabuddin y colaboradores (1993), han descrito que la interacción de la quitinasa y la tripsina proteasa permiten al oocineto atravesar la membrana peritrófica y hacer contacto con las células epiteliales del intestino.

El parásito se establece en el espacio que existe entre la célula del epitelio intestinal y la lámina basal, sitio donde madura a un ooquiste. Una vez maduro, el ooquiste volverá a dividirse por medio de una esporogonia (reproducción asexual múltiple) generando esporozoítos que al madurar dentro del ooquiste, y alrededor de los 15 días posteriores a la infección, los esporozoítos se liberan, y salen a la hemocele dirigiéndose a las glándulas salivales del mosquito (Conly, 1964).

Los esporozoítos liberados en la hemocele alcanzan las glándulas salivales aprovechando la circulación de la hemolinfa. Esto se logra una vez que el parásito entra al vaso dorsal, el cual lo bombea junto con la hemolinfa hacia la parte frontal, acercando los esporozoítos a las glándulas salivales (Hernández-Martínez *et al.*, dato no publicado). Una vez que el parásito ha invadido las glándulas salivares, el ciclo biológico del parásito se puede repetir

en el momento en el que el mosquito infectado se alimenta de un nuevo hospedero vertebrado.

En cualquier sistema vectorial, el parasito de malaria se desarrolla en tres etapas: de gametocito a oocineto, de oocineto a ooquiste y de ooquiste a esporozoíto, el cual migrará a glándulas salivales. El parásito debe madurar en cada fase, de manera exitosa para alcanzar la fase de esporozoíto (forma infectante); sin embargo, esto puede verse fallido debido a diferentes mecanismos de resistencia del mosquito (Beire, 1998).

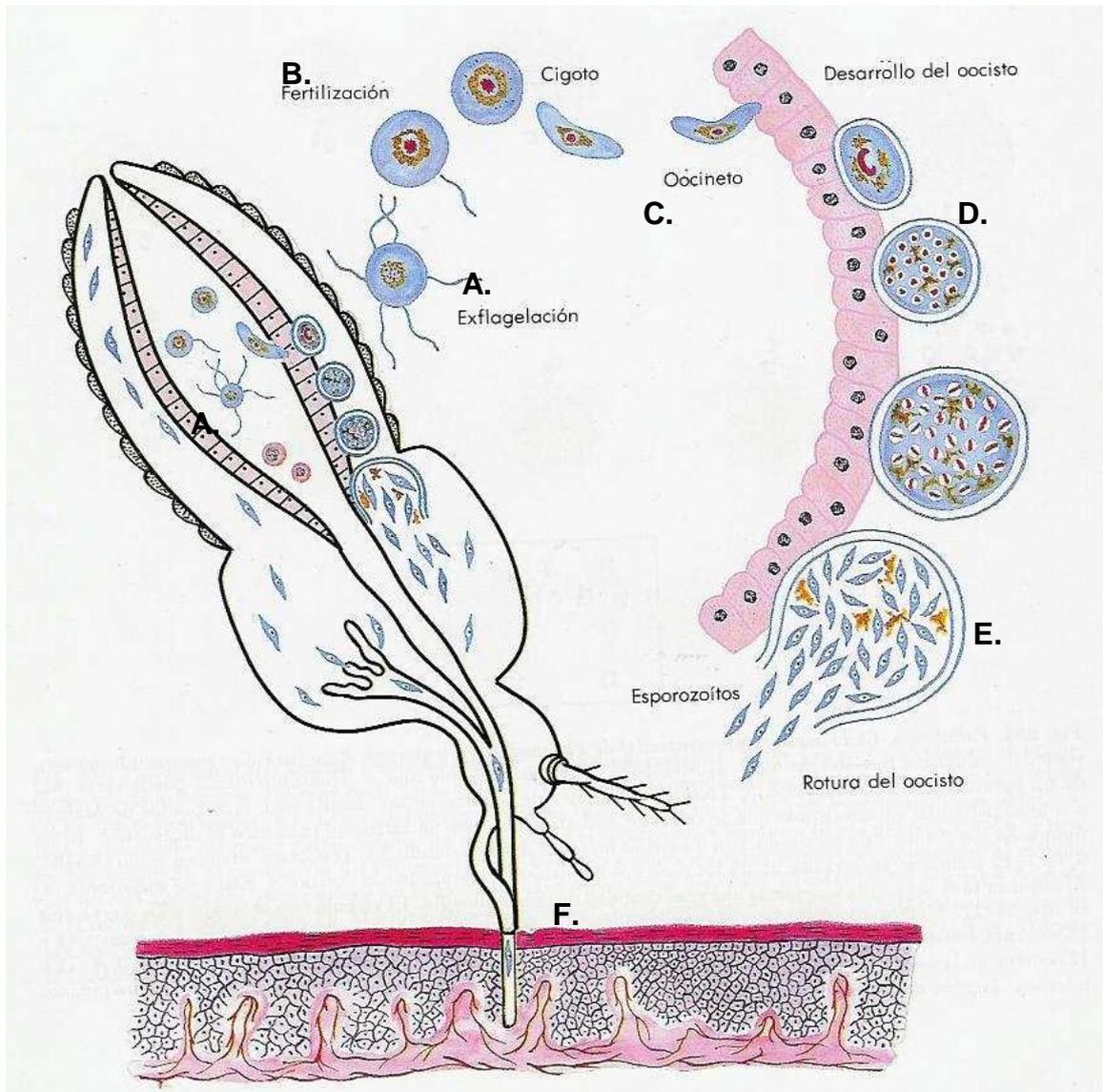


Figura 1: Ciclo sexual de *Plasmodium*.

A. Maduración de gametocitos a gametos, el microgameto exflagela; B. Fecundación; C. Maduración del cigoto a oocineto y penetración a través de la pared del intestino medio; D. Maduración del oocisto; E. Liberación de los esporozoítos tras la rotura del oocisto maduro; F. Inoculación de los esporozoítos a través de picadura del *Anopheles* hembra, para iniciar el ciclo asexual en el humano. (McDonald George A, Paul J, Cruickshank B. 1998. Atlas de Hematología. Madrid. Editorial Médica Panamericana.

Vector

La malaria humana es transmitida solamente por las hembras del género *Anopheles*. De las aproximadamente 430 especies de *Anopheles* que se encuentran distribuidas mundialmente, exceptuando los polos, solamente 30-40 tienen la capacidad de transmitir la malaria, lo cual depende de la región y del ambiente (Fig. 2).

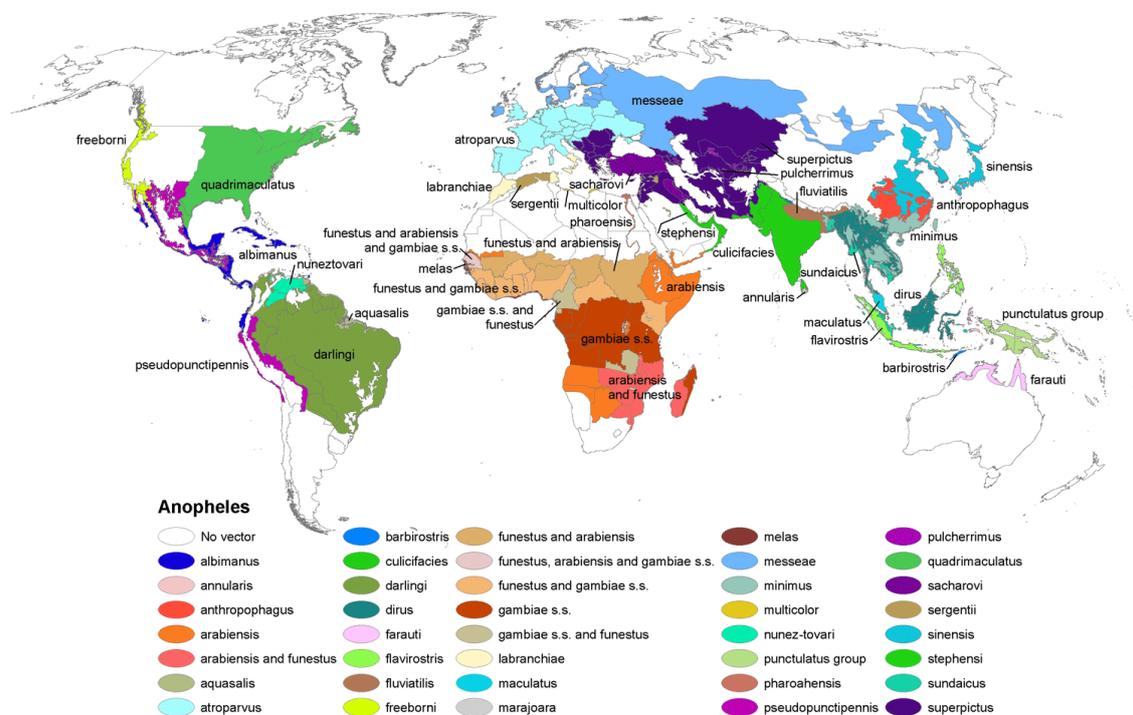


Figura 2. Distribución mundial de *Anopheles*

El mapa indica, según el color, la presencia de la especie en la región. En México predominantemente se encuentran *Anopheles albimanus* y *pseudopunctipennis*. (<http://www.cdc.gov/malaria/biology/mosquito/> Division of Parasitic Diseases National Center for Zoonotic, Vector-Borne, and Enteric Diseases, 2008).

Todos los mosquitos anofelinos presentan cuatro etapas en su ciclo de vida: huevo, larva (con 4 estadios), pupa y adulto. Las primeras 3 etapas duran de 5 a 14 días en medio acuático, dependiendo de la especie y de la temperatura. Las hembras del adulto pueden vivir hasta un mes en la naturaleza (Vaughan *et al*, 1994).

Durante la etapa del adulto, los mosquitos copulan; y una vez alcanzada la madurez para alimentarse, los mosquitos hembra se alimenta con sangre, por lo que tiene la capacidad de actuar como vector de la malaria. Por su parte, los mosquitos machos se alimentan únicamente del néctar de plantas y frutos. Después de alimentarse, la hembra deposita los huevecillos en la superficie de cuerpos de agua; este ciclo, llamado gonotrófico, se repite varias veces durante la vida del mosquito hembra (Carpenter *et al*, 1955).

Cuadro clínico

La enfermedad puede comenzar con malestar indefinido y episodios febriles agudos, conocidos como paroxismos. Después de un lapso sin fiebre se repite el ciclo de escalofríos, fiebre y sudores todos los días, en días alternos o cada tercer día, dependiendo de la especie de *Plasmodium* que este infectando al paciente (Conly, 1964).

Las recaídas, después de períodos sin parasitemia, son frecuentes (en el caso de las infecciones por *P. vivax* y *P. ovale*) y pueden aparecer en intervalos irregulares durante dos y cinco años, respectivamente. Las infecciones palúdicas pueden persistir hasta 50 años, con crisis febriles recurrentes (Center for Disease Control and Prevention. Malaria Facts. USA: CDC Inc, 2007; Taylor TE *et al*, 2000).

Las manifestaciones y la severidad de la enfermedad dependen de la especie de *Plasmodium*, del estado inmune del hospedero humano, del estado de salud y nutrición y de factores genéticos, siendo *P. falciparum* el responsable de la mayoría de los casos de malaria severa.

Diagnóstico

En áreas con potencial de transmisión, se debe sospechar de casos de malaria, a todos los pacientes que presenten episodios febriles. Siendo la demostración del *Plasmodium* en sangre periférica, el diagnóstico definitivo; esto por su observación mediante microscopia de preparaciones de gota gruesa y extendidos sanguíneos teñidos con Giemsa. La identificación de formas anulares con uno o dos núcleos es suficiente para hacer el diagnóstico de malaria (De Haro *et al*, 2002; Iqbal *et al*, 2002).

Tratamiento y control

El control de la malaria se ha basado, principalmente, en el tratamiento de la enfermedad y en el control del vector. El tratamiento de la enfermedad se realiza mediante el uso de drogas antimálaricas, siendo la cloroquina el tratamiento de elección en zonas donde no se haya presentado resistencia a esta droga, debido a lo cual se han implementado esfuerzos en la búsqueda de un antimalárico eficiente. Hasta el momento, el uso de la combinación de fármacos basados en artemisina, ha sido eficiente, sin embargo el hecho de usar dos medicamentos tiende a la adquisición de resistencia. En México no se ha reportado resistencia a la cloroquina, por lo que sigue manejándose como el tratamiento de elección en combinación con primaquina (OMS, Guidelines for the treatment of malaria, 2006; Conly, 1964).

Las vacunas para la malaria están en desarrollo, sin embargo, aún no se ha encontrado una vacuna eficaz. Se han realizado trabajos para intentar comprender los procesos inmunológicos que brindan protección después de la inmunización con esporozoítos irradiados, encontrándose que el sistema inmunológico crea anticuerpos contra la proteína circumesporozoítica (CSP) del esporozoíto. Además, los anticuerpos contra la CSP impedirían que el esporozoíto invada hepatocitos. Por lo que esta, fue elegida como la vacuna más prometedora contra la malaria. Actualmente, existe una gran variedad de vacunas en estudio (Rodríguez-López, 2008).

Respecto al control del vector, éste se puede llevar en diferentes etapas:

1) Por medio de la protección personal, prevención de la entrada a las casas, cerrando las ventanas y puertas, así como la aplicación de repelentes. Con esto se evita que las mosquito hembras se alimenten de un sujeto susceptible; además de no obtener la sangre necesaria para el desarrollo de los huevos.

2) La eliminación de posibles criaderos y que puedan ser usados por los mosquitos hembra para la ovoposición.

3) Utilización de larvicidas (químicos o biológicos) o insecticidas. Aunque, después de la exposición prolongada a un insecticida sobre varias generaciones, los mosquitos, pueden desarrollar la resistencia. El uso racional de los insecticidas para el control del mosquito puede limitar el desarrollo y la extensión de la resistencia. Sin embargo, su uso en la agricultura ha estado implicado a menudo como un factor que contribuye a la resistencia en poblaciones del mosquito.

Otro método es el desarrollo de mosquitos resistentes a la infección, tal método se está perfilando como una posible vía de control de mosquitos. Los

trabajos encaminados a la creación de mosquitos transgénicos o genéticamente modificados, se basa en la hipótesis de que las poblaciones de mosquitos silvestres susceptibles podrían ser transformadas y volverse resistentes a la malaria. Catteruccia *et al*, en el Imperial College de Londres, reportaron en el año 2002 el primer mosquito transgénico resistente al paludismo. El éxito de la sustitución de las poblaciones existentes con poblaciones genéticamente modificadas se basa en un mecanismo de transmisión de elementos genéticos que les confieran resistencia a la infección por el parásito. Sin embargo, este es un tema que en la actualidad continua desatando grandes debates, no solo en el ámbito científico sino también de carácter ético.

El desarrollo y aplicación de este último método de control, dependerá del estudio integrado de la respuesta inmune del mosquito contra diferentes patógenos, pero principalmente la que se llega a presentar durante una infección con parásitos de *Plasmodium sp*.

Respuesta inmune en mosquitos

Los insectos son un grupo grande y diverso, comparado con los vertebrados, el cual, desde los inicios, se ha tenido que adaptar a diferentes condiciones para su supervivencia. Una de las razones de dicho éxito es su sistema inmune.

Desafortunadamente solo se han estudiado algunos invertebrados, y dentro de ellos principalmente los insectos, sin embargo, se reconocen características esenciales que comparten todos los insectos como lo es la existencia de un sistema inmunitario de defensa innato o natural constituido por componentes celulares y humorales (Hoffman *et al*, 1999).

Los mosquitos, al igual que el resto de los invertebrados, no presentan una respuesta inmune adaptativa (expansión clonal de células y moléculas inmunes específicas), por lo que no poseen el repertorio de reconocimiento antigénico, que a diferencia si posee el humano (Du Pasquier *et al*, 1999; Vivier *et al*, 2005). No obstante, poseen una respuesta inmune innata muy eficaz y flexible que les ha permitido evolucionar hasta nuestros tiempos. Dichas características de este sistema nos invitan a explorar este campo, por lo que a continuación se describirá brevemente los antecedentes que fundamentan una innovadora propuesta para el control de la malaria.

Barreras físico-químicas.

Ante una infección por cualquier patógeno, éste debe ser capaz de atravesar las barreras físicas que presenta el mosquito, constituidas por la matriz peritrófica, la cutícula del exoesqueleto y el revestimiento del sistema respiratorio traqueal.

Respecto a la capacidad del oocineto de *Plasmodium* para penetrar la pared intestinal y desarrollarse a ooquistes en el hemocele del lado basal del intestino, es facilitado por la secreción de quitinasa que disocia la quitina presente en la membrana peritrófica. (Huber *et al.*, 1991; Langer *et al.*, 2000), así como la velocidad que posee el parásito para invadir la célula epitelial antes de la formación de ésta membrana. En caso contrario, el parásito quedará atrapado en el intestino medio o en la matriz peritrófica, al menos, hasta que fuera desechado, en ambos casos sin posibilidad de proseguir su desarrollo, limitando la infección en el mosquito.

Es posible que en estas interacciones los parásitos, virus o bacterias logren atravesar las barreras físicas. Sin embargo, cualquier microorganismo

que sea capaz de evadirlas, despertará una respuesta en diferentes tejidos, entre ellos el cuerpo graso, los cuales liberaran efectores inmunes al sistema circulatorio del mosquito, la hemolinfa. Así mismo, la interacción con los hemocitos desencadenará diferentes mecanismos efectores de defensa tales como la fagocitosis, encapsulación, la secreción de péptidos antimicrobianos, la formación de nódulos, aglutinación y melanización (Beckage, 2008).

Sistema inmune.

La respuesta inmune que presenta el mosquito inicia tras el reconocimiento del parásito como elemento no propio; debido a la interacción de sus proteínas de superficie con los receptores de patrones de reconocimiento (PRR) presente en tejidos y hemocitos, así como de manera soluble en la hemolinfa (Christophides *et al*, 2004). Después del reconocimiento del elemento extraño, la señal es transmitida al núcleo de la célula respondedora para la activación de genes efectores. Estas vías de señalización incluyen los sistemas Toll e Imd, lo que conduce a la amplificación de la señal de reconocimiento, así como la activación de la respuesta efectora, modulada por la cascada de la profenoloxidasa y sus inhibidores (serpinas) (Sanders *et al*, 2005).

La respuesta efectora está dada por los mecanismos de defensa inespecíficos de los invertebrados, ya sean celulares, representado por la intervención de los hemocitos entre los que se encuentra la fagocitosis, formación de nódulos y cápsulas (Chen y Laurence, 1985; Gupta, 1991; Chikilian y cols., 1994); y en los humorales, la presencia de péptidos antibacterianos y el sistema de la profenoloxidasa (sistema parecido al complemento vía alterna) (Boman y Hultmark, 1987; Hoffmann y Hoffmann,

1990). En la hemolinfa de *An. albimanus* se han caracterizado tres distintos tipos de hemocitos o células sanguíneas: prohemocitos, plasmátocitos y células granulares (Hernández y cols., 1999), los cuales participan en la fagocitosis y formación de nódulos contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, levaduras y partículas de sephadex (Hernández-Martínez y cols., 2002). Mecanismos descritos a continuación:

Fagocitosis. Es el mecanismo dado por células con capacidad fagocítica que se conocen como hemocitos. El comportamiento de estas células es similar a la fagocitosis de los macrófagos de los vertebrados, ya que presentan procesos como quimiotaxis (aproximación al patógeno), adherencia (reconocimiento y contacto celular), ingestión (formación de un fagosoma) y digestión (activación de hidrolasas lisosomales). En *Anopheles*, este proceso está dado por los plasmátocitos (un tipo de hemocito) (Lavine *et al*, 2002).

Nódulos y Encapsulación. Cuando se ve superada su capacidad fagocítica, bien por encontrarse los patógenos en cantidad excesiva, o por su excesivo tamaño (en el caso de parásitos grandes), los hemocitos rodean a los patógenos para impedir su diseminación, constituyendo nódulos o encapsulándolos, respectivamente (Christensen BM, *et al*, 2005; Kumar S, 2003; Hernández, S, 2002). En ambos casos, se forma una envoltura multicelular que secuestra al patógeno en su interior, con depósitos frecuentes de melanina. Esta melanina es generada tras la activación de la cascada de la profenoloxidasa, y tiene efectos tóxicos sobre gran parte de los parásitos que pueden afectar a los animales invertebrados, por las especies reactivas de oxígeno que se generan en este proceso (Greenwood *et al*, 2005).

Entre los factores solubles, presentan sustancias producidas en su mayoría por los hemocitos como son las opsoninas, aglutininas, sustancias con

actividad lítica directa (Ramet et al., 2002; Levashina et al., 2001). En artrópodos se conocen también un gran número de péptidos con función microbicida o antifúngica, como son los *péptidos antimicrobianos*. Otro mecanismo importante es la *melanización* sin participación de hemocitos, llevada a cabo, de igual manera, tras la activación de la cascada de la profenol-oxidasa, lo que culmina con la melanización del agente extraño, impidiendo su desarrollo, limitándole el ingreso de nutrientes y liberando especies reactivas de oxígeno, producidas durante el proceso, con lo que se logra la eliminación del agente extraño (Nappi et al, 2005).

Dimopoulos, et al, identificó al menos 200 genes inmunes que se expresaban en *Anopheles gambiae*, tras un reto con diferentes patógenos, incluyendo *Plasmodium*. Así mismo, observó que la expresión de marcadores inmunes durante la infección con *Plasmodium* puede ser detectada en el intestino o en el cuerpo graso (Dimopolous et al, 2002). La sobre-expresión de genes inicia desde el momento en que los parásitos se encuentran en la luz del intestino (Luckhart et al, 2003).

Algunos estudios demostraron que en *Anopheles stephensi* se limita el desarrollo de *Plasmodium berghei* por producción de óxido nítrico en el epitelio del intestino medio del mosquito (Luckhart et al, 1998). Así mismo se demostró que el intestino de *An. pseudopunctipennis* responde de manera similar produciendo óxido nítrico en presencia de bacterias, levaduras o parásitos de malaria (Herrera-Ortiz et al, 2004), y que la generación de especies reactivas de oxígeno (anión superóxido) por el intestino de *An. albimanus* es tóxica para los oocinetos de *P. berghei* (Lanz-Mendoza et al, 2002). Estas observaciones se limitan a lo que ocurre a nivel del epitelio intestinal y aún carecemos de

información de lo que ocurre en el hemocele durante infecciones tempranas y tardías con parásitos de malaria.

Dimopoulos y cols. (1999) han identificado marcadores moleculares de la respuesta inmune del mosquito *An. gambiae* contra bacterias y *P. berghei*. Ellos encontraron seis marcadores de infección bacteriana: AgGNBP (*An. gambiae* Gram-negative binding protein), Gambif-1 (homólogo al factor de transcripción Dorsal de *Drosophila*), Defensina, ISLP5 (immune related serine protease like sequence 5), ISLP 13 (immune related serine protease like sequence 13), IGAL 20 (infection responsive galactose lectin). Estos marcadores son expresados cuando los mosquitos son infectados con bacterias. Resultados similares se han obtenido con líneas celulares de *An. gambiae*. Por otro lado, ISP 13, AgGNBP, defensina e IGAL 20 son inducidos en el estómago de mosquitos infectados con *P. berghei*. Estos marcadores también se expresan cuando los esporozoítos son liberados a la hemolinfa. La función biológica de los demás marcadores es desconocida, pero su presencia indica que los mecanismos de defensa son activados por la invasión parasitaria. Por otro lado, Blandin y cols. (2002) usando la técnica de interferencia de RNA bloquearon la defensina de *An. gambiae* y demostraron que este péptido antibacteriano no es suficiente para eliminar al parásito de la malaria, por lo cual podemos pensar que la eliminación de los parásitos podría depender de diferentes moléculas (diferentes genes) que actúen de manera sinérgica.

Pocos estudios se han realizado sobre los mecanismos de defensa celulares de los mosquitos contra *Plasmodium*. Weathersby y McCall (1968) encontraron que los gametocitos de *P. gallinaceum* inyectados en el hemocele de los mosquitos *Culex pipiens* y *Ae. aegypti* fueron activamente fagocitados

por las células sanguíneas, pero no observaron diferencias entre las especies de mosquitos resistentes y susceptibles. Asimismo, Scalzo-Lichtfouse y cols. (1990) observaron que las infecciones con *Plasmodium* inducen una respuesta celular en el mosquito pero el sistema inmune no parece reconocer al parásito. Hernández-Martínez y cols., (2002) observaron que esporozoítos muertos de *P. vivax* inoculados en el hemocele no inducen ninguna respuesta celular y Brey (1991) reportó que tampoco ocurre melanización. En nuestro laboratorio, hemos observado que células pericárdicas del vaso dorsal (corazón) de *An. albimanus* presentan capacidad de agregar numerosos esporozoítos de *P. vivax* durante el curso de una infección natural (Datos no publicados). Asimismo, se observó que las células pericárdicas, cuerpo graso y epitelios pleurales presentaron capacidad de síntesis de DNA *in vitro*, en presencia de concanavalina A, o después de inocular levaduras en el hemocele; sugiriendo que éstos tejidos pudieran tener una participación importante en la respuesta inmune del mosquito contra patógenos (Hernández-Martínez y cols. 2006).

ANTECEDENTES

Como hemos mencionado, los insectos responden a una variedad muy amplia de microorganismos y antígenos mediante procesos celulares y humorales, pero se desconocen los mecanismos moleculares involucrados en la síntesis de cantidades masivas de moléculas de defensa involucrados en estas respuestas, y a la fecha, en insectos no se cuenta con evidencias que apoyen la existencia de procesos de proliferación celular durante una respuesta inmune.

La participación de todos los tejidos que participan en la respuesta inmune de los insectos aún no ha sido establecida, pero existen evidencias de que éstos juegan un papel determinante en la defensa contra infecciones. La presencia de bacterias en heridas superficiales producidas en la cutícula de larvas de *B. mori*, *H. cecropia* y *D. melanogaster*, induce la expresión de RNA mensajeros de cecropinas en la epidermis (Brey *et al*, 1993; Tzou *et al*, 2002), lo que sugiere que los epitelios de la epidermis pueden estar participando de manera determinante en la respuesta inmune.

Hernández-Martínez *et al* (2006); desarrollaron una metodología de cultivo primario de órganos y tejidos del mosquito *An. albimanus*, uno de los principales vectores de *P. vivax* en México, lo que permitió iniciar el estudio de la participación de los tejidos en la respuesta a estímulos antigénicos. En estos estudios no se logró evidenciar la presencia de fenómenos de proliferación celular; sin embargo el cuerpo graso, epitelio de las membranas pleurales, tejido nervioso y vaso dorsal respondieron a la inoculación de levaduras *S. cerevisiae* mediante una intensa síntesis de DNA nuclear.

El trabajo anterior evidenció y evaluó la capacidad de síntesis de DNA en diferentes tejidos de mosquitos retados con levaduras, mediante la

incorporación *in vitro* de un análogo de la timidina [5-bromo-2-deoxiuridina (BrdU, compuesto que se incorpora al DNA durante su síntesis)] y el uso de anticuerpos anti-BrdU. La incorporación de BrdU en el DNA ha sido muy útil en diferentes sistemas biológicos para determinar la cantidad y localización de células que se encuentran en la fase S del ciclo celular (Lenronne *et al*, 2001), sin embargo como se mencionó anteriormente, durante la síntesis de DNA inducida por un reto inmune en *An. albimanus* no se lograron evidenciar procesos de proliferación celular (Hernández-Martínez *et al*, 2006).

Los hallazgos de este trabajo, sugieren de que la intensa síntesis de DNA observada pueda ser parte de un mecanismo que aumente el número de copias de genes para la producción masiva de moléculas de defensa ante un reto inmune (como péptidos antibacterianos). Se ha evidenciado que células foliculares (somáticas) de los ovarios de *D. melanogaster* presentan un proceso de síntesis de DNA relacionado con la amplificación de grupos de genes específicos que codifican para proteínas del corion del cascarón del huevo, lo cual será referido en el presente trabajo como formación de amplicones (Claycomb *et al*, 2004).

La amplificación génica ha sido ampliamente estudiada en varias especies de insectos, sin embargo siempre en base a procesos asociados a etapas específicas del desarrollo de tales insectos (Claycomb y Orr-Weaver, 2005).

En el caso de *Drosophila*, los amplicones son una estrategia empleada para alcanzar altos niveles de expresión de genes que codifican para proteínas del cascarón del huevo. Durante esta amplificación de genes, las células somáticas de los ovarios de *Drosophila* utilizan la maquinaria de replicación de la célula, armando primero los componentes del complejo de reconocimiento

del origen (ORC; por sus siglas en inglés), lo cual es esencial para la amplificación génica en este tejido, pero no así para un fenómeno similar que se presenta en las glándulas salivales (Park y Asano, 2008).

La síntesis de DNA combinada con la formación de cromosomas politénicos en tejidos abdominales en el cultivo de *An. albimanus*, sugieren un proceso donde las células están metabólicamente muy comprometidas, posiblemente debido a la alta producción de moléculas inmunes para responder ante un patógeno, sin la necesidad de que ocurra división celular (Hernández-Martínez *et al*, 2006; Edgar y Orr-Weaver, 2001). Así, las evidencias muestran que los insectos presentan procesos que permiten que sus células respondan eficientemente ante diferentes demandas metabólicas, sin la necesidad de multiplicarse; uno de estos procesos es conocido como endorreplicación.

El DNA puede presentar diferentes mecanismos de replicación. Cada uno de estos mecanismos cubre requerimientos específicos en diferentes etapas del desarrollo celular. La replicación mitótica se lleva a cabo en células que proliferan para incrementar su número, otro mecanismo es la amplificación génica localizada que se especializa en incrementar productos génicos particulares (Claycomb y Orr-Weaver, 2005).

La endorreplicación del DNA se lleva a cabo en células diferenciadas que han perdido su habilidad para proliferar, y el cual se encuentra ampliamente distribuido en vertebrados y artrópodos (Edgar y Orr-Weaver, 2001; Park y Asano, 2008). Este es un mecanismo empleado por células especializadas y altamente biosintéticas para expandir su contenido de DNA genómico sin presentar división celular. Este mecanismo es común en diferentes tejidos de insectos durante la embriogénesis, estadios larvales y

tejidos diferenciados del adulto durante la oogénesis (Smith y Orr-Weaver, 1991). Adicionalmente, las células del cuerpo graso de insectos hembra adultos responden con síntesis de DNA ante una demanda elevada para producir vitelogenina, la cual es necesaria para el desarrollo de los huevos (Dittmann *et al*, 1989).

En el trabajo de Claycomb y cols, (2004), se demostró que la endorreplicación no sólo es utilizada para incrementar los niveles de las proteínas estructurales que constituyen el cascarón del huevo de *Drosophila*, sino que también se pueden amplificar genes cuyos productos; son enzimas solubles que participan en la unión de la vitelina ubicada entre la membrana plasmática y el cascaron externo del oocito en desarrollo (Botchan y Levine, 2004).

Como ya se mencionó, la endorreplicación es usada como mecanismo de replicación en células que no presentan división celular. Su ciclo celular se ve modificado convirtiéndose en endociclos. Los endociclos consisten en distintas combinaciones entre las fases S y G del ciclo mitótico. Los endociclos son regulados principalmente por oscilaciones en la actividad de Ciclina E y CDK2 (Edgar y Orr-Weaver; 2001). Durante los endociclos la mayoría del genoma es replicado en cada fase S, mientras que en la amplificación de genes ciertas regiones específicas del genoma son sobrerreplicadas generalmente resultando en un aumento del número de copias de los genes o regiones intergénicas de DNA (Hemingway *et al*, 1998).

Es probable que la endoreplicación inducida por el reto inmune en *An. albimanus* (Hernández-Martínez *et al.*, 2006) utilice los mismos mecanismos moleculares ya descritos en las variantes del ciclo celular, estudiado en *Drosophila*, que van desde la ausencia de la fase G1 (paso directo de M a S);

pero las particularidades de este fenómeno durante la respuesta contra patógenos requerirá de mayor investigación.

JUSTIFICACION

La respuesta inmune en mosquitos es fundamental para la eliminación de patógenos, incluidos los parásitos que pueden llegar a transmitir. Sin embargo, son muchos los aspectos moleculares de esta respuesta que aún desconocemos, tanto en su parte efectora como en la regulatoria.

En la actualidad se cuenta con los genomas completos de mosquitos vectores de enfermedades infecciosas (*An. gambiae*, *Ae. aegypti*, *Culex quinquefasciatus*) (Lawson *et al*, 2008) y con técnicas que permiten introducir genes, lo que abre la posibilidad de modificar su respuesta inmune para transformar insectos vectores de parásitos en no-vectores. No obstante, esta posibilidad no será factible si carecemos de un conocimiento sólido del sistema inmune de los insectos.

Actualmente, en nuestro grupo contamos con evidencia de la capacidad de síntesis de DNA en *An. albimanus* después de un reto inmune y con una base de datos de su transcriptoma. Lo anterior nos estimula para continuar analizando con mayor detalle los procesos que regulan este fenómeno, lo que podría en un futuro permitirnos elegir las estrategias más adecuadas para la manipulación genética de mosquitos vectores de enfermedades infecciosas. Dichas estrategias se vuelven más atractivas debido a la continua aparición de cepas resistentes, tanto en los insectos a los insecticidas como en los parásitos a las drogas empleadas para su control.

En el presente trabajo la elección del mosquito *An. albimanus* se debió a que es uno de los principales vectores de malaria causada por *P. vivax* en México.

OBJETIVOS

Objetivo general

Investigar la síntesis de DNA en los diferentes tejidos de *Anopheles albimanus* alimentados con sangre infectada con *Plasmodium berghei*.

Objetivos particulares

- Investigar la síntesis de DNA en mosquitos a diferentes tiempos post-alimentación con sangre infectada con *P. berghei*.
- Investigar las diferencias cualitativas y cuantitativas en la síntesis de DNA en los tejidos de *An. albimanus* durante la interacción con *P. berghei*.
- Comparar las diferencias en la síntesis de DNA en una cepa susceptible y una resistente de *An. albimanus* a la infección con *P. berghei*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Mosquitos.

En el presente estudio se utilizaron mosquitos hembra de la especie *An. albimanus* colonizados originalmente en el insectario del Centro Regional Investigación en Salud Pública de Tapachula Chis., México (cepa Tapachula). Actualmente la colonia se encuentra establecida en el insectario del Instituto Nacional de Salud Pública (INSP), de donde fueron obtenidos. Posteriormente, para ensayos de infección se utilizaron mosquitos *An. albimanus* de cepas susceptibles y resistentes a la infección de *P. berghei*, las cuales fueron obtenidas en el transcurso de este trabajo (Hernández-Martínez et al. datos no publicados). Las larvas fueron criadas con una dieta a base de croquetas para ratón (Purina) pulverizadas y los mosquitos (adultos) con un algodón humedecido en una solución de azúcar al 3%. Todas las fases del mosquito fueron mantenidas en un fotoperiodo de 12/12 h de oscuridad/luz a 28°C y los adultos en condiciones de humedad relativa de 80%. La edad de los mosquitos fue de 0-1 ó de 3 días post-emergencia.

Obtención de cultivos de oocinetos de Plasmodium berghei (cepa ANKA 2.34).

Las fases exoeritrocíticas de *P. berghei* se cultivaron y los oocinetos se enriquecieron de acuerdo a métodos previamente reportados (Rodríguez *et al.*, 2000). Los parásitos *P. berghei* ANKA 2.34 (cepa productora de gametocitos) y *P. berghei*- GFP (parasitos que expresan constitutivamente la proteína verde fluorescente, fueron originalmente obtenidos a través de una colaboración de la Dra. Ma. Del Carmen Rodríguez.

Brevemente, se inoculan ratones Balb/c con fenilhidracina (0.20 ml a una concentración de 6 mg/ml diluido en PBS 1X). Al tercer día, los ratones fueron inoculados con aprox. 1×10^6 parásitos de la cepa ANKA de *P. berghei* (a quién denominamos simplemente *P. berghei* para diferenciarla de la cepa recombinante de *P. berghei*-GFP). A tres días post-infección, la sangre de los ratones que presentaron parasitemia alta fue obtenida por punción cardiaca, utilizando heparina y se filtró en columnas de celulosa CFII (para eliminar la mayoría de leucocitos), adicionando aprox. 6.5 ml de medio de cultivo RPMI para oocinetos suplementado con 20 % de suero fetal bovino (descomplementado por calor). La mezcla de parásitos y de medio de cultivo se agitó y se incubó durante 24 horas a 20-21 C, para la obtención de oocinetos maduros.

El cultivo de 24 horas conteniendo a los oocinetos se centrifugó a 2500 rpm una vez por 10 min a 19°C y se descartó el sobrenadante. El botón fue resuspendido a un 40% de hematocrito con suero fetal bovino (descomplementado por calor) (Rodríguez *et al*, 2002). Esta muestra fue utilizada inmediatamente para alimentar a los mosquitos, utilizando una membrana artificial, metodología descrita posteriormente.

Obtención de cultivos de oocinetos de P. berghei recombinantes que expresan constitutivamente la proteína verde fluorescente (GFP).

El procedimiento realizado fue igual al descrito anteriormente solo que en este caso se empleo la cepa ANKA de *P. berghei* que tiene integrado a su genoma el plásmido PbGFP con el cual permite la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) (Franke-Fayard *et al*, 2004). La proteína verde fluorescente se encuentra integrada en el genoma en la unidad génica del RNA

ribosomal c (c-rRNA) el cual no es esencial para el desarrollo del parásito. Esta cepa de *Plasmodium* expresa constitutivamente la proteína verde fluorescente y se encuentra bajo el control de un promotor fuerte proveniente del factor de alargamiento 1 α (Franke-Fayard *et al*, 2004).

Igualmente, los oocinetos fueron resuspendidos al 40% de hematocrito con suero fetal bovino (descomplementado por calor)

Alimentación de mosquitos con oocinetos e incorporación de BrdU.

Para estos ensayos, grupos de 250 mosquitos fueron alimentados *ad libitum* en un algodón humedecido con una solución al 3% de azúcar conteniendo 100 μ g/ml de BrdU desde su nacimiento, incluso después de la alimentación con sangre infectada con *Plasmodium*, hasta el final del experimento. El algodón fue cambiado cada 24 h. Los mosquitos adultos fueron mantenidos en un fotoperíodo de 12/12 h de oscuridad/luz en condiciones de humedad relativa de 80% y a 28 °C hasta antes de la alimentación con sangre infectada. Inmediatamente después de la alimentación con los oocinetos, los mosquitos fueron mantenidos bajo las mismas condiciones, a excepción que la temperatura se cambió a 22 °C (requisito necesario para el desarrollo de *P. berghei*) (Doolan *et al.* 2002).

La alimentación de los mosquitos con sangre infectada con *P. berghei*, *P. berghei*-GFP o con sangre no infectada (control) fueron realizadas de manera similar. Al momento de la alimentación la sangre fue adicionada con 5mM de ATP. La alimentación fue realizada en una membrana artificial elaborada con parafilm y utilizando un alimentador artificial el cual mantuvo la sangre a 37 °C utilizando un sistema circulatorio de agua.

En el caso de las infecciones con *P. berghei*, como primer paso para evidenciar la inducción de síntesis de DNA, los mosquitos fueron disecados a 3, 5 y 9 días post- alimentación en grupos de 20 para la obtención de su carcasa (abdomen sin intestino). La carcasa fue procesada para detectar incorporación de BrdU mediante ensayos de inmunofluorescencia. Lo mismo se realizó con sus respectivos controles.

En el caso de los mosquitos alimentados con sangre infectada con *P. berghei*-GFP (cepa susceptible y resistente), estos fueron disecados en grupos de 20 diariamente durante 15 días (colectando solo 5 para ensayos de inmunofluorescencia y 10 para extracción fenólica de DNA). Las carcasas y los intestinos fueron separados y se mantuvieron en una cámara húmeda en medio RPMI para verificar la infección o no infección en el intestino (cepa susceptible y resistente respectivamente) antes de proceder a la fijación o colecta en un amortiguador de lisis (inmuno-detección y obtención de DNA respectivamente). Cuando se presentó un mosquito no infectado en la cepa susceptible o uno infectado en la cepa resistente, estos fueron descartados.

Disecación de mosquitos.

Los mosquitos fueron inmovilizados en hielo (4 °C) para facilitar su manipulación. Estos fueron disecados en una gota de amortiguador de fosfatos (PBS, 140 mM NaCl, 2.6 mM KCl, 1.5 mM KH₂PO₄, 20.4 mM Na₂HPO₄, pH 7.2), conteniendo inhibidores de proteasas (2 mM fenilmetil-sulfonilfluorida, 0.1 mM Na-p-tosil-L-lisinacloro-metil cetona, 1 mM EDTA y 0.1 mg/ml leupeptina). Se realizó un pequeño corte en ambos lados de la membrana pleural, entre el tórax y el abdomen. El abdomen sin vísceras se cortó a lo largo de la membrana pleural, usando una aguja hipodérmica. Como se mencionó

anteriormente y con la finalidad de obtener una cinética de incorporación de BrdU, los mosquitos fueron disecados a diferentes tiempos (cada 24 h post-alimentación), obteniendo abdomen e intestino. El intestino se colocó en una gota de medio RPMI sobre un porta objetos que se mantuvo en una cámara húmeda hasta su observación en el microscopio. Por su parte, los abdómenes se colocaron en los pozos de una placa de ELISA con 50 μ l de RPMI para mantenerlos viables hasta corroborar su infección (en su intestino correspondiente).

La identificación se realizó mediante la observación de oocinetos u ooquistes verde fluorescentes en el intestino del mosquito, utilizando un microscopio de epifluorescencia.

Inmunodetección de la incorporación de BrdU.

Después de haber sido alimentados con BrdU, los mosquitos fueron disecados y los tejidos fijados en formaldehído al 4% en PBS por 2 h a temperatura ambiente (RT). Posteriormente se retiró el exceso de fijador y los tejidos se lavaron 3 veces con PBS por 10 minutos cada cambio. Las muestras fueron permeabilizadas con metanol absoluto (a -20°C) durante 10 minutos. Posteriormente, las muestras fueron lavadas con PBS-Tritón X-100 al 1% durante 10 minutos a RT. Las muestras fueron hidrolizadas con HCl 2M, durante 1 h a RT, lo anterior para hacer que el DNA de los tejidos se vuelva de cadena sencilla (requisito indispensable para que el anticuerpo pueda detectar al BrdU). El exceso de ácido fue retirado, y el resto neutralizado con 3 ó 4 cambios de solución de Hank, 10 minutos cada uno. Las muestras fueron lavadas 3 veces con Tween-20 al 0.1% en PBS, 10 minutos cada cambio a RT. El bloqueo de sitios inespecíficos se realizó con albúmina sérica bovina al 2%

en PBS (PBS-A) durante 1h a RT. El exceso de solución bloqueadora fue removido y se agregó anticuerpo anti-BrdU conjugado a FITC (Fluoresceína-5-isotiocianato, Roche) en PBS-A a una concentración de 1:100. Las muestras se incubaron 2h a RT, o toda la noche a 4 °C (siempre protegidas de la luz). Después de retirar el exceso de anticuerpo, los tejidos fueron lavados 3 veces con Tween-20 al 1% en PBS. Finalmente los tejidos fueron incluidos en glicerol al 80% en PBS para ser observados en un microscopio de epifluorescencia.

Extracción fenólica de DNA.

Los intestinos y abdómenes colectados para este propósito, fueron homogenizados por separado en tubos eppendorf de 1 ml, en 250 µl de amortiguador de lisis (apéndice 1). Las muestras se incubaron a 56 °C toda la noche. Realizada la digestión se agregaron 250 µl de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (Gibco, BRL). Se mezcló en el vortex y se centrifugó durante 10 minutos a 13000-14000 rpm. La parte acuosa fue recuperada y se agregó el mismo volumen (250 µl) de cloroformo para eliminar las trazas de fenol. Se mezcló en el vortex y se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 minutos. La parte acuosa fue recuperada y se agregaron 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío a -20 °C (625 µl). Inmediatamente se agregó un décimo del volumen original (25 µl) de acetato de sodio 3M, pH 5.25 estéril. Se mezcló perfectamente y se incubó por 30 minutos a -80 °C. Una vez terminada la incubación se centrifugó 10 minutos a 4 °C a 14,000 rpm y la pastilla fue resuspendida en 50 µl de PBS. Finalmente se agregó RNAsa a una concentración final de 0.2 mg/ml y se incubó durante dos horas a 37 °C (Sambrook y Russell; 2001). La concentración de DNA se determinó a 230/260 nm en un Nanodrop.

Cuantificación relativa de la incorporación de BrdU por ELISA.

Una placa de ELISA de 96 pozos, fue cubierta con una solución de poli-L-lisina en amortiguador de carbonatos (apéndice 2) a una concentración 10 $\mu\text{g/ml}$. A cada pozo se añadieron 50 μl , y la placa fue cubierta con papel parafilm dejando incubar un mínimo de 2 horas a RT o toda la noche a 4 °C. Antes de utilizarse, la placa se lavó al menos tres veces con agua destilada.

Las muestras de DNA (10 $\mu\text{g/ml}$ en PBS) fueron desnaturalizadas (se calentó por 3 minutos en agua hirviendo y rápidamente se colocó en hielo y se colocaron 50 μl por pozo, incubando por 30 minutos a RT. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con la solución de ELISA-wash 1X (apéndice 3) para remover el DNA que no se pegó a la placa. Para el bloqueo de lugares inespecíficos se añadieron 100 μl de albumina sérica bovina al 1% en PBS (PBS-A) y se incubó a 37 °C por 1 h. La placa se lavó 3 veces con ELISA-wash y se agregaron 50 μl por pozo de un anticuerpo anti-BrdU conjugado a peroxidasa dilución 1:100 en PBS-A) y se incubó a 4°C toda la noche. Después de la incubación se realizaron 3 lavados con ELISA-wash y se agregaron 100 μl de ortofenildiamina (apéndice 4) con una nueva incubación por 30 minutos a RT (manteniendo la placa protegida de la luz). La reacción se detuvo con ácido sulfúrico 2.5 N, agregando 50 μl por pozo. Las lecturas se realizaron en el lector para placas de ELISA a 450 nm.

RESULTADOS

Los mosquitos alimentados con oocinetos, mostraron el abdomen distendido y de color rojo, por lo que resultó relativamente sencillo discernir entre los mosquitos alimentados y los que no tomaron sangre. Los mosquitos no alimentados se separaron y se descartaron.

Los mosquitos que se alimentaron en los diferentes grupos, fueron suficientes y sobrevivieron hasta el final de los experimentos planteados en la metodología (15 días), alimentándose con azúcar conteniendo BrdU.

*Inducción de síntesis de DNA en mosquitos alimentados con sangre infectada con *P. berghei**

Estos primeros ensayos fueron realizados con el propósito de conocer si el fenómeno de síntesis de DNA observado ante un reto con levaduras (Hernández-Martínez *et al.*, 2006) también se presentaba durante la interacción de parásitos de *P. berghei* con *An. albimanus*. En la figura 3 se puede apreciar que efectivamente, la alimentación de los mosquitos con sangre infectada con *P. berghei* induce la incorporación de BrdU a los nueve días. Sin embargo, esta incorporación fue claramente observada en células del cuerpo graso y ovarios de menos del 10% de los mosquitos. A los 3 días no se logró detectar señal y a los 5 días se llegó a observar algo pero muy tenue (datos no mostrados). En los controles únicamente se observó señal en células de los ovarios (datos no mostrados). Con este dato, se procedió a realizar los experimentos en las cepas de mosquitos susceptibles y resistentes a la infección utilizando *P. berghei*-GFP.

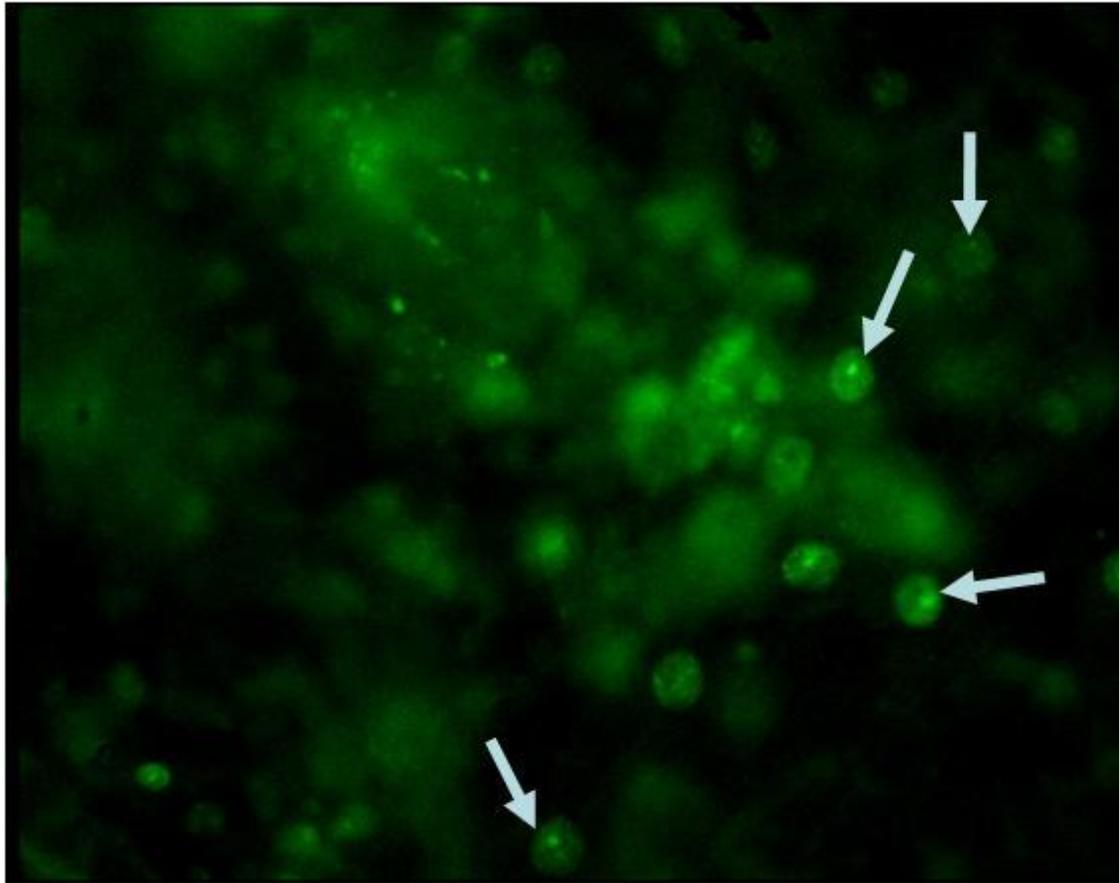


Figura 3. Inmunodetección de BrdU incorporado en células del cuerpo graso abdominal de *An. albimanus* durante la interacción con *P. berghei*. Mosquitos hembra *An. albimanus* (cepa Tapachula) fueron alimentados con sangre infectada con *P. berghei* (clona 2.34 ANKA) y mantenidos con sacarosa adicionada con BrdU. A los 9 días post-alimentación, en algunos de los mosquitos, fue posible observar señal intensa en el núcleo (flechas) de células del cuerpo graso, lo que se interpreta como una inducción de síntesis de DNA. Microscopia de epifluorescencia. 40X.

Identificación de mosquitos infectados con P. berghei-GFP

Con el fin de poder realizar la asociación de mosquitos infectados o no infectados con la síntesis de DNA, como primer paso fue necesario verificar la presencia o ausencia de parásitos a lo largo de los experimentos (15 días). Como se mencionó en la metodología, se utilizó una cepa susceptible y otra resistente de *An. albimanus* a la infección con *P. berghei*. Dichas cepas fueron generadas en el grupo de malaria del INSP, mediante infecciones realizadas en la cepa Tapachula (Hernández-Martínez et al., datos no publicados). De la primera infección se separó la descendencia de aquellos mosquitos que se infectaron y los que no permitieron la infección. Estos grupos, una vez que fueron adultos, fueron nuevamente infectados, pero ahora en cada grupo se descartó la descendencia de los que no se infectaron en la cepa susceptible y de los que se infectaron en la cepa resistente. Esto se repitió por varias generaciones hasta lograr una susceptibilidad del 95 % y una resistencia casi del 100 % respectivamente en las cepas (Hernández-Martínez et al., datos no publicados).

En la figura 4 se muestra la presencia de parásitos de *P.berghei-GFP* en el intestino medio de ambas cepas. La presencia de oocinetos se logró observar incluso 48 h post-alimentación con la sangre infectada en ambas cepas de mosquitos (Fig. 4 A, B). Sin embargo la formación de abundantes ooquistes jóvenes solo se observó en la cepa susceptible de las 48 h en adelante (Fig. 4 C). En la cepa resistente, raramente se llegó a observar a este tiempo la formación de ooquistes jóvenes con fluorescencia (señal de que el parásito estaba vivo), y en el mayor de los casos después de las 48 h ya no se observó la presencia de parásitos en los intestinos (Fig. 4 D). En algunos casos de la cepa resistente, se llegó a observar la presencia de ooquistes jóvenes,

pero fluoresciendo de un color muy diferente (amarillo-naranja) al producido por la GFP, lo que nos hizo suponer que se encontraban muertos (datos no mostrados).

La presencia de parásitos en la cepa susceptible siempre fue confirmada antes de realizar el procesamiento de muestras a lo largo de los experimentos (15 días).

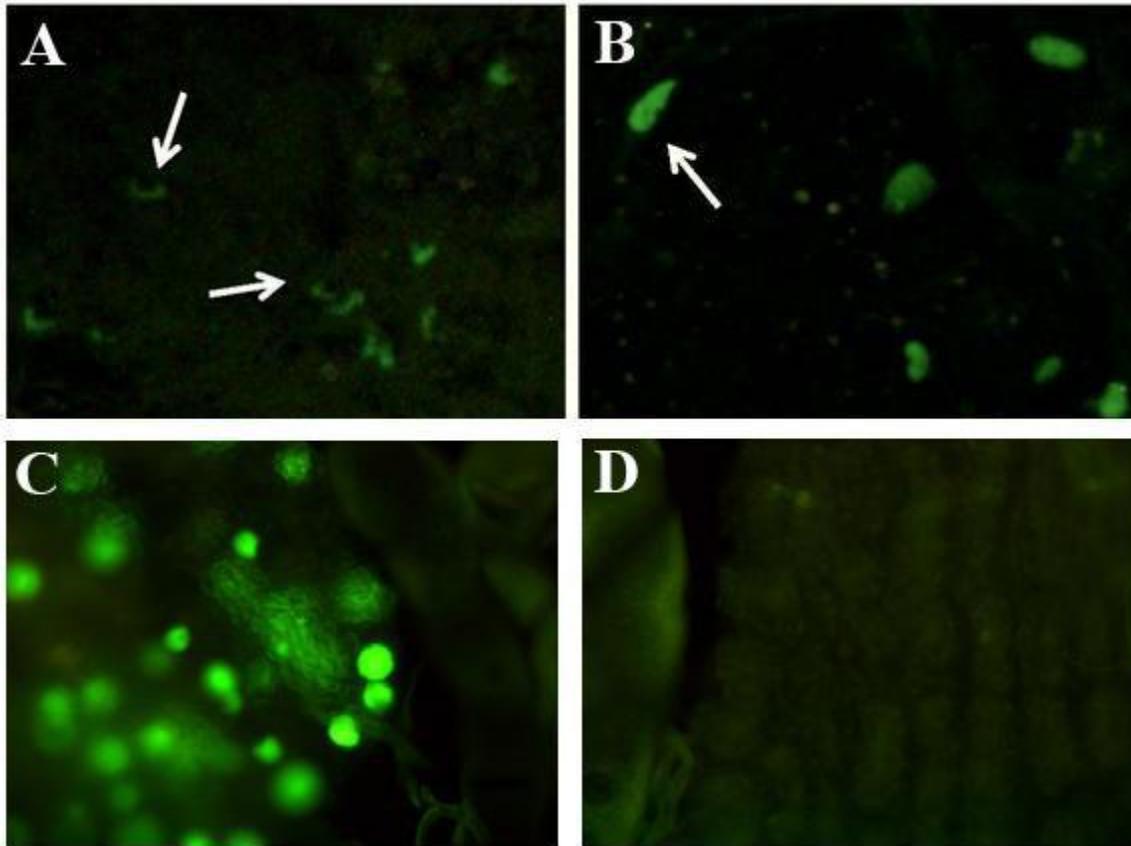


Figura 4. Parásitos de *P. berghei* expresando la proteína verde fluorescente (GFP) en el intestino de *An. albimanus*. A) Oocinetos de *P. berghei* (señalados con las flechas) con su forma característica de media luna, fueron observados en el lumen del intestino del mosquito durante las primeras 24 h post-alimentación, tanto en la cepa susceptible como en la resistente. B) Magnificación de “A”, donde se aprecia con más detalle la forma ovalada de los oocinetos y una cierta polaridad en su morfología. C) Intestino con ooquistes en mosquitos susceptibles a la infección. Pasadas 48 h, los parásitos se presentan en forma de ooquiste joven, el cual continúa expresando la GFP. D) Intestinos de mosquitos resistentes a la infección. A pesar de haber sido alimentados con oocinetos de *P. berghei*, el parásito generalmente ya no es observado después de 48 h de interacción. A) 10X, B-D) 40X. Microscopía de fluorescencia.

Síntesis de DNA en abdomen

Cuantificación relativa de la incorporación de BrdU

El DNA de intestino y del abdomen de los tres grupos de mosquitos (susceptibles, resistentes y control) reveló (mediante el ensayo de ELISA) la incorporación del BrdU en ambos tejidos, pero con distinta intensidad con respecto al grupo y a los días post alimentación con sangre con oocinetos (Fig. 12-15).

En los mosquitos control se presentó una incorporación evidente de BrdU a partir del tercer día post-alimentación con sangre no infectada (absorbancia promedio de 0.290), manteniéndose en el intervalo durante el resto de la cinética (Fig. 5). Este primer valor en la absorbancia para este grupo fue utilizado de referencia (asignándole un valor de 1) para ajustar las densidades ópticas de los tres grupos de mosquitos a valores relativos de incorporación de BrdU.

Los mosquitos alimentados con sangre infectada presentaron un comportamiento similar a los mosquitos control, en cuanto a la intensidad de la incorporación de BrdU en sus núcleos. La figura 6 muestra cómo a partir del segundo día se incrementa la incorporación de BrdU en abdomen (densidad óptica 0.150).

El grupo de mosquitos resistentes reveló la incorporación de BrdU en abdomen a partir del segundo día post alimentación con oocinetos (densidad óptica 0.150) similar al control y a los mosquitos susceptibles, pero a partir del séptimo día la incorporación de BrdU se ve incrementada (densidad óptica 0.910) en comparación con los dos grupos de mosquitos anteriormente

mencionados($P= 0.0005$ y 0.004 , respectivamente) y en el día trece la cinética expone un nuevo incremento alcanzando una densidad óptica de 1.230 (Figura 7).

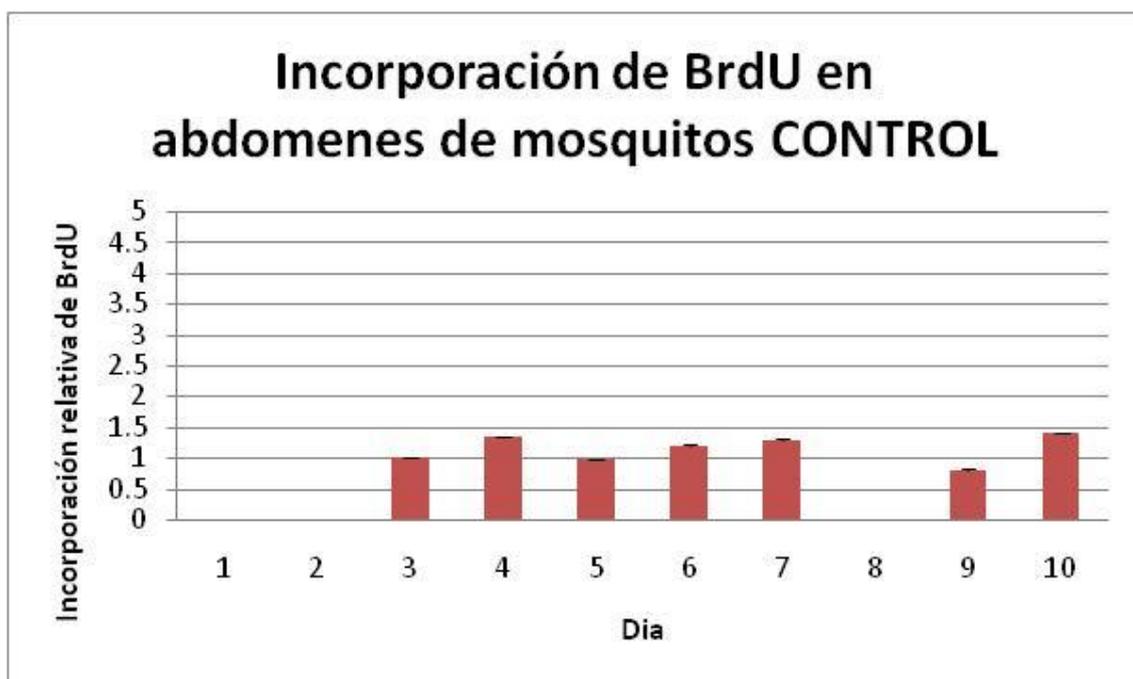


Figura 5: Detección de incorporación de BrdU en abdomenes de *An. albimanus* alimentados con sangre normal. Los abdómenes de los mosquitos control no presentaron incorporación de BrdU los dos primeros días posteriores a su alimentación con sangre, sin embargo, al tercer día su incorporación alcanzó una densidad óptica de 0.290. El resto de la cinética se conservó en valores similares siendo el más alto el del decimo día con una densidad óptica de 0.41.

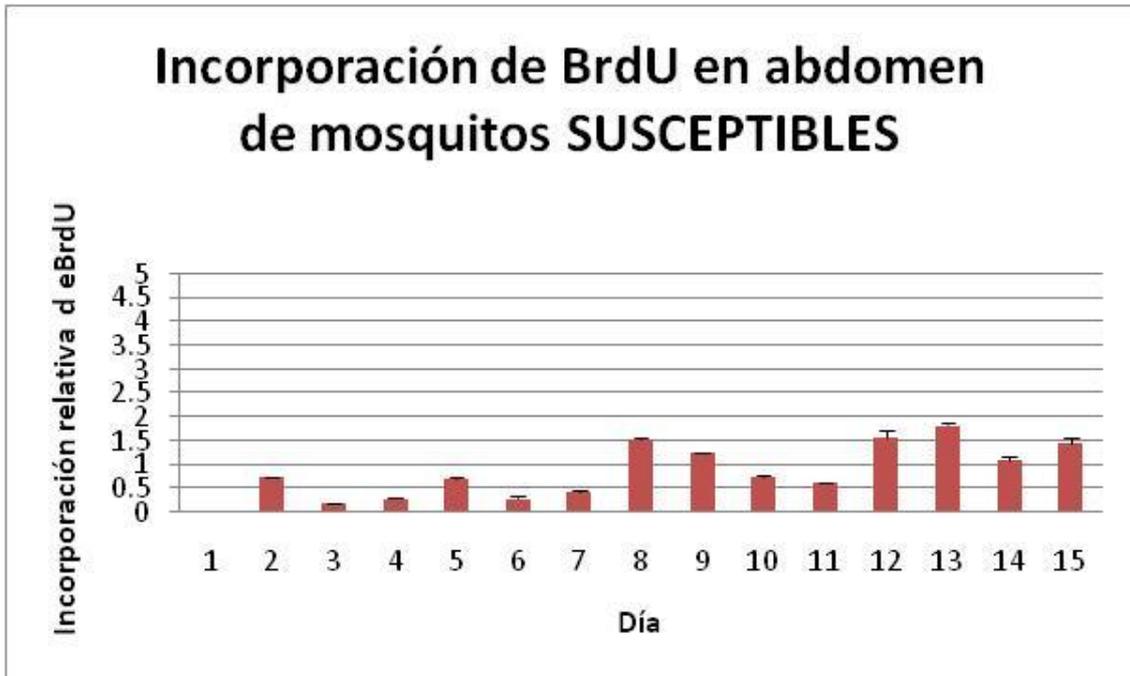


Figura 6. Incorporación de BrdU en abdomen de moscos del grupo susceptible. La grafica muestra comportamientos distintos a los del grupo control, observandose incorporación de BrdU a partir del día dos posterior a su alimentación con sangre y oocinetos, pero en el día 8 y 12 se aprecia un marcado incremento de dicha incorporación.

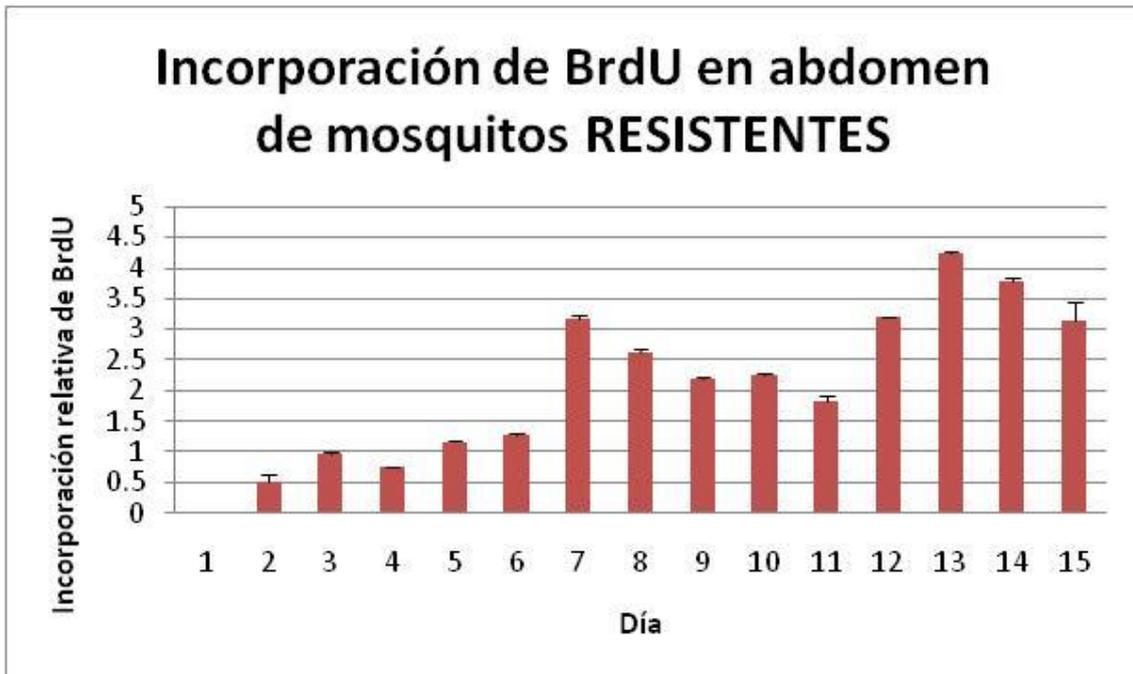


Figura 7. Incorporación de BrdU en abdomen de moscos del grupo resistente. Se muestra una mayor incorporación de BrdU en abdomen de moscos resistentes pero con un comportamiento similar al grupo susceptible con incrementos marcados en el séptimo día y doceavo día post alimentación con oocinetos.

En el intestino de los mosquitos control la incorporación es notoria a partir del día tres post alimentación con sangre no infectada (densidad óptica 0.030), y a diferencia del control de incorporación de BrdU en abdomen, la cinética muestra un ligero incremento en el día seis e inicia un decremento, pero en el día nueve se puede apreciar un pequeño incremento (Figura 8). El valor inicial, fue el valor de referencia para ajustar los datos a valores relativos de incorporación de BrdU en los intestinos de los mosquitos.

La figura 10 muestra la incorporación de BrdU en intestinos de mosquitos susceptibles a partir del tercer día post alimentación con oocinetos (densidad óptica 0.010). De manera interesante esta cinética tiene un comportamiento similar a los controles pues para el día seis presentan un incremento y tras un decremento para el día doce post alimentación inicia nuevamente el incremento de incorporación de BrdU.

En los intestinos de los mosquitos resistentes se registró incorporación a partir del tercer día post alimentación con oocinetos, pues durante los dos primeros días resultaba difícil discriminar entre mosquitos infectados y no infectados. Sin embargo, en la figura 10 se muestra una incorporación de BrdU de manera elevada, con respecto a la incorporación de los mosquitos susceptibles y los del grupo control en el cuarto día de la cinética ($P=0.000000002$ y 0.00000001 , respectivamente), alcanzando una densidad óptica 0.480. Para el día ocho alcanza su incorporación máxima con una densidad óptica de 0.900, el resto de la cinética se mantiene en valores similares.

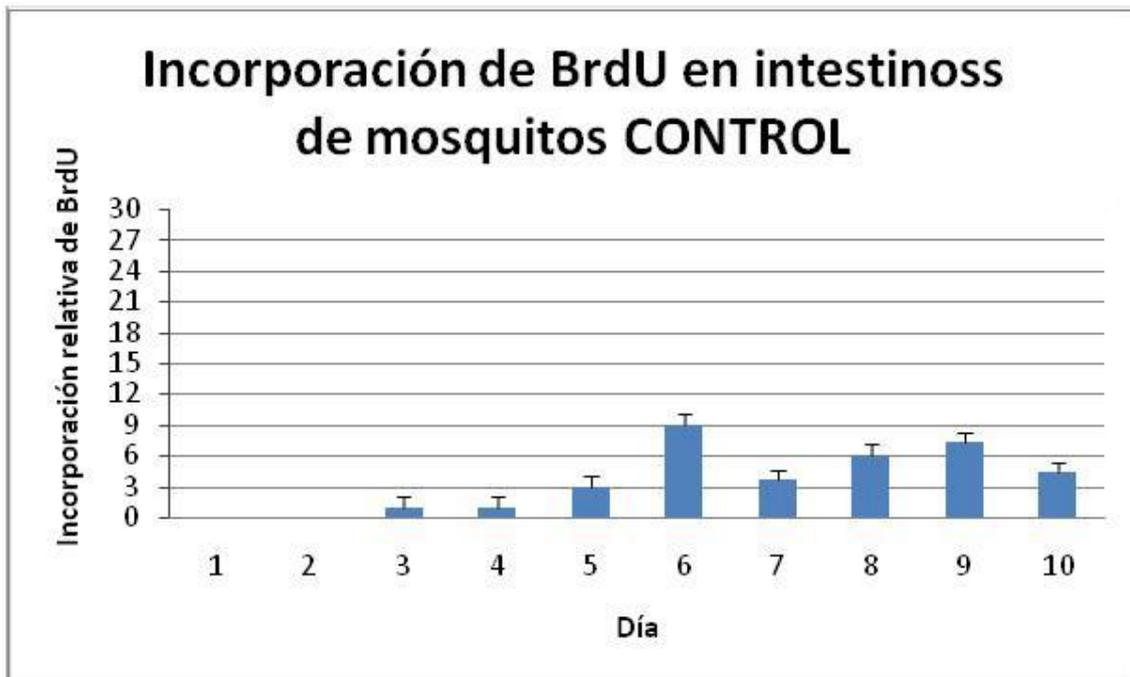


Figura 8: Incorporación de BrdU en intestino de moscos del grupo control. Los intestinos control no presentaron incorporación de BrdU los dos primeros días posteriores a su alimentación con sangre de cordero, sin embargo, al tercer día alcanzaron una densidad óptica de 0.030; y para el sexto día post alimentación la cinética sufre un incremento con un punto máximo de 0.270.

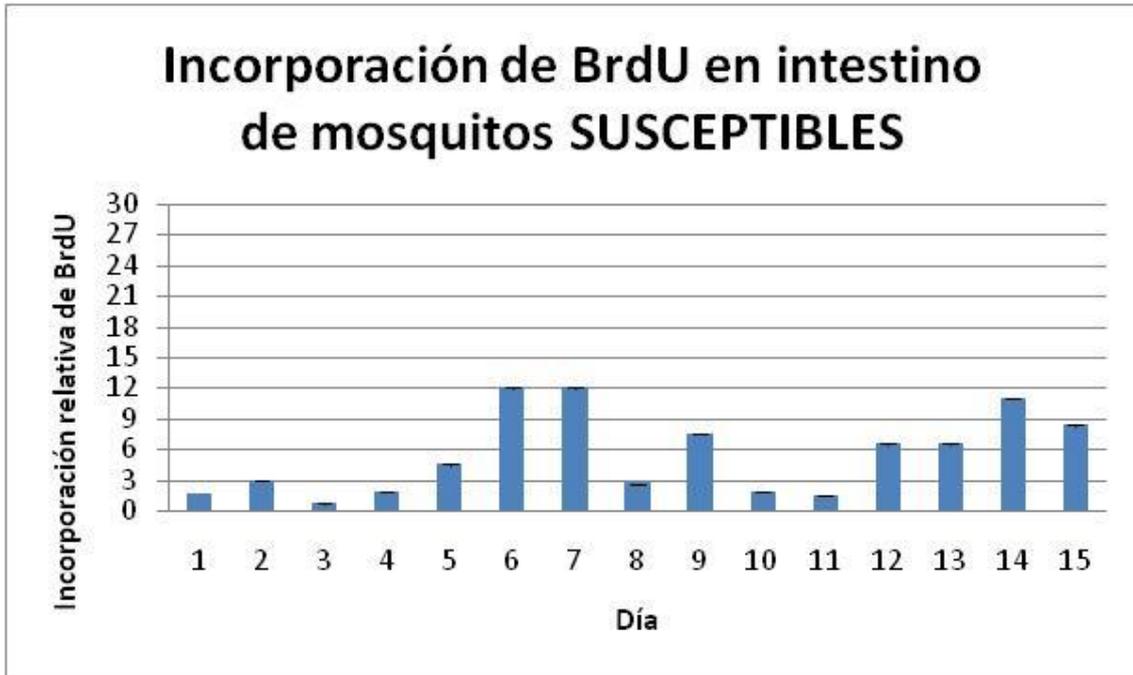


Figura 9. Incorporación de BrdU en intestino de moscos del grupo susceptible. La grafica indica incorporación de BrdU desde el tercer día posterior a la alimentación con oocinetos, pero con un claro incremento en el sexto día de la cinética, alcanzando una densidad óptica de 0.450 , la cinetica decae e inicia su incremento nuevamente para el día doce post alimentación con oocinetos.

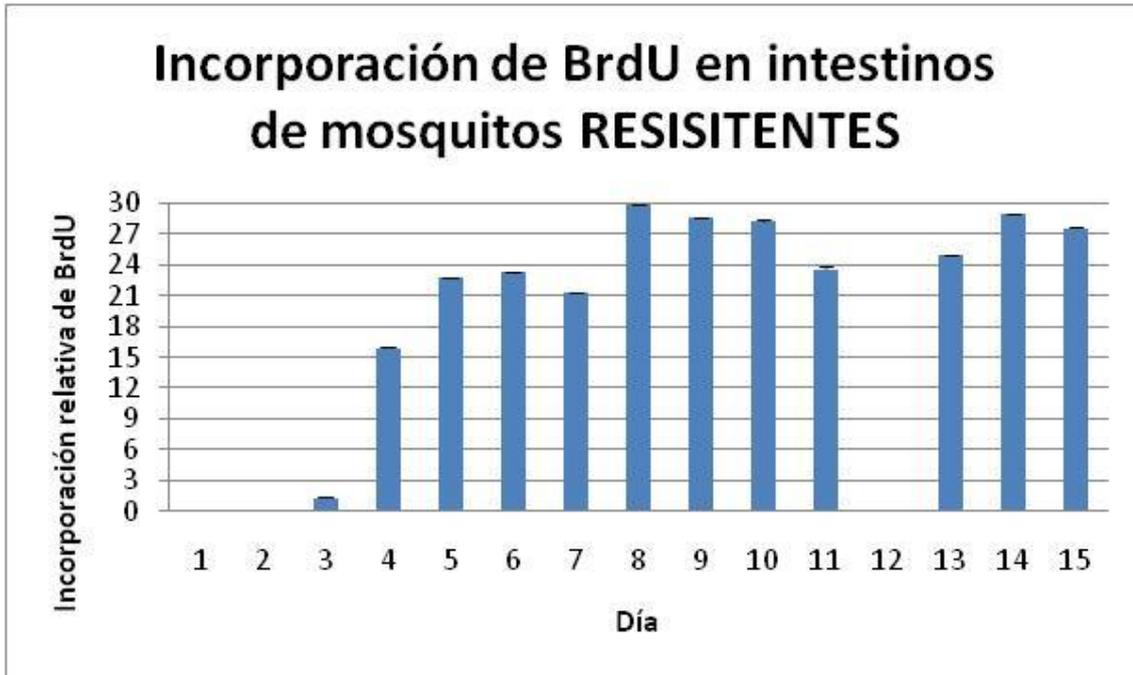


Figura 10. Incorporación de BrdU en intestino de moscos del grupo resistente. La grafica muestra incorporación desde el tercer día con intensidades superiores a los grupos control y susceptible. El incremento de la incorporación se ve reflejado a partir del cuarto día post alimentación con oocinetos con una densidad óptica de 0.140, y un nuevo incremento para el octavo día.

Síntesis de DNA en tejidos abdominales

Los mosquitos control fueron observados al microscopio de fluorescencia, bajo las mismas condiciones. Solo para corroborar la ausencia de fluorescencia provocada por los ooquistes, en el intestino (aún cuando se presentó infección, los parásitos GFP dejan de emitir fluorescencia después del proceso para inmuno detección de BrdU).

De ambos grupos y de los controles, se eligieron 5 abdómenes para realizar el ensayo de inmunofluorescencia y el resto se colocó en un tubo y se metió en congelación para su conservación y posterior extracción de DNA. De igual manera se realizó con los intestinos.

La incorporación de BrdU evidenció la síntesis de DNA en cuerpo graso y en intestino de los mosquitos. A pesar de que los mosquitos control también incorporaron BrdU, los mosquitos que se alimentaron con sangre con oocinetos evidenciaron una mayor incorporación de BrdU en los mismos tejidos.

La cinética de incorporación estudiada, mediante la inmunohistoquímica, en el grupo de mosquitos susceptibles a la infección por *P. berghei* no mostró incorporación en el intestino durante los primeros días, siendo hasta el día cinco post-alimentación con sangre con oocinetos que se observaron varios núcleos marcados (Figura 11 A-C). En el cuerpo graso, de este mismo grupo de mosquitos, este marcaje fue observado desde el tercer día post-alimentación, aunque como lo muestra la figura 11-E, solo en muy pocos núcleos se logró apreciar dicha incorporación; sin embargo, para el día 5 la fluorescencia, emitida por los núcleos que incorporaron el BrdU, se observó incrementada (Figura 11-F).

De manera concordante con las gráficas de incorporación del grupo susceptible, la señal de BrdU incorporado en intestino fue más intensa en el séptimo día post-alimentación. Para el día nueve, puede apreciarse un decremento y hacia el onceavo día la incorporación es mucho más discreta en los núcleos de este tejido (Figura 12 A-C). En el cuerpo graso, de igual manera el séptimo día es en el que se muestra mayor incorporación de BrdU y el resto de los días, ésta va disminuyendo gradualmente, hasta ser apenas detectable (figura 12 D-F). La señal se mantiene similar desde el día 11 hasta el día 15 en la cepa susceptible.

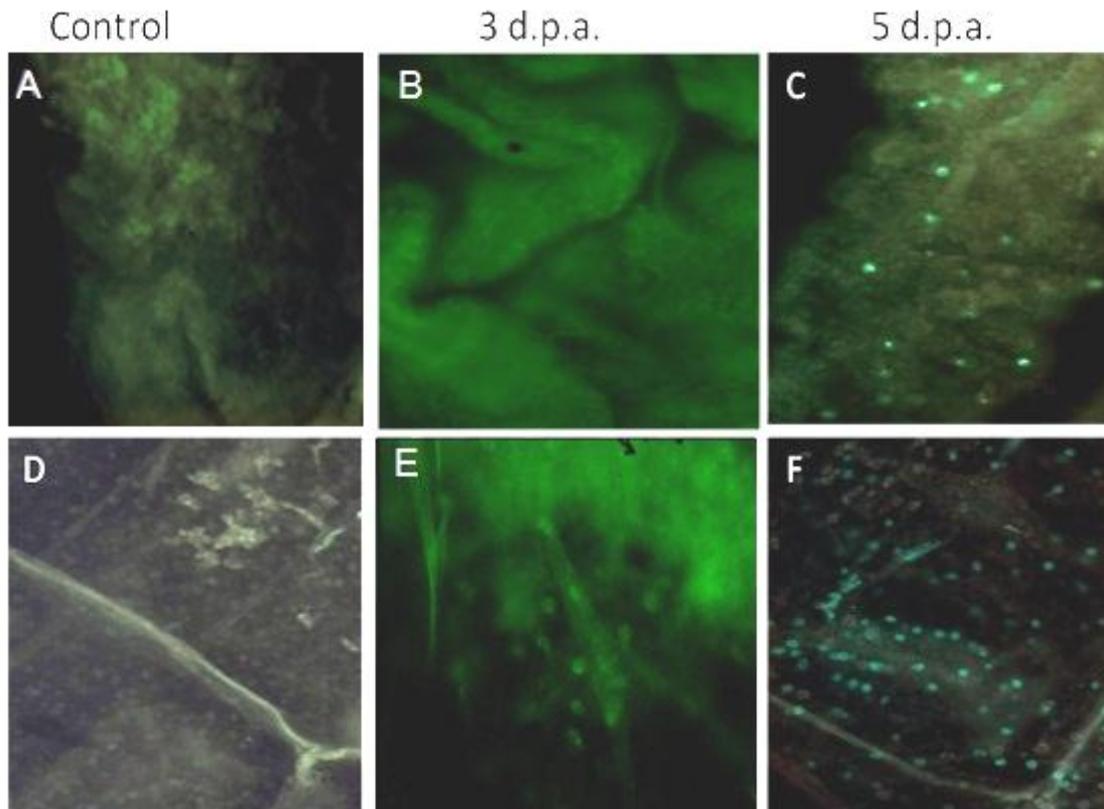


Figura 11. Inmunofluorescencia de la incorporación de BrdU en mosquitos susceptibles a la infección con parásitos de *P. berghei-GFP*. En los primeros días post-alimentación con sangre infectada, en términos generales la señal fue baja y solo hasta el día 5 se comenzaron a observar muchos núcleos marcados, principalmente en el cuerpo graso. A-C) Intestinos mostrando el patrón de incorporación de BrdU en núcleos celulares a los 5 días post-alimentación (10X). D-F) cuerpo graso de los mosquitos con la señal de BrdU en el núcleo de sus células (20X), en algunos casos fue posible observar algunos núcleos con señal a los 3 días, pero la señal fue más evidente a los 5 días post-alimentación. A y D) Grupo control de mosquitos alimentados con BrdU y con sangre normal (sin parásitos).

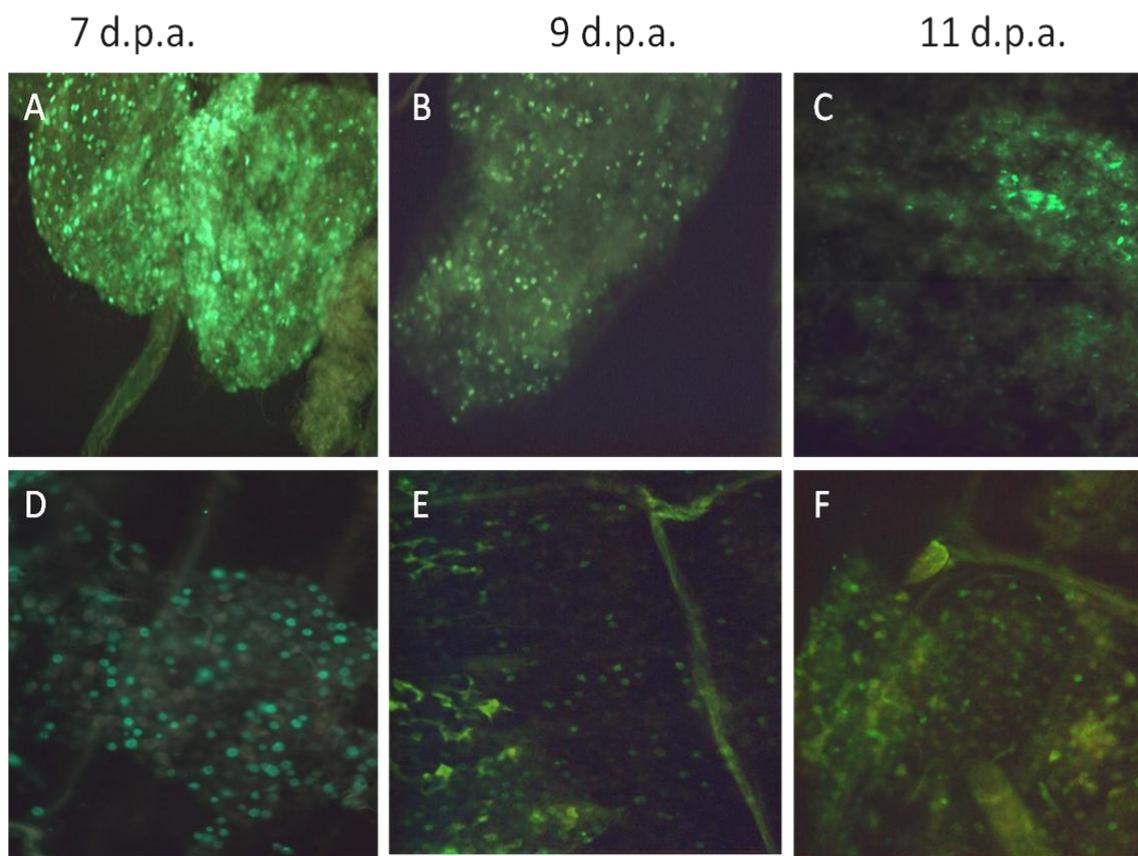


Figura 12. Inmunofluorescencia de la incorporación de BrdU en mosquitos susceptibles a la infección con parásitos *P. berghei-GFP*. La señal de BrdU incorporado fue más evidente e intensa entre el 7^o y 9^o día post-alimentación en la cepa susceptible, posteriormente se observa una señal más discreta en los núcleos celulares. A-C) Intestinos mostrando el patrón de incorporación de BrdU en núcleos celulares (10X), donde se observa una intensa incorporación a partir del día 7 post-alimentación, la cual aún es posible detectar hasta el día 11. D-F) Cuerpo graso donde se observa la señal de BrdU en el núcleo de sus células (20X), en los que se aprecia una buena intensidad aún en el día 7, posteriormente la señal es más discreta y apenas detectable. Cada par de tejidos (intestino y carcasa) corresponde al día post alimentación en las que fue hecha la inmunohistoquímica.

La inmunofluorescencia de la incorporación de BrdU en mosquitos resistentes a *P. berghei*, como se puede observar en la figura 13, es muy intensa a partir de los primeros días. Este hecho sucede en ambos tejidos estudiados, intestinos y cuerpo graso. En el primero, la incorporación se puede observar desde el tercer día post-alimentación (figura 13 A-C) y hasta el séptimo día, ya que para el día nueve u once, la incorporación apenas es detectable (figura 14 A-C), el resto de los días de la cinética, no se detectó señal. En el caso del cuerpo graso de este grupo de mosquitos, sucedió de manera similar, observándose una incorporación intensa desde el tercer y hasta el séptimo día; pero para finales de la cinética la fluorescencia era apenas perceptible, pues eran escasos núcleos los que emitían dicha fluorescencia.

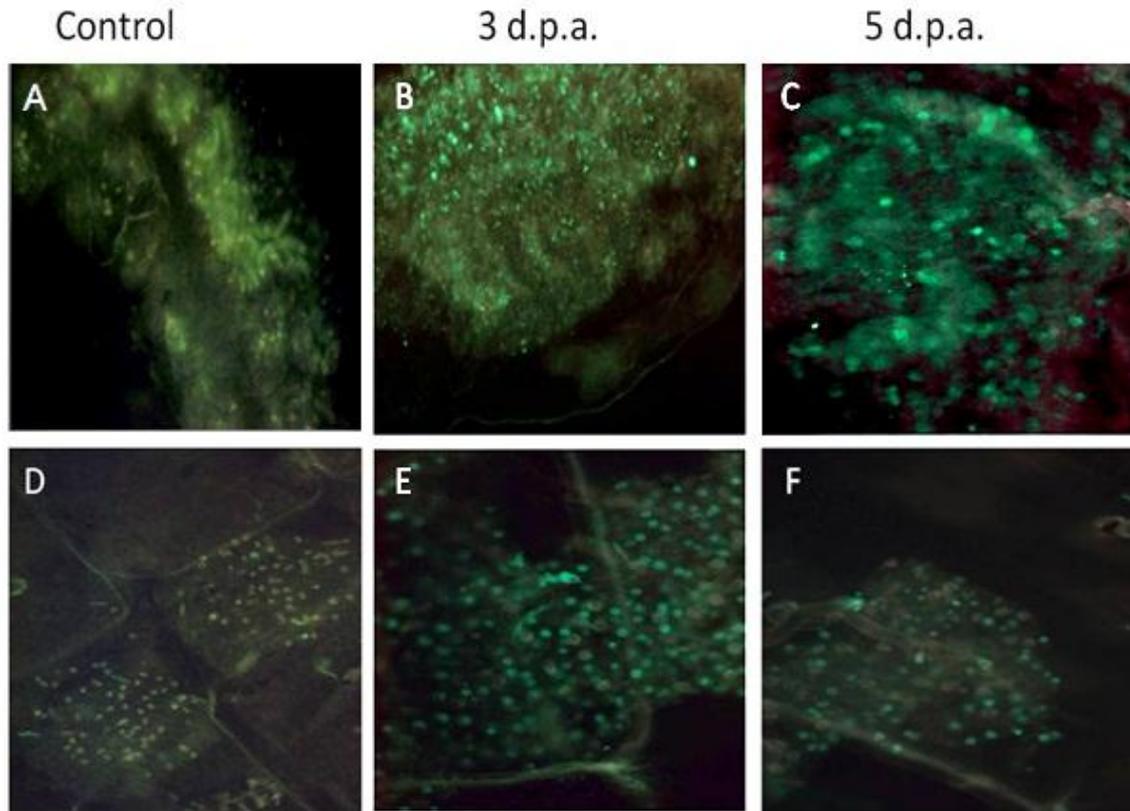


Figura 13. Inmunofluorescencia de la incorporación de BrdU en mosquitos resistentes a la infección con parásitos *P. berghei-GFP*. A-C) Intestinos de mosquitos resistentes a la infección, en los cuales se puede apreciar una intensa incorporación de BrdU desde el tercer día post-alimentación. D-F) Cuerpo graso de mosquitos en los que se observa gran número de núcleos que incorporaron BrdU desde el tercer día post-alimentación. A y D) grupo control, mosquitos alimentados con BrdU y sangre no infectada. A-C) 10X; D-F) 20X.

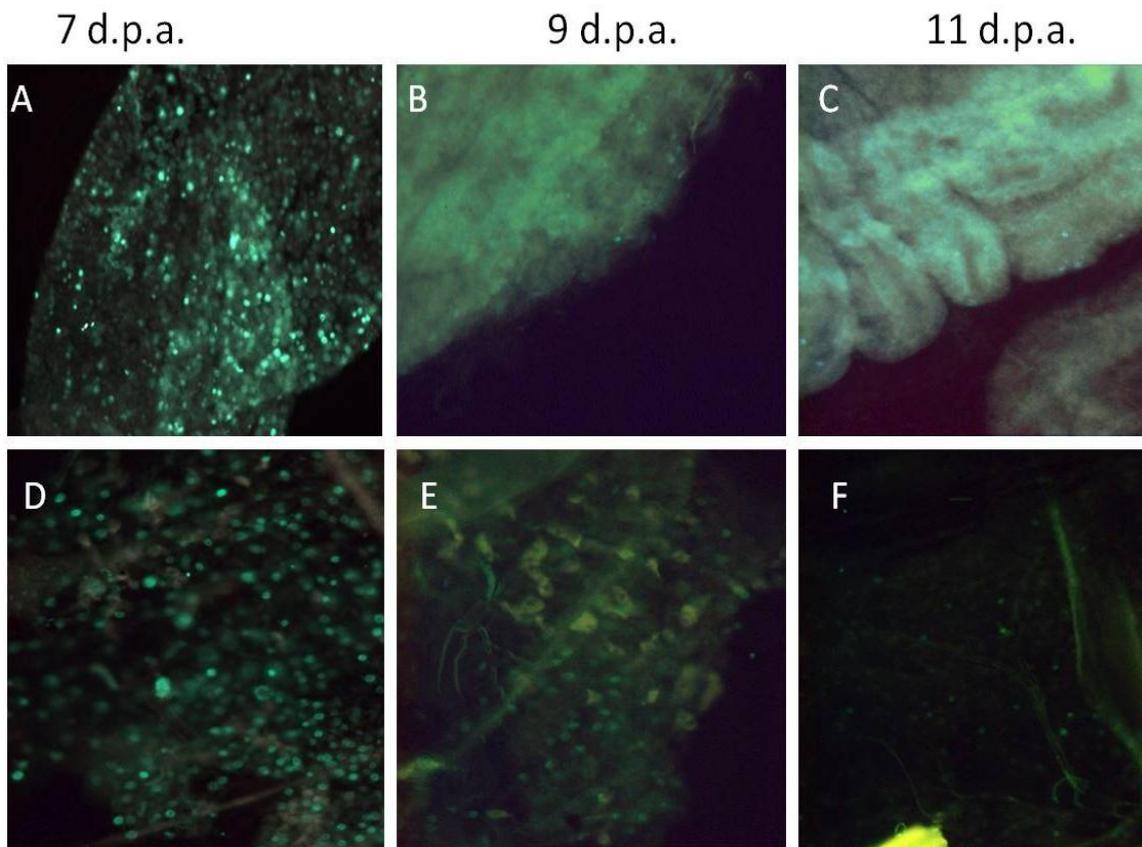


Figura 14. Inmunofluorescencia de la incorporación de BrdU en mosquitos resistentes a la infección con parásitos *P. berghei*-GFP. A-C) Intestinos de mosquitos resistentes, en los cuales se puede apreciar la señal de incorporación de BrdU muy intensa en los núcleos celulares hasta los 7 días post-alimentación, posteriormente la señal disminuye hasta ser prácticamente nula (B, C). D-F) Cuerpo graso de mosquitos en los que se observa una señal de incorporación de BrdU en sus núcleos celulares muy evidente aún en el día 9. Posterior al día 9, la señal ya no fue detectada. A-C) 10X; D-F) 20X.

Resulta interesante el hecho que en el grupo susceptible la incorporación más intensa fue a partir del séptimo día aunque sufrió decrementos a los pocos días; y en el grupo de mosquitos resistentes se mostró una marcada incorporación en los primeros días de la cinética, la cual decreció en los últimos días.

La tabla 1 nos permite apreciar de manera resumida la incorporación de BrdU observada por fluorescencia entre la cepa resistente y susceptible. De manera cualitativa se asignaron 3 cruces a las muestras que presentaron mayor cantidad de BrdU y una cruz a aquellas en las que solo presentaron algunos núcleos marcados. Los ovarios fueron tomados como control positivo en estos ensayos, ya que siempre presentaron fluorescencia. La mayor cantidad de incorporación ocurrió en los mosquitos resistentes durante los primeros días de la cinética, siendo el intestino el que presentó una mayor cantidad de núcleos con señal en comparación con el resto de los tejidos. Asimismo, los intestinos en los mosquitos resistentes mantuvieron la señal hasta el quinto y séptimo día post-alimentación. Para el último día de la cinética, ya no fue posible detectar incorporación de BrdU en ninguno de los tejidos estudiados.

De manera contraria, en el grupo de mosquitos susceptibles el número de núcleos con señal fue muy limitado durante los primeros días, y sólo al final de la cinética se comenzó a observar una mayor cantidad de núcleos con señal, principalmente en membranas pleurales y en el cuerpo graso.

Tabla 1. Incorporación de BrdU en mosquitos infectados con *P. berghei*

Cepa/día	Células pericárdicas	Membrana pleural	Intestino	Cuerpo graso	Ovarios
Resistente/3	—	—	+++	+	+++
Susceptible/3	—	—	—	—	+++
Resistente/5	+	+	+++	+	+++
Susceptible/5	—	—	—	—	+++
Resistente/7	++	++	++	++	+++
Susceptible/7	—	—	—	—	+++
Resistente/9	—	+	+	+	+++
Susceptible/9	+	+	—	+	+++
Resistente/9	—	+	—	+	++
Susceptible/9	+	+++	—	+	++
Resistente/15	—	—	—	—	++
Susceptible/15	+	+++	—	++	++

DISCUSIÓN

La malaria continúa siendo un problema de salud mundial a pesar de las medidas de control y programas de erradicación que se han implementado, así como de las nuevas estrategias en el desarrollo de fármacos y vacunas (González, 2005; Rodríguez-López, 2008; Beier, 2008). México mantiene la vigilancia epidemiológica de la enfermedad y a pesar de estar prácticamente controlada y localizada (Hernández-Avila, 2006) no se descarta que ante los fenómenos naturales resurja la infección con mayor impacto como sucedió con anterioridad.

En la búsqueda de la erradicación de la malaria, y considerando que su distribución dependerá en gran medida del vector *Anopheles*, actualmente se están investigando estrategias alternativas para el control de la enfermedad y una de las más atractivas se basa en la producción de mosquitos refractores a la infección por el parásito de la malaria, lo cual limitaría el desarrollo de éste en el vector, y evitaría o disminuiría la transmisión de la enfermedad. Este trabajo contribuye al conocimiento de la inmunidad del mosquito, estudio indispensable para el proyecto de mosquitos refractarios a la infección.

En un primer ensayo, utilizando la cepa Tapachula a la cual se le alimentó con sangre infectada con oocinetos de la cepa ANKA (cepa que no tiene la GFP), se observó el fenómeno de síntesis de DNA; sin embargo, un hecho interesante fue la intensidad en la fluorescencia que presentaron los tejidos de los mosquitos, ya que entre estos variaba de manera considerable (dato no mostrado). Esto nos indicó que ante la infección con el parásito de *Plasmodium* se presenta el fenómeno de endorreplicación en los mosquitos, pero al parecer existen subpoblaciones de mosquitos en la cepa Tapachula, ya

que solo un número bajo de mosquitos llega a infectarse (aproximadamente el 10%, Dr. Salvador Hernández, comunicación personal).

Estas observaciones nos permitieron decidir separar la población de mosquitos susceptibles de los resistentes, y finalmente contar con un modelo que nos permitiera desarrollar los estudios de incorporación de BrdU en respuesta a la infección con parásitos de malaria. Como se describió en la metodología, un primer grupo de mosquitos fue alimentado con sangre infectada con oocinetos de *P. berghei* GFP, lo cual nos permitió seguir la infección en el mosquito. Cada mosquito se mantuvo aislado y una vez que depositaron sus huevos, los mosquitos fueron disecados y analizados para ver la presencia de parásitos vivos (fluoresciendo) en el intestino. Los huevos se fueron clasificando como pertenecientes a la cepa susceptible y en caso de no presentar parásitos vivos, se clasificaron como cepa resistente. Los huevos se pusieron a eclosionar y se realizó la misma operación por al menos 10 generaciones. Es importante mencionar que para la purificación de ambas cepas, en la susceptible siempre se eliminaron los huevos de aquellos mosquitos que resultaron negativos a la infección y de igual manera, para la cepa resistente se eliminaron los huevos de los mosquitos que llegaron a presentar parásitos vivos. Al final se lograron aislar las dos cepas en donde la susceptible, presentó una prevalencia de infección mayor al 95% y el parásito desarrolló hasta la fase de esporozoito después de 15 días post-infección (Hernández-Martínez, et al, dato no publicado). Este modelo se convierte en una herramienta muy importante para estudios futuros, donde la interacción vector-parásito, podría arrojar las diferencias fisiológicas y moleculares entre los mosquitos que se infectan con el parásito y los que son resistentes a la infección. Los ensayos realizados en el presente trabajo, con la cepa susceptible y resistente alimentadas con sangre

infectada con oocinetos *P. berghei* GFP, nos permitieron observar las diferencias que muestran ambas cepas respecto a la incorporación de BrdU en los núcleos celulares de los diferentes tejidos del mosquito. La cepa resistente a la infección con *P. berghei* mostró una incorporación de BrdU intensa, principalmente en el intestino medio y el cuerpo graso abdominal. Pero como se observa en la figura 5, que hace referencia a la incorporación en abdomen, en los días 7 y 12 pareciera incrementar súbitamente esta incorporación, aunque en las imágenes de las figuras 13 y 14 solo se aprecia un marcado incremento en la intensidad de incorporación de BrdU en el día 7 post-alimentación, mientras que en los últimos días de la cinética la fluorescencia pareciera disminuir. Sin embargo en el intestino, como lo muestra la imagen 7, se aprecia una intensa incorporación a partir del tercer día, con incrementos constantes durante todo el ensayo, sin embargo (figura 14), la fluorescencia pareciera disminuir en los últimos días de la cinética.

La cepa susceptible mostró diferencias marcadas respecto a la cepa resistente, y de manera interesante en abdomen, como lo muestra la figura 4, a partir del segundo día post-alimentación inicia una ligera incorporación de BrdU que se mantiene hasta el día 8, momento en el cual se presenta un incremento manteniéndose en intervalos similares durante el resto de la cinética. Sin embargo, puede apreciarse un ligero descenso en los días 10 y 11. Respecto a los intestinos, en donde la señal se registra a partir del segundo día post-alimentación, sufren un notorio incremento en el día 6-7 y a continuación desciende para incrementarse nuevamente hasta el día 14. Las imágenes muestran la incorporación creciente en intestino y abdomen, reflejando un incremento para los últimos días de la cinética. Sin embargo respecto a la

incorporación que se lleva a cabo en la cepa resistente, podría considerarse como una incorporación limitada en la cepa susceptible.

Las diferencias en el patrón de la incorporación de BrdU entre las cepas de mosquitos, puede estar relacionada directamente a la capacidad de respuesta de ambas contra el parásito. Los resultados obtenidos son relevantes en el entendimiento de la interacción vector-parásito y de los mecanismos de resistencia que pudieran ser relevantes en la eliminación de parásitos de malaria en el mosquito *An. albimanus*.

A favor de lo observado en la cepa susceptible, donde existen limitaciones en la síntesis de DNA, definitivamente este hecho no está dado porque esta cepa susceptible a la infección con *Plasmodium* sea incapaz de responder por medio de la endorreplicación; ya que en el trabajo realizado por Barradas-Bautista (2011), se comparó la síntesis de DNA en ambas cepas, resistente y susceptible, utilizando diferentes microorganismos, entre ellos bacterias Gram positivas, Gram negativas y levaduras, y en ninguno de los retos se demostró que existiesen diferencias en la capacidad de respuesta de ambas cepas (medida por incorporación de BrdU).

En base a los resultados anteriores, podemos sugerir que la síntesis de DNA esta asociada a la resistencia o susceptibilidad del mosquito, considerando que en la cepa resistente de *An. albimanus* a la infección con *P. berghei*, se observó que el parásito es eliminado en los primeros días post-alimentación con la sangre infectada, y al tercer día ya no es posible observar la fluorescencia producida por la GFP de estos parásitos (lo cual ocurre cuando están vivos). De hecho, en muchos casos es posible observar una autofluorescencia remanente, de color amarillento, en quistes jóvenes que lograron llegar a la lamina basal del intestino, y donde su desarrollo se vio

bloqueado, probablemente por un mecanismo inmune como resultado de esta síntesis de DNA (Hernández-Martínez *et al*, 2006). En el caso de la cepa susceptible de *An. albimanus*, se ha observado que *P. berghei* logra su desarrollo hasta quiste maduro, incluso libera las fases de esporozoíto al hemocele (todo visto por la expresión de la GFP), faltando solo la invasión de glándulas salivales para poder ser transmitido al hospedero vertebrado (Hernández-Martínez *et al*, Datos no publicados). Los resultados presentes, muestran que esta cepa de mosquito es capaz de responder por medio de una síntesis de DNA, sin embargo durante la infección con *P. berghei* a pesar de que la síntesis de DNA se presenta, esta parece ser un poco tarde (mayor intensidad en el día 6 y 7 post-alimentación), cuando el parásito ya se ha establecido.

La diferencia temporal de la incorporación de BrdU entre las cepas puede deberse principalmente a la prontitud con que las cepas pueden reconocer al parásito, siendo la cepa resistente la que reconoce al parásito en cuanto entra al lumen del intestino. El mecanismo por medio del cual esto está ocurriendo, aún lo desconocemos. Una vez en el lumen del intestino, el oocineto encuentra barreras físicas dentro del mosquito la primera es la membrana peritrófica que se forma para aislar el bolo alimenticio de sangre del contacto directo con el epitelio intestinal. El oocineto es capaz de cruzar esa membrana y entrar en contacto con las células intestinales para iniciar el proceso de invasión y provocar un daño físico, el cual activa señales de alarma dentro del mosquito (Han *et al.*, 2000). El sistema inmune de la cepa resistente podría estar detectando al parásito antes de que empiece el proceso de invasión o mientras el proceso de invasión está ocurriendo. Si las células del epitelio intestinal son capaces de censar el principio del proceso de la invasión,

con la cual se induce una síntesis de DNA (lo que permitiría un aumento el número de moléculas inmunes en su interior, Hernández-Martínez *et al*, 2006) cuando el parásito esta en el proceso de invasión; este encontrará un medio muy hostil dentro de la célula. Por otro lado, si el parásito resiste y logra volverse ooquiste, al seguir en contacto con este medio hostil y por el intercambio que debería tener para obtener nutrientes, el ooquiste se vería afectado, y en cualquier caso la infección es detenida.

En el caso de la cepa susceptible, el desarrollo del parásito llega muy bien hasta la formación de ooquistes. Después de cierto tiempo cuando el ooquiste ha madurado, libera a la hemolinfa esporozoítos, los esporozoítos que son otra fase móvil del *Plasmodium* entran a la hemolinfa, pero hasta el momento no se ha observado que invadan glándulas salivales (Dr. Salvador Hernández, comunicación personal). En la cepa susceptible la incorporación más intensa de BrdU correspondió a los días 8 y 9, y 12 y 13 post-alimentación, en este intervalo de tiempo es cuando el ooquiste madura y libera los esporozoítos al hemocele. Los esporozoítos que se liberan a la hemolinfa podrían ser censados y atacados por lo que podría ser una combinación de fagocitosis, encapsulación y producción de moléculas inmunes. Las células que son capaces de producir moléculas inmunes, se encontrarían con una demanda metabólica alta para contender con la infección de miles de esporozoítos. Los órganos, como el cuerpo graso, podrían tener una capacidad de respuesta aumentada con genes inmunes que estuvieran amplificándose con síntesis de DNA. Aun después en el día 15 fue posible detectar la incorporación de BrdU. Lo anterior podría estar indicando la duración de la respuesta quizá en caso de que hubiera una re-infección, no pasar por todo el proceso de síntesis una vez más.

Los hechos antes mencionados, nos hacen sugerir que el fenómeno de síntesis de DNA está directamente relacionado a la capacidad de las cepas para limitar la infección por *Plasmodium*. Dicha resistencia podría estar dependiendo de la capacidad del mosquito para detectar al parásito y montar a tiempo una respuesta de síntesis de DNA, fenómeno que a su vez podría estar involucrado en la producción de moléculas efectoras de la respuesta inmune del mosquito.

Previamente, en un estudio *in vitro*, se reportó que el mosquito es capaz de entrar en síntesis de DNA ante un reto microbiano (Hernández-Martínez *et al* 2006); en asociación con el presente trabajo, el parásito podría funcionar como un reto que despierta una respuesta inmune solo en la cepa de mosquitos resistentes.

En diversos trabajos (Meister *et al.*, 1997; Brey *et al.*, 1993; Dimopoulos *et al.*, 2002; Richman *et al.*, 1997; Bulet *et al.*, 1999) se ha descrito la producción de cantidades micromolares de péptidos antimicrobianos durante un reto con patógenos. Sin embargo, a la fecha, no se ha logrado explicar cuál es el mecanismo que utilizan los insectos para amplificar ésta respuesta inmune durante un reto microbiano. Por otro lado, se sabe que en invertebrados no existe una memoria inmune, ni linfocitos que pudieran amplificar clonas específicas contra determinado patógeno (Du Pasquier, Flajnik, 1999). Sin embargo, también sabemos que existen mecanismos de amplificación genética como puede ser la formación de cromosomas politénicos de glándulas salivares de *Drosophila* o politenia en células del cuerpo graso, mecanismos que sirven para amplificar genes específicos ante una alta demanda de moléculas específicas. Con nuestros resultados podemos sugerir que la diferencia observada entre ambas cepas durante la infección con *P.*

berghei, podría ser explicada por un mecanismo similar en estos mosquitos, presentándose un fenómeno de endorreplicación para la producción en masa de moléculas inmunes capaces de limitar la infección del parásito.

Nuestros resultados muestran que la síntesis de DNA puede ayudarnos a explicar la resistencia de los mosquitos a la infección con *P. berghei*, sin embargo a la fecha no contamos con evidencias que nos confirmen que la inducción de síntesis de DNA sea exclusiva para moléculas inmunes. Por otro lado, esta síntesis de DNA podría reflejar la síntesis de moléculas que degradan algún componente necesario para el desarrollo del parásito, lo cual de igual manera limitaría la infección en el mosquito. En un estudio preliminar, utilizando una estrategia denominada “macroarreglo” en *An. albimanus* retados con diferentes microorganismos, se logró evidenciar la amplificación de algunos genes que codifican para moléculas inmunes que podrían participar en el reconocimiento o eliminación del parásito (Barradas-Bautista, 2011).

CONCLUSIONES.

1) Cepa resistente y susceptible.

En colaboración con la Dra. Rodriguez, el Dr. Hernández-Martínez, se diferenció y aislaron cepas de *An. albimanus* resistentes y susceptibles a la infección por *P. berghei*. Esto nos permitió determinar claras diferencias respecto a la incorporación de BrdU en distintos tejidos del mosquito de ambas cepas. Lo cual da pie a diversas investigaciones con la finalidad de entender el comportamiento fisiológico de dicha resistencia que presenta una de las cepas a la infección por el parásito que bien, pueden ayudar a establecer parámetros en la búsqueda del mosquito transgénico.

2) Sitos de incorporación de BrDU.

Este trabajo demostró que el mosquito *An. Albimanus* incorpora BrdU en cuerpo graso e intestino ante un reto con *P. berghei*; de igual modo que lo hace ante retos bacterianos y micóticos, como lo mostró el Dr. Hernandez-Martinez. Sin embargo, en el trabajo realizado por Hernández-Martínez en el 2002, se demostró que la síntesis de DNA, evidenciada por la incorporación de BrdU, se presentaba en tejidos relacionados con una respuesta inmune, tales como células pericardicas y cuerpo graso, entre otros, este último coincide con el tejido que presentó incorporación de BrdU ante la infección con el parásito; no así el intestino, el cual juega un papel fundamental en el desarrollo del parásito, esto nos permite suponer que, de alguna manera, puede intervenir en la respuesta inmune que se monta contra el parásito en las primera etapas de su desarrollo en dicho tejido.

3) Comparación entre resistente y susceptible.

La incorporación de BrdU que presentó cada grupo, susceptible y resistente, fue diferente, con significancia estadística, uno con respecto al otro; ya que dicha incorporación resulta más intensa en mosquitos resistentes a la infección por *P. berghei*. Esto nos permite suponer que esta incorporación de BrdU está íntimamente ligada a una fuerte respuesta inmune que desarrolla el mosquito para evitar la infección por el parásito.

PERSPECTIVAS

Con los resultados mostrados como antecedente sería interesante realizar investigaciones acerca de los mecanismos de señalización que induce esta síntesis, así como las moléculas que participan durante su activación con la finalidad de determinar el mecanismo preciso que conlleva a esta síntesis de DNA.

Mediante el transcriptoma, proteoma o péptidoma, se podrían investigar las moléculas que se están amplificando en este fenómeno de endorreplicación ante distintos retos microbianos, entre ellos, por supuesto, el parásito de *Plasmodium*.

El contar cepas susceptibles y resistentes de *An. albimanus* a *P. berghei* nos permitirá por un lado, determinar la o las moléculas responsables de la susceptibilidad al parásito y el papel de la endoreplicación en la eliminación del parásito, así como analizar lo los genes amplificados durante este fenómeno biológico.

La autora de esta tesis, QFB María Isabel Martínez Villa, fue becaria de CONACyT con número de registro 239430; y agradece el apoyo otorgado por los proyectos con número 62389 y 83287 otorgados por el CONACyT al grupo de trabajo del que formo parte.

Referencias

- Beckage NE. Insect immunology. Elsevier. 2008: p 1-23.
- Beier JC. Malaria Control in the Highlands of Burundi: An Important Success Story. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2008; 79(1): 1–2.
- Beire JC. Malaria parasite development in mosquitoes. Annu. Rev. Entomol. 1998; 43:519–43
- Botchan M. and Levine, M. A genome analysis of endoreplication in the *Drosophila* ovary. Dev. Cell. 2004; 6: 4-5
- Breman J. "The ears of the hippopotamus: manifestations, determinants, and estimates of the malaria burden." Am J Trop Med Hyg. 2001; 64: 1-11.
- Brey, P. T., Lee, W. J., Yamakawa, M., Koizumi, Y., Perrot, S., Francois, M. and Ashida, M. Role of the integument in insect immunity, epicuticular abrasion and induction of cecropin synthesis in cuticular epithelial cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993; 9: 6275-6279.
- Bulet, P., Hetru, C., Dimarcq, J. L. and Hoffmann, D. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. Dev. Comp. Immunol. 1999; 23: 329-344.
- Canning EU, Sinden REE. The organization of the ookinete and observations on nuclear division in oocysts of *Plasmodium berghei*. Parasitology. 1973; 67: 29–40
- Carpenter SJ, LaCasse WJ. Mosquitoes of North America (North of Mexico). Berkeley: University of California Press. 1955
- Carter R, Nijhout MN. Control of gamete formation (exflagellation) in malaria parasites. Science. 1977; 195:407–9

Catteruccia F, Nolan T, Loukeris TG, Blass C, Savakis C, Kafatos FC, Crisanti A. Stable germline transformation of the malaria mosquito *Anopheles stephensi*. Nature, 2000; 405:959-962

Center for Disease Control and Prevention. Malaria Facts. USA: CDC Inc, 2007.

Chavatte JM, Chiron F, Chabaud A, Landau I. Probable speciations by "host-vector 'fidelisation'": 14 species of Plasmodium from Magpies. Parasite. 2007; 14(1):21-37

Christensen BM, Li J, Chen C, Nappi AJ. Melanization immune responses in mosquito vectors. TRENDS in Parasitology. 2005; .21: 192-199.

Christophides GK, Vlachou D, Kafatos FC. Comparative and functional genomics of the innate immune system in the malaria vector *Anopheles gambiae*. Immunol Rev 2004; 198:127–148.

Claycomb JM, Benasutti M, Bosco G, Fenger DD, Orr-Weaver TL. Gene amplification as a developmental strategy: isolation of two developmental amplicons in Drosophila. Dev. Cell. 2004; 6(1): 145-155.

Claycomb JM, Orr-Weaver TL. Developmental gene amplification: insights into DNA replication and gene expression. Trends Genet. 2005; 21(3): 149-162.

Conly GN. La Erradicación de la Malaria como Factor en la Reducción de las Defunciones Tempranas. Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana. Octubre 1964.

De Haro I, Salazar P, Cabrera M. Diagnóstico morfológico de las parasitosis. Mendez Editores. 2ª. edición. México, 2002. 60-68 pp.

Dimopolous G, Christophides GK, Meister S, Schultz J, White KP, Barillas-Mury C, Kafatos FC. Genome expression analysis of *Anopheles gambiae*: responses to injury, bacterial challenge, and malaria infection. Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99:8814-8819.

- Dittmann F, Kogan PH, Hagedorn H. Ploidy levels and DNA synthesis in fat body cells of the adult mosquito, *Aedes aegypti*: The role of juvenile hormone. Arch Insect Biochem Physiol. 1989; 12: 133-143.
- Du Pasquier L, Flajnik M. Origin and evolution of the vertebrate immune system. In: Paul WE, editor. Fundamental immunology. Philadelphia: Lippincott-Raven. 1999; 605-650.
- Edgar BA, Orr-Weaver TL. Endoreplication cell cycles: more for less. Cell. 2001;105: 297-306
- González PD. Nuevas dianas terapéuticas para el tratamiento de la malaria. Enf Emerg 2005; 7(1): 40-43.
- Greenwood BM, Bojang K, Whitty CJ, Targett GA. Malaria. *Lancet*. 2005; 365: 1487-1498.
- Guidelines for the treatment of malaria. Second edition. Health Organization 2010.
- Hay S, Guerra C, Tatem A, Noor A, Snow R. The global distribution and population at risk of malaria: past, present, and future. *Lancet Infect Dis*. 2004; 4 (6): 327-36.
- Hernández-Avila JE. Determinant factors for malaria transmission on the coast of Oaxaca State, the main residual transmission focus in Mexico. Salud Pública de México; 2006.
- Hernández, S.; Lanz, H.; Rodríguez M.H.; González-Ceron, L.; and Tsutsumi, V. Cellular-mediated reactions to foreign particles inoculated into the hemocoel of *Anopheles albimanus* (Diptera:Culicidae). J. Medical Entomolgy. 2002; 39: 61-69.
- Hernández-Martínez S, Román-Martínez U, Martínez-Bartneche J, Rodríguez M, and Lanz-Mendoza H. Induction of DNA synthesis in *Anopheles albimanus*

- tissue cultures by *Saccharomyces cerevisiae*. Arch Insect Biochem Physiol. 2006; 63: 147-158.
- Herrera-Ortiz A, Martínez-Barnette J, Hernández-Martínez S, Villarreal Treviño C, Aguilar-Marcelino L, Rodríguez MH, Lanz-Mendoza H. *Plasmodium berghei* ookinetes induce nitric oxide production in *Anopheles pseudopunctipennis* midguts cultured in vitro. Insect Biochem Mol Biol 2004. 34:893–901.
- Hoffman JA, Kafatos FC, Jr Janeway CA, Ezekowitz RAB. Phylogenetic perspectives in innate immunity. Science 1999; 284: 1313-1318.
- Iqbal J, Khalid N, Hira PR. Comparison of two commercial assays with expert microscopy for confirmation of symptomatically diagnosed malaria. J Clin Microbiol. 2002; 40: 4675-8.
- Joy D, Feng X, Mu J, et al. Early origin and recent expansion of *Plasmodium falciparum*. Science. 2003; 300 (5617): 318-21.
- Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. Diagnóstico microbiológico. Ed médica Panamericana. 5a. edición. España, 2001. pp1092-1093.
- Kumar S, Christophides G, Cantera R, Charles B, Han YS, Meister S, Dimopoulos G, Kafatos FC, Barillas-Mury C. The role of reactive oxygen species on *Plasmodium melanotic* encapsulation in *Anopheles gambiae*. PNAS. 2003; 100 (24):14139–14144
- Lanz-Mendoza H, Hernández-Martínez S, Ku-López M, Rodríguez MC, Herrera-Ortiz A, and Rodríguez MH. Superoxide anion in *Anopheles albimanus* hemolymph and midgut is toxic to *Plasmodium berghuei* ookinetes. J. Parasitol. 2002; 88: 702-706.
- Lavine MD, Strand MR. Insect hemocytes and their role in immunity. Insect Biochemistry and Molecular Biology. 2002; 32: 1295–1309

- Lengronne A *et al.* Monitoring S phase progression globally and locally using BrdU incorporation in TK(+) yeast strains. *Nucleic Acids*. 2001; 29(7):1433-42.
- Levashina EA, Moita LF, Blandin S, Vriend G, Lagueux M, Kafatos FC. Conserved role of a complement-like protein in phagocytosis revealed by dsRNA knockout in cultured cells of the mosquito, *Anopheles gambiae*. *Cell*. 2001; 104: 709-718.
- Luckhart S, Crampton AL, Zamora R, Lieber MJ, Dos Santos PC, Peterson TML, Emmith N, Lim J, Wink DA, Vodovotz Y. Mammalian transforming growth factor β 1 activated after ingestion by *Anopheles stephensi* modulates mosquito immunity. *Infect Immun* 2003; 71: 3000-3009.
- Luckhart S, Vodovotz Y, Cui L, Rosenberg R. The mosquito *Anopheles stephensi* limits malaria parasite development with inducible synthesis of nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 5700-5705.
- Meister, M., Lemaitre, B. and Hoffmann, J. A. Antimicrobial peptide defense in *Drosophila*. *BioEssays*. 1997; 19: 1019-1026.
- Nappi AJ, Christensen BM. Melanogenesis and associated cytotoxic reactions: Applications to insect innate immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 2005; 35: 443–459
- Park SY, Asano M. The origin recognition complex is dispensable for endoreplication in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2008; 105(34): 12343-12348.
- Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1998 October 29; 353(1376): 1695–1699.
- Ramet M, Manfrulli P, Pearson A, Mathey-Prevot B, Ezekowitz RA. Functional genomic analysis of phagocytosis and identification of a *Drosophila* receptor for *E. coli*. *Nature*. 2002; 416: 644-648.

- Ramos-Garcia C. Factores determinantes en la endemicidad de las enfermedades transmitidas por vector. *Salud Publica Mex* 2007; 49 (1):112-113.
- Report on the situation of Malaria in the Americas, 2008. Pan American Health Organization, 2010.
- Richman, A. M., Dimopoulos, G., Seeley, D. and Kafatos, F. C. *Plasmodium* activates the innate immune response of *Anopheles gambiae* mosquitoes. *EMBO J.* 1997; 16, 6114-6119.
- Rodriguez-Gutierrez MC. El desarrollo de nuevas estrategias de intervención para las ETV. *Salud Publica Mex* 2007; 49 (1): 255.
- Rodríguez-López MH. Avances en el desarrollo de vacunas contra la malaria. *Rev Biomed* . 2008; 19:61-79
- Rodríguez-López MH. Avances en el desarrollo de vacunas contra la malaria. *Rev Biomed* 2008; 19: 61-79.
- Rodriguez-Morales AJ, Sanchez E, Vargas M, Piccolo C, Colina R, Arria M, Franco-Paredes C. Pregnancy outcomes associated with *Plasmodium vivax* malaria in northeastern Venezuela. *Am J Trop Med Hyg.* 2006; 74: 755-757.
- Roncalli AR. The history of Italian parasitology. *Veterinary Parasitology.* 2001; 98: 3–30.
- Sanders, HR, Foy BD, et al. Sindbis virus induces transport processes and alters expression of innate immunity pathway genes in the midgut of the disease vector, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol* 2005; 35: 1293-307.
- Shahabuddin M, Toyoshima T, Aikawa M, Kaslow DC. Transmission blocking activity of a chitinase inhibitor activation of malarial parasite chitinase by a mosquito protease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993; 90:4266–70
- Sinden RE. The cell biology of sexual development in *Plasmodium*. *Parasitology.* 1983; 86(4):7–28

- Smith AV, Orr-Weaver TL. The regulation of the cell cycle during *Drosophila* embryogenesis-the transition to polyteny. *Development* 1991;112: 997-1008.
- Tay J, Velasco O, Lara R, Gutierrez M. *Parasitología médica*. Mendez editores. 7^a. edición. México. 2002. pp 170-176.
- Taylor TE, Strickland. *Malaria*. Hunter's tropical medicine and emerging infectious diseases. 8th ed. Philadelphia: WB Saunders; 2000. p. 614-43.
- Tzou P, Reichhart JM, Lemaitre B. Constitutive expression of a single antimicrobial peptide can restore wildtype resistance to infection in immunodeficient *Drosophila* mutants. *Proc Natl Acad Sci* . 2002; 99:2152.2157.
- Vaughan JA, Noden BH, Beier JC. Sporogonic development of cultured *Plasmodium falciparum* in six species of laboratory-reared *Anopheles* mosquitoes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1994; 51:233–43
- Vivier, E., and Malissen, B. Innate and adaptive immunity: Specificities and signaling hierarchies revisited. *Nat. Immunol.*2005; 6, 17–21.
- World Malaria Report 2010. World Health Organization 2010.

APENDICES.

1. Buffer de lisis.

La mezcla de los reactivos para el amortiguador se prepara a temperatura ambiente en agua destilada se ajusta el pH a 8.0 con NaOH IN a las siguientes concentraciones:

- 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, stock 2M en agua destilada
- 25 mM EDTA, stock 100 mM en agua destilada
- 100 mM NaCl, stock 5M en agua destilada
- 0.5% de SDS, stock 10% disuelto en agua destilada

Esta mezcla se conserva a temperatura ambiente. Añadir en hielo y sólo antes de usarse 1 mg/ml proteinasa K.

2. Amortiguador de carbonatos 0.1 M

- Disolver en 80 ml de agua destilada lo siguiente
 - 0.136 gr de carbonato de sodio
 - 0.735 gr bicarbonato de sodio
- Ajuste el pH a 9.2 con HCl o con NaOH
- Ajustar el volumen a 100 ml con agua destilada adicional

3. ELISA Wash 20X

La solución ELISA Wash 1X es preparada a partir de este stock.

- Disolver en 80 ml de agua destilada lo siguiente
 - 0.5125 gr de NaH₂PO₄
 - 2.3125 gr de Na₂HPO₄
- Añadir al final 17.525 gr y 1ml de Tween 20
- Checar el pH 7.2-7.4
- Ajustar el volumen a 100 ml con agua destilada adicional

4. Preparación de Orto-Fenil-Diamina (OPD) para el ensayo de ELISA

Se agregan 6 mg de OPD en 12 ml de amortiguador de citratos, o en caso de presentarse en tabletas añadir 1 tableta a mismo volumen del amortiguador de citratos.

Antes de usarse añadir 120 μ l de H₂O₂ al 3% para tener una concentración final del 0.03%. Mantener protegido de la luz.