



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**“Análisis proteómico del intestino del mosquito
Aedes aegypti durante la hematofagia”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

PRESENTA:

JUAN ANTONIO GARIBAY GARCÍA

DIRECTOR DE TESIS: DR. PAVEL SIERRA MARTINEZ
CODIRECTOR DE TESIS: DR. FIDEL DE LA CRUZ HERNANDEZ
HERNANDEZ

CHILPANCINGO, GRO., ENERO DEL 2009.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

APROBACIÓN DE TESIS

En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 4 días del mes de septiembre de dos mil ocho, se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado de la Maestría en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada “**Análisis proteómico del intestino del mosquito *Aedes aegypti* durante la hematofagia**”, presentada por el alumno Juan Antonio Garibay García, para obtener el Grado de **Maestría en Ciencias Biomédicas**. Después del análisis correspondiente, los miembros del comité manifiestan su aprobación de la tesis, autorizan la impresión final de la misma y aceptan que, cuando se satisfagan los requisitos señalados en el Reglamento General de Estudios de Posgrado e Investigación Vigente, se proceda a la presentación del examen de grado.

El Comité Tutorial

Dr. Pavel Sierra Martínez
Dirección de tesis

Dr. Donaciano Flores Robles

Dr. Marco Antonio Leyva Vázquez

Dra. Mónica Espinoza Rojo

Dr. Fidel de la Cruz Hernández

Vo. Bo

Dra. Berenice Illades Aguiar
Coordinadora de la Maestría en Ciencias
Biomédicas

Vo. Bo

Dr. Alfonso Bernabé Carreño
Director de la Unidad Académica de Ciencias
Químico Biológicas



TITULO:

Análisis proteómico del intestino del mosquito

***Aedes aegypti* durante la hematofagia**

ÍNDICE

PÁGINA

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
MATERIAL Y MÉTODOS	8
RESULTADOS	12
DISCUSIÓN	30
CONCLUSIONES	41
REFERENCIAS	42

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Entomología Molecular del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), México, Distrito Federal, México.

Bajo la dirección del

Dr. Pável Sierra Martínez

y la codirección del

Dr. Fidel de la Cruz Hernández Hernández

La asesoría de

Dra. Mónica Espinoza Rojo

Dr. Donaciano Flores Robles

Dr. Marco Antonio Leyva Vázquez

Durante el periodo que se cursó la maestría, el C. Juan Antonio Garibay García recibió apoyo económico CONACYT.

Así se agradece al Banco Santander Serfin por otorgar la Beca de Movilidad Santander Universia durante el periodo Agosto 2008 – Enero 2009.

El trabajo de investigación se realizó con el financiamiento CONACYT “Análisis y caracterización de los mecanismos de amplificación genética en la respuesta inmune de mosquitos vectores de paludismo y dengue” No 62389.

AGRADECIMIENTOS

Dr. Fidel de la Cruz Hernández Hernández, por permitirme ingresar a su laboratorio y por lo tanto pertenecer a su gran equipo de trabajo. Por su confianza en este trabajo, sus sabios consejos, su entusiasmo, por el gran apoyo y ser un gran amigo. Por ayudarme a conocer este interesante campo de los mosquitos y por lo tanto enamorarme de estos insectos. Por último, por ser una piedra angular en mi formación personal y académica.

Dr. Humberto Lanz-Mendoza y Lic. Felipe Chávez, por su apoyo en la crianza y por brindarme el material esencial para este trabajo de investigación: los mosquitos *Aedes aegypti*.

Dra. Febe Elena Cázares Raga, por su valioso apoyo en la realización de las técnicas, compartir conmigo sus conocimientos, sabiduría, por sus excelentes consejos, esos regaños que nunca olvidaré, su enorme paciencia y por brindarme su valiosa amistad.

Sr. Fernando Medina, por proporcionarme las células C6/36 utilizadas para la extracción de membranas celulares.

Biol. Exp. Leticia Cortés Martínez, por el gran apoyo durante la realización de esta tesis, sus valiosos consejos y por su gran amistad.

Sr. Juan García, por brindarme el apoyo durante la realización del trabajo de tesis, sus grandes consejos y su amistad incondicional.

Dr. Pável Sierra Martínez, por haberme permitido conocer este hermoso tema de investigación, por su amistad y por sus valiosas aportaciones.

Dra. Mónica Espinoza Rojo, Dr. Donaciano Flores Robles y Dr. Marco Antonio Leyva Vázquez, por sus valiosas aportaciones para la realización de este trabajo de investigación.

DEDICATORIA

A partir del mes de Agosto del 2006 emprendí un camino muy largo y difícil me refiero a la maestría, sin embargo, me considero muy afortunado porque siempre, en todo momento he tenido a mis padres **Sinecio Garibay Cerdenares** y **Celia García Encarnación**, les agradezco infinitamente el hecho de haber estado en todo momento conmigo, en esos momentos difíciles, no sé como agradecerles. También es importante aquella persona que te recuerda todo momento que sigues siendo un mortal, le agradezco a mi hermano **Omar Arturo Garibay García** por ser la persona que me baja de la nube en todo momento. Una persona que es muy importante es mi novia **Viridiana Morales Gómez**, es sin duda, la persona que ha estado en las buenas, en las malas y en las peores, es la razón de mí existir. Cuando entré a la maestría, ingresé junto a 14 grandes personas: **Ana Lilia, Claudia, Irma, Paola, Blanquita, Yuliana, Dianita, Dino, Olga, Rubén, Beto, Juan Pablo y Pedro**, que fuimos cómplices de estos 2 años llenos de trabajo, momentos gratos y difíciles, les agradezco su amistad y permitirme entrar en sus vidas. Una decisión muy importante en estos 2 años fue el realizar la tesis fuera de Chilpancingo, fue un momento muy difícil, sin embargo, he sido muy afortunado, y conocí a un gran jefe como es el **Dr. Fidel de la Cruz**, una gran persona que confió en mi en todo momento, también a la **Dra. Febe, Lety, Sr. Juan, Fernando, Alejandra, Lorena, Monika, Beto, Jessy, Moni Hernandez, Oscar, Ceci, Elizabeth, Alma, Kika** por ser mi segunda familia, por estar ahí en ese momento cuando más lo necesité, por su amistad, apoyo, cariño y sobre todo por compartir con ustedes los mejores años de mi vida. Y a todos mis amigos, familiares, que no los menciono por causas que la hoja me impide, no obstante, los llevo en mi corazón y siempre formarán parte de mi vida.

MUCHAS GRACIAS!!!

TOÑO

I. RESUMEN

Objetivos. El propósito del trabajo fue identificar proteínas del estómago de *Ae. aegypti*, cuya expresión se modifique por la hematofagia y otras que sean constituyentes de las membranas celulares. **Material y métodos.** Estómagos de mosquitos *Ae. aegypti* hembra alimentados con azúcar o sangre se disectaron a diferentes tiempos post-alimentación, las proteínas totales y las de preparaciones enriquecidas en membranas se analizaron por PAGE-SDS y su actividad proteolítica mediante zimografía. **Resultados.** Las diferencias radicaron en una banda que cambió su expresión durante la hematofagia. Cinco bandas de fracciones de membranas se identificaron por espectrometría de masas. En las proteínas de los estómagos alimentados con azúcar se encontraron siete bandas propias de esta condición. En las proteínas de estómagos a las seis y nueve horas después de alimentarse con sangre se observaron ocho bandas que aumentaron su concentración, cinco bandas presentes en todos los tiempos y tres bandas presentes en estómagos con azúcar que incrementaron su concentración a tiempos largos después de alimentarse con sangre. Una banda de 40 kDa que apareció después de la alimentación con sangre e incrementó su concentración hasta las nueve horas se identificó como Serpina-4, homóloga a las de *D. melanogaster* y *An. gambiae*. En los zimogramas para revelar proteasas en los estómagos alimentados con azúcar se observaron dos bandas de 45 y 35 kDa, entre una y seis horas post alimentación con sangre se observaron cuatro bandas, entre 12 y 24 h se presentaron múltiples bandas que disminuyeron a las 48 y 72 h. De las proteínas membranales se seleccionaron cinco bandas que se identificaron como sacaropina deshidrogenasa, α -amilasa, chaperonina-60 kDa, Hidroxibutirato CoA-transferasa y actina. **Conclusiones.** En el estómago de *Ae. aegypti* se identificó a la Serpina-4 como una proteína que modifica su expresión por hematofagia. En las membranas de las células del intestino se identificaron proteínas relacionadas con el catabolismo, metabolismo, estrés celular y citoesqueleto.

Palabras clave: *Aedes aegypti*, intestino, análisis proteómico, hematofagia.

II. ABSTRACT

Objectives. The purpose of this study was to identify proteins from the midgut of *Ae. aegypti*, whose expression is changed by the hematophagy and others that are constituents of cell membranes. **Materials and methods.** Midguts of mosquitoes *Ae. aegypti* blood – fed females and sugar – fed females dissect at different times post-feeding, and the total protein-enriched membrane preparations were analyzed by SDS-PAGE and its proteolytic activity by zymography. **Results** The differences lie in a band that changed his expression during the Hematophagy. Five bands of membrane fractions were identified by mass spectrometry In midguts sugar fed were detected seven bands characteristic of this condition. In midguts blood – fed at six and nine hours after eating blood were observed eight bands who increased their concentration, five bands present at all times and three bands present in midguts sugar-fed concentration increased to times long after eating with blood. A band of 40 kDa that appeared after feeding with blood and increased its concentration until nine hours was identified as Serpin-4, homologous to *D. melanogaster* and *An. gambiae*. In order to reveal the proteases by zymogrammes in the midgut sugar-fed observed two bands of 45 and 35 kDa, between one and six hours post-feeding blood were four bands, between 12 and 24 h were many bands that fell at 48 and 72 h. The membrane proteins were selected five bands who identified themselves as saccharopine dehydrogenase, α -amylase, chaperonina-60 kDa, hydroxybutyrate CoA-transferase and actin. **Conclusions.** In the midgut of *Ae. aegypti* was identified as the Serpin-4 a protein that modifies its expression by blood feeding. In the membranes of cells in the intestine were identified proteins related to catabolism, metabolism, cell stress and cytoskeleton.

Keywords: *Aedes aegypti*, midgut, proteomic analysis, hematophagy.

III. INTRODUCCIÓN

El mosquito *Aedes aegypti* es un vector efectivo del dengue, enfermedad causada por el virus DEN, miembro de la familia *Flaviviridae*, del cual se conocen cuatro serotipos (DENV 1 - 4) y causa en el hombre tanto el dengue clásico como la forma más severa, el dengue hemorrágico que puede finalizar en choque por dengue. Los mosquitos, tanto machos como hembras se alimentan de néctares, sin embargo las hembras requieren, además, al menos una comida de sangre (hematofagia) para obtener los nutrientes básicos para el desarrollo de progenie. Es durante la alimentación con sangre que la hembra adquiere al patógeno, en el caso de alimentarse de un huésped infectado y, a su vez, si el mosquito está infectado realiza la transmisión del agente patógeno.¹

Ae. aegypti presenta un sistema digestivo compuesto de tres regiones principales, que son el intestino anterior, medio y el posterior.² El intestino medio o estómago, esta compuesto de una monocapa de células epiteliales de tipo columnar que presentan una región apical con microvellosidades y otra basal en contacto con una matriz extracelular; fibras musculares, fibras nerviosas y traqueolas.^{2,3} Las funciones del estómago incluyen la secreción de enzimas digestivas y la absorción de nutrientes a partir de la sangre.² Este órgano está dividido en dos regiones, el estómago anterior y el posterior. En la región anterior se realiza la absorción de carbohidratos, las células de esta región presentan gran cantidad de microvellosidades, abundante retículo endoplásmico liso y un laberinto basal bien desarrollado. La región posterior está relacionada con la síntesis y secreción de enzimas proteolíticas, y con la absorción de productos de digestión de la sangre, las células de esta región presentan retículo endoplásmico rugoso bien desarrollado y una gran cantidad de mitocondrias.³ Entre los estómagos de machos y hembras existen diferencias que se relacionan con la conducta alimenticia, el estómago de la hembra es más grande que el del macho y cuando la hembra se alimenta de sangre las células del estómago sufren numerosos cambios morfológicos y bioquímicos.³⁻⁵

La sangre de los vertebrados esta formada, por suero y elementos formes, ambos con un alto contenido de proteínas, por lo que el estómago del mosquito requiere intensa actividad proteolítica para su digestión. Las enzimas proteolíticas pueden ser de dos tipos: endopeptidasas, que hidrolizan enlaces peptídicos en la parte interna de la cadena polipeptídica y las exopeptidasas que hidrolizan enlaces peptídicos al final o cerca del final de la cadena peptídica.⁶

En los mosquitos, la hematofagia induce la síntesis de endopeptidasas tipo tripsina, las cuales son enzimas del grupo de las serina proteasas, moléculas que tienen residuos de histidina y serina en el centro catalítico, las cuales son indispensables para su función. En *Ae. aegypti* se reportó que durante la digestión se sintetizan dos tipos de tripsina, la temprana y la tardía. En la primera fase, antes de la alimentación con sangre, existen pequeñas cantidades de la tripsina temprana y, a continuación de la alimentación con sangre, se induce su síntesis durante las siguientes 4 a 6 h, con la síntesis de esta enzima regulada a nivel traduccional. La segunda fase de la síntesis de enzimas está caracterizada por la presencia de grandes cantidades de tripsina tardía, cuya síntesis se realiza entre las 8 a 36 h después de la alimentación y a diferencia de la tripsina temprana, se regula de manera transcripcional.^{7, 8} En *An. gambiae* se describió que en el genoma están codificadas serina proteasas tipo tripsina que están codificadas por 7 genes (*Antryp1* – *Antryp7*), de las cuales se consideró que los productos de los genes *Antryp1* y *Antryp2* participan en la degradación de la sangre y se describió que la tripsina 1 está presente de manera constitutiva y la tripsina 2 es inducible.^{7, 9, 10}

Otra clase de serina proteasas inducidas por la alimentación con sangre que participan en la digestión, son las quimiotripsinas. La actividad de quimiotripsina se ha detectado en todos los anofelinos estudiados, incluyendo a *An. stephensi*, *An. albimanus* y *An. quadrimaculatus*. En estos géneros, se caracterizaron tres genes, dos de estos *anchym1* y *anchym2* son expresados en el estómago 12 h post-alimentación y sus transcritos son abundantes hasta las 48 h, a diferencia de los niveles de las tripsinas 1 y 2, que disminuyen dramáticamente en estas horas.

También existe otra quimiotripsina, AgChyL, exhibe cambios en los niveles de transcripción muy similares a las tripsinas. Estudios en *An. gambiae* sugieren que tanto las tripsinas como las quimiotripsinas, son componentes de una cascada de zimógenos.¹⁰ En la especie *Ae. aegypti*, Jiang *et al.* en el año de 1997¹¹ describieron un cDNA de quimiotripsina que se induce por la alimentación con sangre, esta secuencia codifica para una proteína de 268 aminoácidos, presenta las características de estas proteasas y tiene una secuencia señal. El RNAm que codifica para esta molécula tiene su nivel mínimo a las 24 h post-emergencia y alcanza el máximo dentro de los 3 a 7 días después de emerger. La traducción del gen es inducida por una alimentación rica en proteínas, manteniendo los niveles de proteína durante el proceso de digestión.

En el estómago de los mosquitos también se encuentran exopeptidasas, las cuales se clasifican con base al sitio donde hidrolizan los enlaces peptídicos, en aminopeptidasas o carboxipeptidasas. Las aminopeptidasas hidrolizan aminoácidos únicos en el extremo N-terminal de la cadena peptídica y están clasificadas por la especificidad a sus sustratos o por la dependencia a iones metálicos como Zn^{2+} o Mn^{2+} . Por otro lado, las carboxipeptidasas hidrolizan al aminoácido situado en el extremo C-terminal de la cadena peptídica de su sustrato y se dividen en tres clases con base a su mecanismo catalítico: a) *serina carboxipeptidasas*, las cuales son más activas a pH ácido y poseen una serina en su sitio activo, b) *metalo-carboxipeptidasas*, que usan cationes divalentes, usualmente Zn^{2+} para su actividad, c) *cisteina carboxipeptidasas* que son inhibidas por reactivos que bloquean los grupos tiol.^{12, 13}

Después de una ingesta de sangre, las células epiteliales del estómago secretan una matriz peritrófica (PM) que es una capa acelular que cubre el bolo alimenticio, facilitando la digestión de la sangre realizada por las enzimas proteolíticas secretadas, se ha observado que esta estructura regula el transporte de las enzimas digestivas.¹⁴ Diversos autores han propuesto que la PM protege a las células del daño producido por partículas que se incorporan en el alimento como virus,

bacterias, toxinas y otras macromoléculas. Esta matriz está compuesta de quitina, proteínas y proteoglicanos. En los insectos existen dos tipos de matriz peritrófica: la de tipo 1, la cual es gruesa (usualmente de un grosor de 2 a 20 μm) y es secretada por la mayoría de las células epiteliales del estómago de insectos hematófagos. La secreción de la matriz tipo 1 es provocada por la distensión del epitelio estomacal que ocurre durante la alimentación con sangre. Los mosquitos forman una PM de tipo 1 después de la ingestión de sangre en tanto que durante su vida larval producen PM de tipo 2. La PM 2 es delgada (0.1 a 2 μm) es producida por las células del cardias, esta compuesta de proteínas, microfibrillas, además diversos estudios describen la presencia de lectinas en su estructura. Este organelo presenta una estructura similar a una manga a lo largo del tracto digestivo.¹⁵⁻¹⁷

Dentro de la arquitectura celular, la membrana plasmática es muy importante por su papel en la regulación de la homeostasis celular. En las células del estómago de los insectos esta estructura participa en numerosos procesos fisiológicos como la absorción de nutrientes, digestión, secreción de enzimas, transducción de señales y respuesta inmune por citar sólo algunas funciones, para realizar estas funciones se requiere de proteínas ancladas a la membrana. También es importante porque la membrana plasmática es el sitio de unión con los agentes infecciosos, como el virus dengue (DENV) y el virus del oeste del Nilo (WNV), entre otros.¹⁸⁻²¹ Por lo anteriormente expuesto existe la necesidad de identificar la población de las proteínas de la membrana del estómago de los mosquitos, tanto para describir las funciones que llevan a cabo en la fisiología como para identificar aquellas relacionadas con la adhesión del patógeno.

En la mayoría de los estudios que se han realizado acerca de la biología del mosquito, se han caracterizado moléculas individuales pero, actualmente, como consecuencia del avance de las metodologías de análisis de moléculas, como las usadas para obtener la secuenciación de los genomas de *An. gambiae* y de *Ae. aegypti*, se desarrollaron tecnologías que permiten el análisis simultáneo de un conjunto de moléculas (métodos de alto rendimiento) y la generación de bases de

datos con secuencias tomadas al azar o bien de todo el contenido de DNA de la célula (genómica). Por extensión, al análisis simultáneo de un conjunto de proteínas se le llama proteómica. Al correlacionar la información de las diferentes bases de datos de secuencias de DNA, mensajeros y proteínas de una célula se logrará comprender la función de la maquinaria celular. Para realizar el análisis proteómico se debe contar básicamente con técnicas que nos permitan separar las proteínas eficientemente, para lo que se aplican principalmente las técnicas de electroforesis uni y bidimensionales o de cromatografía líquida; una vez separadas, identificarlas mediante espectrometría de masas. Entre los métodos de espectrometría de masas más utilizados actualmente están el MALDI (ionización/desabsorción por láser de muestras incluidas en una matriz) y el ESI (ionización en electrospray); en ambas técnicas los iones sufren fragmentación, sin embargo la diferencia radica en la forma de tratar la muestra para la generación de iones. Una vez generados los iones, estos se separan (se filtran) mediante varios sistemas de espectrometría de masas (MS) que incluyen 4 formas de analizar las masas: tiempo de vuelo (time of flight, TOF), trampa de iones (ion trap), cuadrupolo (quadrupole) y los analizadores de resonancia de iones en un ciclotrón mediante transformaciones de Fourier (FTICR). Estos métodos, difieren en sensibilidad, resolución, exactitud de la medida de las masas y la posible fragmentación de iones. Existen variantes de estos métodos que permiten cuantificar los cambios en cantidad en las proteínas obtenidas en diferentes condiciones, o en sus modificaciones post-traduccionales.²²⁻²⁴

En el estómago del mosquito *Ae. aegypti*, se han descrito hasta el momento varias proteínas como las tripsinas y quimiotripsinas que participan en el proceso de digestión de la sangre, sin embargo, aun existen numerosas proteínas no caracterizadas que sufren cambios en su expresión y que participan en la digestión de la sangre, absorción de nutrientes, activación de la respuesta inmune o producción de hormonas, por mencionar sólo algunas. Entre éstas proteínas las de la membrana plasmática del estómago son de particular importancia, debido a que existe una interacción entre la sangre, los posibles agentes infecciosos presentes en ella y la superficie celular. Por estas razones en este trabajo se identificaron,

mediante estrategias proteómicas, por una parte moléculas de las células intestinales del mosquito *Ae. aegypti*, que cambian en su cantidad durante el manejo de la sangre y por otra parte las de la membrana plasmática debido a que el conocimiento de las moléculas que se modifican durante la hematofagia, así como las proteínas de la membrana plasmática ayudará a comprender la fisiología de la hematofagia, las interacciones del vector con su huésped y con los posibles agentes infecciosos con los que puede estar en contacto.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

Mosquitos. Los mosquitos *Ae. aegypti* de la cepa Cuernavaca fueron proporcionados por el Insectario del Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas del Instituto Nacional de Salud Pública (CISEI-INSP). Los mosquitos fueron alimentados con solución azucarada al 10%. Para los experimentos se usaron hembras adultas de 4 a 5 días post-emergencia. Cuando fue necesario, los mosquitos se dejaron en ayuno por 12h y posteriormente se alimentaron con sangre de ratón y se sacrificaron a diferentes tiempos (1, 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48 y 72 h), descartando los que no se alimentaron.

Disección de estómagos de mosquitos *Ae. aegypti* alimentados con azúcar y con sangre. La disección de los estómagos de mosquitos *Ae. aegypti* alimentados con azúcar se realizó de la siguiente manera: los mosquitos se inmovilizaron a 4°C y se mantuvieron en una caja de Petri, sobre un recipiente con hielo. En un portaobjetos se colocó una gota de PBS 1X pH 7.4 y en ella un mosquito. Mediante el uso de agujas de disección, y bajo el microscopio estereoscópico, se sujetó al mosquito del tórax y se jaló suavemente desde el 4^o segmento abdominal descubriendo el aparato digestivo al cual se le realizaron cortes para separar el intestino medio de los intestinos anterior y posterior, y se eliminaron los túbulos de Malpighi. Los estómagos se colocaron en 30 µl de PBS 1X pH 7.4 adicionados de 20 µl de una solución concentrada de inhibidores de proteasas (PMSF 100mM, TPCK 10mM, TLCK 10mM, Leupeptina 10mM, NaVO₄ 100mM, NaF 100mM) y se almacenaron a -70°C hasta su uso. La disección de los estómagos de mosquitos

alimentados con sangre se realizó de manera similar, con la variación que al obtener el órgano con sangre, se le realizó un corte en los extremos para extraerle la sangre y se lavó en una gota aparte de PBS 1X pH 7.4 para eliminar los restos de sangre. Grupos de 200 estómagos se pusieron en 50 μ l de PBS 1X pH 7.4 e inhibidores de proteasas y se almacenaron a -70°C hasta su uso. Por otra parte, la sangre que se extrajo del estómago (contenido estomacal, CE) se guardó, en el mismo volumen de PBS 1X pH 7.4 e inhibidores de proteasas, a -70°C .

Extracción de proteínas totales de estómagos de *Ae. aegypti* alimentados con sangre. Para la extracción de proteínas totales de estómagos de *Ae. aegypti* alimentados con sangre, los órganos se disectaron a las 3, 6 y 9 horas post-alimentación con sangre (hPAS) como se describió anteriormente se homogenizaron por 5 min en un tubo Eppendorf con su pistilo de plástico. El extracto se centrifugó a 14,000g por 15 min a 4°C y el sobrenadante (SND) se colocó en un tubo limpio para microfuga de 1.5 ml para posteriormente analizarlo mediante geles PAGE-SDS al 12%.

Extracción de membranas plasmáticas de estómagos de *Ae. aegypti* alimentados con azúcar. Para la extracción de membranas se utilizaron 1800 estómagos de *Ae. aegypti* alimentados con azúcar, siguiendo el procedimiento: todos los recipientes y soluciones se mantuvieron todo el tiempo en un baño de hielo. Los estómagos se rompieron inicialmente en un tubo Eppendorf con un pistilo homogenizador de plástico de tamaño compatible, dando golpes durante 5 minutos. Posteriormente se completó la homogenización con un sonicador (High intensity ultrasonic processor 150 watts) dando 4 ciclos de 30 seg con descansos de 1 min. Posteriormente el extracto se sometió a centrifugación a 1,000xg por 10 min a 4°C , el SND se transfirió a otro tubo y se centrifugó a 10,000xg por 30 min. Del mismo modo, el SND resultante se transfirió a otro tubo, se centrifugó a 100,000xg por 60 min, la pastilla se lavó con PBS e inhibidores de proteasas y fosfatasas, se agitó en vórtex y se centrifugó a 100,000xg por 60 min, el SND se desechó y la pastilla se resuspendió

en un volumen adecuado de PBS e inhibidores de proteasas y se almacenó a -70°C hasta su uso.^{19, 25}

Cuantificación de proteínas. Las proteínas se cuantificaron utilizando el kit DC Protein Assay (Bio-Rad) basado en el método de Folin-Ciocalteu, y se utilizó un espectrofotómetro a 750 nm.²⁶

Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE-SDS). El análisis se realizó mediante la separación de proteínas por su peso molecular utilizando geles de poliacrilamida en presencia de duodecil-sulfato de sodio (PAGE-SDS) unidimensionales.²⁷ Para las proteínas de estómagos alimentados con sangre, se colocaron 150 estómagos de mosquitos *Ae. aegypti*, equivalente a aproximadamente 100 μg de proteína, mientras que para el caso de las membranas plasmáticas se colocaron aproximadamente 150 μg de proteína y se tiñeron con azul de Coomassie coloidal (G-250) o en su defecto con nitrato de plata. Para calcular el peso molecular de las proteínas, se utilizó un grupo de proteínas conocidas usadas como marcadores de peso molecular (Precision Plus Protein Dual Color Standards, Bio-Rad).

Análisis de la actividad de proteasas por zimogramas en geles SDS-PAGE. El análisis de la actividad de las proteasas se realizó por medio del método de zimografía en SDS-PAGE con geles al 12% copolimerizados con Gelatina al 0.2%. Para esto se disectaron estómagos y CE de hembras alimentadas con sangre a 1, 6, 12, 24, 36, 48 y 72 hPAS, las muestras de estómagos de mosquito *Ae. aegypti* se prepararon en PBS 1X pH. 7.4 en ausencia de inhibidores de proteasas. Las proteínas se separaron mediante electroforesis SDS-PAGE con la variante de que al preparar el gel separador, a la mezcla de polimerización se le añadió gelatina disuelta en agua caliente, la cual al final del procedimiento funciona como sustrato para las proteasas. Al término de la corrida, los geles se incubaron con Tritón X-100 2.5%(v/v) en agitación durante 2 h con dos cambios; luego se lavaron 3 veces con agua bidestilada; a continuación se incubaron en un buffer TED (Tris-Base 20 mM pH

7.6, EDTA 5 mM pH 8.0, Ditioneitol (DTT) 2mM) durante 16-24 h a 37°C. Después de la incubación los geles se lavaron con agua bidestilada y se tiñeron con azul de Coomassie (R-250).¹²

Identificación de las proteínas mediante espectrometría de masas (MS). Para la identificación de proteínas de interés resueltas por PAGE-SDS, se eligieron bandas que al ser teñidas con azul de Coomassie mostraran una concentración considerable y una presencia diferencial. Las bandas se cortaron con una navaja estéril, portando guantes para evitar contaminación, y la sección del gel se colocó en un tubo para microfuga de 1.5ml, se colocó una etiqueta, con el nombre de la banda, organismo y el órgano del que se obtuvo la muestra y se almacenaron a -20°C. Una banda de 40 kDa que aumentó su presencia por la hematofagia, se envió para su identificación por MALDI-TOF al Departamento de Biotecnología y Bioquímica del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN (C INVESTAV-IPN) Unidad Irapuato, con la Dra. Alicia Chagolla López. Las bandas obtenidas de las membranas celulares se trataron de la misma manera que la muestra anterior y se enviaron para su identificación mediante ESI-LC-MS/MS en el Columbia University Medical Center (New York, NY).

Análisis de resultados. El coeficiente carga/masa (m/z) obtenido por MALDI-TOF fue analizado utilizando bases de datos de *Ae. aegypti*, *An. gambiae* o *D. melanogaster* accesibles en los sitios del National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), San Diego Super Computer (SDSC) Biology Workbench (<http://workbench.sdsc.edu/>) y ExPASy Proteomics Server (<http://expasy.org/>). Por medio de ESI-LC-MS/MS se obtuvieron dos parámetros, los péptidos que conforman la proteína desconocida así como las masas de estos péptidos. Estos dos parámetros se comparan con péptidos obtenidos de bases de datos. Las proteínas identificadas se analizaron mediante el programa computacional MASCOT (<http://www.matrixscience.com/>).

V. RESULTADOS

Análisis comparativo de las proteínas totales de los estómagos de *Ae. aegypti* inducidos por la hematofagia. El estímulo causado por la alimentación con sangre indujo cambios en moléculas específicas de los estómagos de los mosquitos que fue posible observar mediante SDS-PAGE al 12%, a diferentes tiempos post-alimentación con sangre (hPAS).Fig.1.

En los estómagos alimentados con azúcar se observaron numerosas bandas desde más de 250 a menos de 10 kDa, siendo las de 200, 130, 55, 50, 35, 31 y 24 kDa las más abundantes. En el caso de las bandas presentes a las tres hPAS se observó que las de 200, 130, 70, 35, 31 y 24 kDa desaparecieron, en tanto que las de 28-26 kDa aumentaron. A las 6 y 9 hPAS, las proteínas de 100, 85, 73, 55, 36 y un doblete de 26 a 28 y una banda de 18 kDa, incrementaron aún más. También la alimentación con sangre motivó la aparición de bandas individuales en diferentes tiempos como las bandas de 78, 49, 36 kDa. Otras bandas de 45, 40 y 31 kDa están presentes en estómagos alimentados con azúcar, al alimentarse con sangre su presencia disminuye en tiempos tempranos pero incrementa a tiempos tardíos post-alimentación con sangre. Fig.1.

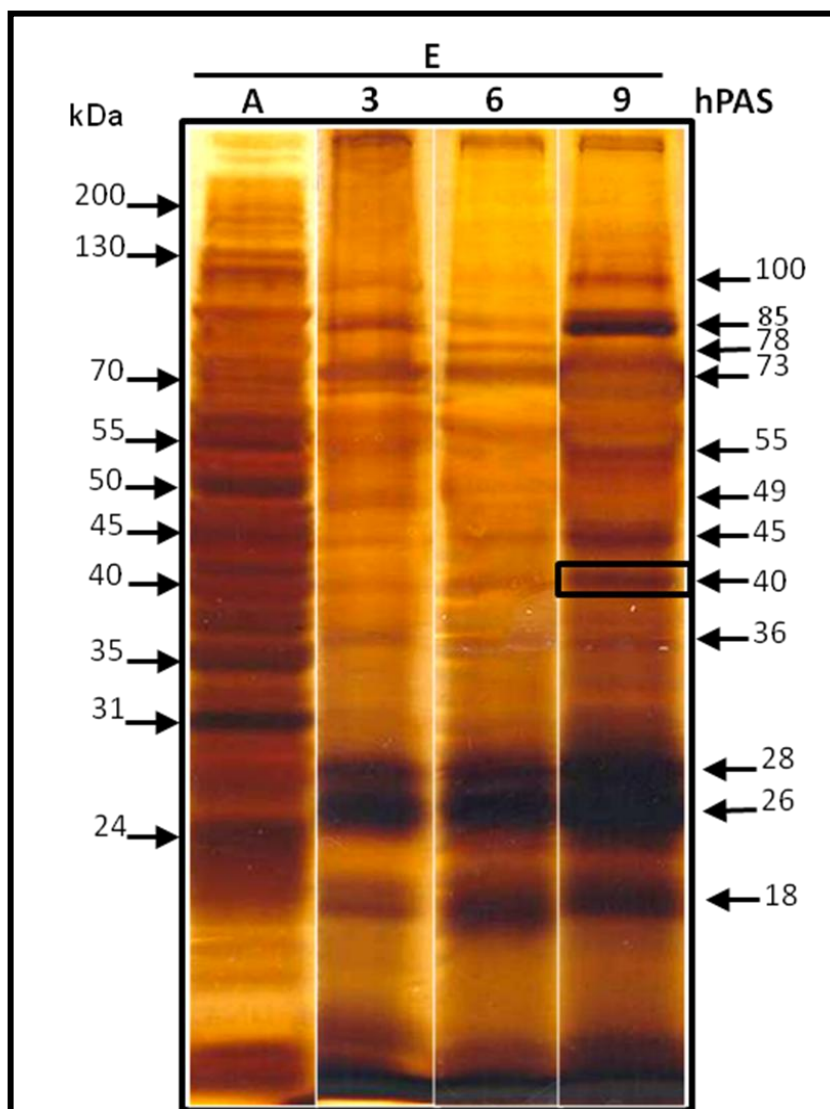


Fig.1. Proteínas totales de los estómagos de *Ae. aegypti* a distintos tiempos post-alimentación con sangre. Se obtuvieron las proteínas totales de estómagos de *Ae. aegypti* alimentados con azúcar (A). Proteínas totales de estómagos a distintos tiempos post-alimentación con sangre (3, 6 y 9 hPAS) a los que se les retiró el bolo, se resolvieron en gels de PAGE-SDS al 12% y se tiñeron con plata. Carril A. - Estómagos de *Ae. aegypti* alimentados con azúcar. Carril 3. Estómagos disectados 3 hPAS. Carril 6.- Estómagos disectados 6 hPAS. Carril 9. Estómagos disectados 9 hPAS. kDa, kilodaltones, las flechas del lado izquierdo indican proteínas presentes sólo en estómagos alimentados con azúcar y las del lado derecho las inducidas en los estómagos PAS. El rectángulo negro señala la banda enviada a espectrometría de masas.

Identificación de proteínas que modifican su presencia en los estómagos de *Ae. aegypti* durante la hematofagia. Un objetivo de este trabajo fue identificar mediante estrategias proteómicas, moléculas de los estómagos de *Ae. aegypti* que modifiquen su presencia por la alimentación con sangre. De las bandas observadas por PAGE-SDS que cumplieron con este criterio, se eligió la de 40 kDa, que aumentó a las 9 hPAS y se identificó mediante MALDI – TOF. Tabla No 1.

La banda de 40 kDa que se identificó fue un inhibidor de serina proteasas de *Ae. aegypti* (Serpina-4), proteína solo identificada *in silico* en este organismo. El posible ortólogo de *Drosophila melanogaster* se describió que participa en la regulación de la secreción de proteínas mediante la inhibición de la proproteín convertasa similar a la subtilisina (SPCs).²⁸⁻³⁰

Tabla No 1. Características de la proteína de 40 kDa identificada por MALDI-TOF .

Nombre	Familia	Gene ID	NCBI	PI	PM	Cobertura	Score
Serpina-4	Inhibidor de serina proteasa	5569575	108876283	5.84	43.47	31%	162

NCBI, número de acceso en National Center of Biotechnology Information

Gene ID: Identificación del gen en NCBI

PI, punto isoeléctrico

PM, peso molecular en kilodaltones (kDa)

Cobertura: % de aminoácidos presentes de la proteína desconocida en la proteína de la base de datos.

Score: Bit Score, coeficiente calculado a partir de los residuos idénticos (< de 80 se considera idéntico)

Análisis de las proteasas presentes en el estómago de *Ae. aegypti* durante el proceso de la hematofagia. Como parte de la identificación de moléculas que cambian durante la hematofagia de *Ae. aegypti*, se analizaron mediante SDS-PAGE al 12%, copolimerizado con gelatina, las proteasas presentes en el estómago y contenido estomacal (CE) antes y durante la hematofagia. Fig.2.

En los estómagos alimentados con azúcar, se observaron sólo dos bandas con actividad proteolítica de 45 y 35 kDa. En contraste, entre una y seis hPAS los estómagos presentaron varias bandas de actividad que incluyeron un triplete de 175,150 y 100 kDa, otra banda de 70 kDa que se mantuvo a las 6 hPAS una más de 45 kDa, se observó una región entre 45 y 35 kDa con al menos cuatro bandas de actividad proteolítica, y se observó poca actividad en la zona debajo de los 30 kDa. Entre las 12 y 24 hPAS se observó una banda de 100 kDa que se incrementó a las 24 hPAS y una intensa actividad en la región entre los 45 y 25 kDa con bandas de 35, 33, 30 y 20 kDa. En periodos más largos, entre 36 y 48 hPAS, se observó, en comparación a los tiempos anteriores, una actividad proteolítica menor en la zona por arriba de los 70 kDa, pero sigue siendo intensa en la zona entre los 70 y 30 kDa y a las 48 hPAS se observó una disminución en la actividad en la región menor a 30 kDa. A las 72 hPAS, baja la actividad con niveles parecidos a la de los estómagos alimentados con azúcar. En los contenidos estomacales (CE) se observó que al inicio del proceso hay muy baja actividad que aumenta entre una y seis hPAS, formándose el triplete de 175, 150 y 100 kDa y la banda de 70 kDa, similares a las observadas en los epitelios. A las seis hPAS se presentó actividad proteolítica debajo de los 30 kDa y entre los 50 y 25 kDa mientras que a las 12 hPAS esta actividad se incrementó. A las 12 hPAS, se observó actividad proteolítica en todo el rango entre 200 y 25 con más intensidad entre los 45 y 33 kDa, con una banda de 33 kDa que se mantuvo hasta las 24 hPAS. Después de las 24 h se apreció cualitativamente que la actividad total disminuyó. A partir de las 24hPAS la actividad se fue reduciendo a alrededor de cuatro bandas entre 40 y 33 kDa, que desaparecen a las 48 hPAS. Tanto en E y CE se observó que entre una y seis hPAS, aparecieron bandas oscuras de 50 y 33 kDa

que contrastaron con el fondo oscuro del gel y con las bandas claras de actividad proteolítica.

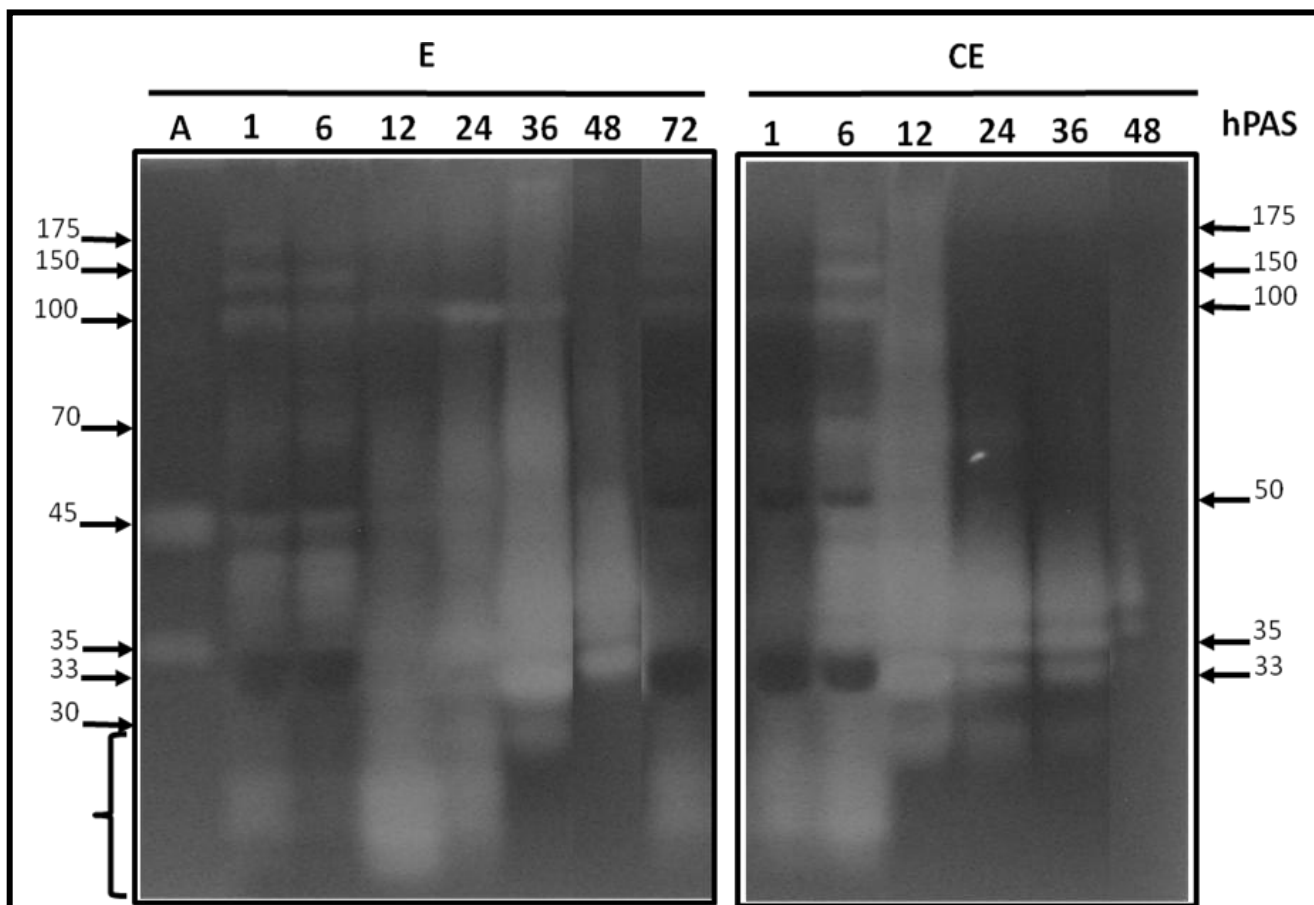


Fig.2. Proteasas del estómago de *Ae. aegypti* entre 1 a 72 hPAS. Para analizar las proteasas presentes se colocaron 15 estómagos (E) de *Ae. aegypti* y su respectivo contenido estomacal (CE), a diferentes tiempos post-alimentación con sangre. Las muestras tanto de los E como de los CE se almacenaron sin inhibidores de proteasas, se separaron mediante geles de PAGE-SDS al 12% copolimerizados con gelatina 0.2% y se tiñeron con azul de Coomassie (R-250). Las bandas con actividad proteolítica se observaron de color blanco sobre fondo azul. A, Estómagos alimentados con azúcar, hPAS, horas post-alimentación con sangre. El corchete, indica la región en la cual se espera la presencia de tripsinas y quimotripsinas.

Análisis proteómico de las membranas de las células intestinales del mosquito *Ae. aegypti* alimentado con azúcar. Para realizar un análisis proteómico de las membranas de las células del estómago del mosquito *Ae. aegypti* se realizó un fraccionamiento mediante centrifugación diferencial para separar los organelos a partir de los estómagos de *Ae. aegypti* alimentados con azúcar, siguiendo el método propuesto por Kotsyfakis *et al.* en el año 2005.²⁵ Con este procedimiento se obtuvieron cuatro muestras: un extracto total (ET), dos fracciones intermedias de centrifugación (S1 y S2) y la fracción enriquecida en membranas (MC). Las proteínas de las cuatro fracciones se separaron mediante PAGE-SDS al 12%. Fig.3.

En las preparaciones de membranas se observó que con el procedimiento de centrifugación diferencial se enriquecieron ocho bandas de 100, 64, 57, 48, 40, 34, 30 y 28 kDa y a las cinco de mayor peso molecular se les estudió mediante ESI-LC-MS/MS.

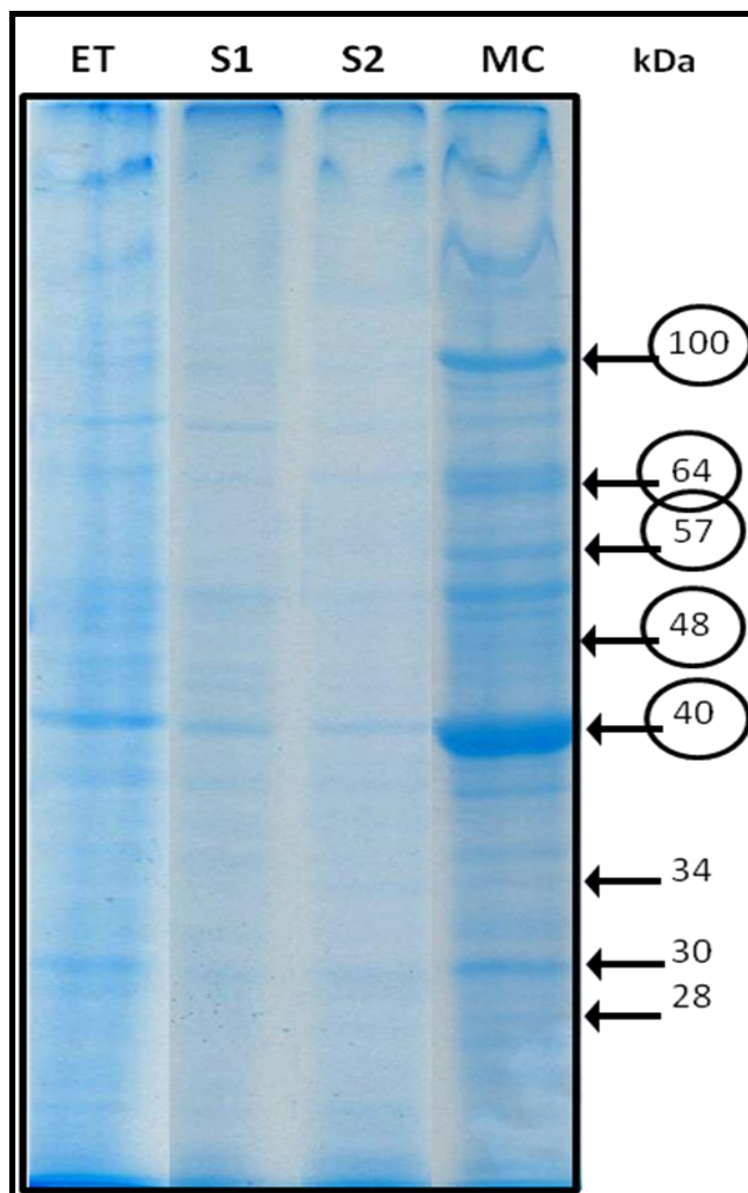


Fig.3. Análisis de las proteínas de la fracción enriquecida en membranas (MC) del estómago del mosquito *Ae. aegypti* alimentado con azúcar. Se obtuvo, mediante ultracentrifugación, una fracción enriquecida en membranas y tres intermedias del procedimiento, de las células del estómago de *Ae. aegypti*. Las fracciones fueron: extracto total (ET), sobrenadantes intermedios de centrifugación (S1 y S2) y las membranas celulares. Las proteínas de las fracciones se analizaron mediante PAGE -SDS al 12%, teñidas con azul de Coomassie (G-250). Las flechas indican las proteínas diferenciales y los óvalos, las proteínas enviadas a ESI-LC-MS/MS.

Identificación de las proteínas enriquecidas en las fracciones de membranas de las células de los estómagos de *Ae. aegypti*. Las bandas de 100, 64, 57, 48 y 40 kDa, son producto del proceso de enriquecimiento de moléculas de membranas celulares del estómago de *Ae. aegypti* mediante ultracentrifugación y separadas en geles de PAGE-SDS al 12%, fueron analizadas mediante ESI-LC-MS/MS. La identificación de las bandas por esta estrategia arrojó numerosas proteínas, no obstante, se enlistan sólo las proteínas con un valor de cobertura y score alto.

Proteínas identificadas para la banda de 100 kDa (MC100). Como uno de los objetivos de este trabajo de investigación, que es la identificación de moléculas de membranas celulares de estómagos de *Ae. aegypti*, se identificaron las proteínas indicadas para la banda de 100 kDa. En la tabla siguiente se enlistan las nueve proteínas que presentaron valor de cobertura y score alto. Tabla 2.

En la banda de 100 kDa se identificaron diecinueve proteínas, para este trabajo se enlistan las 9 primeras proteínas de acuerdo al porcentaje de cobertura y el score más alto, así también se discute la proteína con mayor valor de cobertura y score. En la banda de 100 kDa, la proteína que cumple con esta condición fue la sacaropina deshidrogenasa (SDH), enzima implicada en el catabolismo de la lisina. Esta molécula descrita principalmente en plantas, está presente en varias localizaciones e isoformas pero principalmente se encuentra a nivel de matriz mitocondrial, aunque también se ha descrito en citosol.³¹ Esta enzima participa en el catabolismo de la lisina para obtener como productos finales Acetil Co-A y Glutamato.^{32, 33}

Tabla 2. Identificación por ESI-LC-MS/MS de las proteínas presentes en la banda de 100 kDa

Nombre	P.I.*	P.M.£	Cobertura (%)	Mowse Score€	Organismo	Localización®
Sacaropina deshidrogenasa	6.37	102.7	65	1906	<i>Ae. aegypti</i>	Matriz mitocondrial
Alanil aminopeptidasa	5.15	107.1	25	873	<i>Ae. aegypti</i>	Citoplasma y membrana plasmática
Sacaropina deshidrogenasa	6.07	100.1	24	794	<i>An. gambiae</i>	Matriz mitocondrial
Precursor de Gelsolina	4.88	83.4	24	787	<i>Ae. aegypti</i>	Citoplasma
Subunidad α -na+/k+ atpasa	5.35	110.8	14	561	<i>Ae. aegypti</i>	Membrana plasmática
Factor 2 de elongación	5.99	94.3	18	550	<i>Ae. aegypti</i>	Citoplasma
Sacaropina deshidrogenasa	6.37	103.1	10	421	<i>D. pseudoobscura</i>	Matriz mitocondrial
2-oxoglutarato dehidrogenasa	6.42	114.0	5	216	<i>Ae. aegypti</i>	Membrana mitocondrial
Actina – 7	5.30	41.7	13	132	<i>D. melanogaster</i>	Citoplasma

*P.I. Punto isoeléctrico

£P.M. Peso molecular

%Cobertura, Porcentaje de aminoácidos presentes en los péptidos identificados por ESI/MS/MS y que se relacionan con las proteínas de la base de datos

€Mowse score, $-10 \times \log(P)$, donde P es la probabilidad de que la proteína obtenida sea un evento aleatorio

®Localización. Localización de la proteína en otros organismos.

Proteínas identificadas para la banda de 64 kDa (MC64). Se realizó la identificación mediante ESI-LC-MS/MS de proteínas presentes en membranas enriquecidas provenientes de estómagos de *Ae. aegypti*, en el caso de la banda de 64 kDa, a continuación se presentan nueve proteínas que presentaron valores de cobertura y score más altos. Tabla 3.

En el caso de la banda de 64 kDa, se identificaron 32 proteínas y solo se muestran las nueve proteínas que presentaron más alta cobertura y score. La proteína con los valores más altos fue para la α – amilasa, la cual forma parte de un grupo de enzimas presentes en microorganismos, plantas y mamíferos, que catalizan la hidrólisis de los enlaces glicosídicos (α 1-4) del almidón y varios oligosacáridos. En varios organismos se ha descrito la presencia de esta enzima a nivel de citoplasma y membrana plasmática.^{34, 35}

Tabla 3. Identificación por ESI-LC-MS/MS de la proteína de 64 kDa

Nombre	P.I.*	P.M.£	Cobertura (%)	Mowse Score€	Organismo	Localización®
α -amilasa	5.27	68.4	34	977	<i>Ae. aegypti</i>	Citoplasma y membrana plasmática
Subunidad A de la V-ATPasa	5.26	68.1	35	795	<i>Ae. aegypti</i>	Membrana plasmática
α – glucosidasa	5.63	73.5	23	538	<i>Ae. aegypti</i>	Citoplasma
Proteína para la biosíntesis de la molibdopterina	7.14	68.1	19	488	<i>Ae. aegypti</i>	Mitocondria
Sacaropin deshidrogenasa	6.37	102.7	17	391	<i>Ae. aegypti</i>	Matriz mitocondrial
Succinato desdehidrogenasa	6.35	72	22	376	<i>Ae. aegypti</i>	Membrana mitocondrial interna
α -amilasa	5.35	67	10	293	<i>Ae. aegypti</i>	Citoplasma
Carnitin o-aciltransferasa	8.75	74.4	9	200	<i>Ae. aegypti</i>	Membrana mitocondrial interna
Actina A3	5.30	41.7	12	193	<i>Bombyx mori</i>	Citoplasma
acyl-CoA oxidase	6.77	74.9	9	190	<i>Ae. aegypti</i>	Matriz mitocondrial

*P.I. Punto isoeléctrico

£P.M. Peso molecular

%Cobertura, Porcentaje de aminoácidos presentes en los péptidos identificados por ESI/MS/MS y que se relacionan con las proteínas de la base de datos

€Mowse score, $-10 \times \log(P)$, donde P es la probabilidad de que la proteína obtenida sea un evento aleatorio

®Localización. Localización de la proteína en otros organismos.

Proteínas identificadas para la banda de 57 kDa (MC57). Se realizó la identificación de las proteínas presentes en la banda de 57 kDa de membranas celulares enriquecidas de estómagos de mosquito *Ae. aegypti*, mediante ESI-LC-MS/MS, a continuación se enlistan las proteínas identificadas. Tabla 4.

En la banda de 57 kDa se identificaron 24 proteínas. Dentro de las proteínas identificadas, la proteína Chaperonina de 60 kDa presentó los valores más altos de cobertura y score. Esta familia de proteínas es muy conservada entre los organismos, previene la síntesis de nuevos polipéptidos, además de que, en procariotas, está relacionada con la regulación de las modificaciones post-traduccionales, estas proteínas están presentes en la mitocondria de las células eucariotas.³⁶

Tabla No. 4. Identificación por ESI-LC-MS/MS de la proteína de 57 kDa

Nombre	P.I.*	P.M.£	Cobertura (%)	Mowse Score€	Organismo	Localización®
Chaperonina 60 kDa	5.47	60.7	67	2092	<i>Ae. aegypti</i>	Mitocondria
Chaperonina 60 kDa	5.55	60.7	34	952	<i>An. gambiae</i>	Mitocondria
heat shock protein 60	5.56	60.8	30	434	<i>D. melanogaster</i>	Mitocondria
Enzima malic	7.22	71.9	11	280	<i>Ae. aegypti</i>	Citoplasma
Proteína CCT-gamma	6.23	59.4	7	180	<i>D. melanogaster</i>	Citoplasma

*P.I. Punto isoeléctrico

£P.M. Peso molecular

%Cobertura, Porcentaje de aminoácidos presentes en los péptidos identificados por ESI/MS/MS y que se relacionan con las proteínas de la base de datos

€Mowse score, $-10 \times \text{Log}(P)$, donde P es la probabilidad de que la proteína obtenida sea un evento aleatorio

®Localización. Localización de la proteína en otros organismos.

Proteínas identificadas para la banda de 48 kDa (MC48). Se realizó la identificación de las proteínas de la banda de 48 kDa utilizando ESI-LC-MS/MS y se obtuvieron 31 proteínas en total, sin embargo, solo se enlistan 7 proteínas con valores de cobertura y score más altos. Tabla 5.

De las 31 proteínas que constituían la banda de 48 kDa, la proteína 4 – hidroxibutirato CoA transferasa presentó una cobertura y score más alto. Esta proteína ha sido descrita principalmente en bacterias anaerobias ya que cataliza la formación de 4 – hidroxibutiril CoA a partir de 4 – hidroxibutirato y está involucrada en la formación de energía. En mamíferos esta molécula no ha sido descrita, pero en el crustáceo *Artemia franciscana*, se describió como una proteína asociada a microtúbulos. Esta proteína se localiza principalmente en citoplasma.^{37, 38}

Tabla No. 5. Identificación por ESI-LC-MS/MS de la proteína de 48 kDa

Nombre	P.I.*	P.M.£	Cobertura (%)	Mowse Score€	Organismo	Localización®
4-Hydroxibutirato CoA-transferasa	8.15	51.8	35	738	<i>Ae. aegypti</i>	Citoplasma
Troponina T	4.75	45.9	32	727	<i>Ae. aegypti</i>	Citoplasma
Leucín aminopeptidasa	6.08	54.8	38	688	<i>Ae. aegypti</i>	Citoplasma
Subunidad β de la ATPsintasa	5.02	53.9	31	609	<i>Ae. aegypti</i>	Membrana plasmática
Chaperonina 60 kDa	5.47	60.07	24	340	<i>Ae. aegypti</i>	Mitocondria
Alanín aminotransferasa	8.60	59.4	9	212	<i>Ae. aegypti</i>	Mitocondria
Cadena β – Tubulina	4.80	50.4	27	209	<i>Ae. aegypti</i>	Citoesqueleto

*P.I. Punto isoeléctrico

£P.M. Peso molecular

%Cobertura, Porcentaje de aminoácidos presentes en los péptidos identificados por ESI/MS/MS y que se relacionan con las proteínas de la base de datos

€Mowse score, $-10 \times \log(P)$, donde P es la probabilidad de que la proteína obtenida sea un evento aleatorio

®Localización. Localización de la proteína en otros organismos.

Proteínas identificadas para la banda de 40 kDa (MC40). En el caso de la banda de 40 kDa obtenida del enriquecimiento de membranas celulares de estómago de *Ae. aegypti*, se obtuvieron 56 proteínas totales, solo se enlista la proteína que presentó el valor de cobertura y score más altos. Tabla 6.

En el caso de la banda de 40 kDa, se identificó un total de 56 proteínas, siendo la actina la proteína más referida. Esta proteína es uno de los componentes del citoesqueleto, está altamente conservada en diversos organismos, y participa en procesos fisiológicos diversos, entre las que se destacan la división celular, transducción de señales, movimiento vesicular y brinda forma a la célula, entre otras funciones.³⁹

Tabla 6. Identificación por ESI-LC-MS/MS de la proteína de 40 kDa

Nombre	P.I.*	P.M.£	Cobertura (%)	Mowse Score€	Organismo	Localización®
Actina	5.56	41	47	1100	<i>Homo sapiens,</i> <i>Ae aegypti, An. gambiae,</i> <i>Dicentrarchus labrax,</i> <i>Monopterus albus,</i> <i>Epinephelus coioides,</i> <i>Mustela putorius furo, etc</i>	Citoesqueleto

*P.I. Punto isoeléctrico

£P.M. Peso molecular

%Cobertura, Porcentaje de aminoácidos presentes en los péptidos identificados por ESI/MS/MS y que se relacionan con las proteínas de la base de datos

€Mowse score, $-10 \times \log(P)$, donde P es la probabilidad de que la proteína obtenida sea un evento aleatorio

®Localización. Localización de la proteína en otros organismos.

VI. DISCUSIÓN

En los mosquitos tres especies se consideran las más importantes en salud pública: *Aedes*, *Anopheles* y *Culex* por ser vectores de enfermedades. La capacidad de transmitir agentes infecciosos la tienen sólo las hembras, debido a que éstas requieren de alimentarse con sangre para obtener proteínas indispensables para la formación de huevo y es durante el proceso de picar para alimentarse, que los patógenos entran al mosquito o salen de él.^{8, 40}

El estómago de la hembra es más grande que el del macho y en él se almacena y digiere la sangre.^{3, 5} Durante la digestión se producen enzimas, tanto digestivas, como las necesarias para activar la respuesta inmune, o coordinar la generación de hormonas necesarias los procesos reproductivos y también se sintetizan proteínas para formar la matriz peritrófica, estructura que recubrirá al bolo alimenticio durante la digestión.¹⁴ Entre las enzimas identificadas en el estómago de *Ae aegypti* están varias endopeptidasas como la tripsinas, que son las moléculas más estudiadas en el proceso de digestión de la sangre.⁴⁰ En *Aedes* la síntesis de esta actividad se realiza en varias fases. Antes de la alimentación se produce solo pequeñas cantidades de enzima, después de la alimentación con sangre se forma la “tripsina temprana” que es la proteína más abundante del estómago de la hembra adulta y la regulación de su síntesis es notable, ya que ocurre durante la traducción. El RNAm de la tripsina temprana se sintetiza a partir de las 24 h después de que el adulto ha emergido y la traducción se realiza sólo después de la ingestión de sangre.⁴¹ Por otra parte, la alimentación con sangre induce la expresión del gen de la “tripsina tardía”, la cual alcanza grandes concentraciones entre las 8 y 24 hPAS.^{42, 43} En contraste, en *Anopheles* se describen serina proteasas tipo tripsina codificadas por 7 genes y de ellos se ha descrito que en el estómago el producto de *Antryp1* se presenta en pequeñas cantidades y se sintetiza de manera constitutiva, mientras que la transcripción /traducción de *Antryp2*, se inducen por la alimentación con sangre.^{7, 9}

Otras moléculas de los mosquitos que se han identificado como inducidas por la alimentación con sangre incluye a las quimotripsinas y que han sido muy estudiadas en todos los anofelinos; por ejemplo Vizioli *et al.* en el año 2001¹⁰ clonaron y caracterizaron dos genes de quimotripsinas de *An. gambiae*, *Anchym1* y *Anchym2*, y encontraron que los dos genes presentan las características bioquímicas de esta clase de proteasas y que ambas se transcriben, traducen y secretan hacia el lumen intestinal después de la alimentación con sangre. En *Ae. aegypti*, Jiang *et al.* en el año de 1997¹¹ analizaron el patrón de expresión del mensajero de la quimotripsina y observaron que éste se incrementa a las 24 h después de emerger y que la traducción es inducida por una alimentación rica en proteínas o por la alimentación con sangre. Otras moléculas inducidas por la alimentación con sangre, son las asociadas con la matriz peritrófica (PM), estructura formada por quitina, proteínas y proteoglicanos que participan en la protección del epitelio estomacal durante la degradación de la sangre, además de regular la entrada de proteasas hacia el lumen intestinal.

En otros estudios orientados a conocer de forma global las moléculas que se expresan en el estómago de los mosquitos Cázares-Raga *et al.* en el año 1998⁴⁴ compararon, mediante electroforesis uni y bidimensional, las proteínas presentes en el estómago de machos y hembras de *An. albimanus* alimentados con azúcar y encontraron más de 150 proteínas específicas de sexo. En otro trabajo, Moskalyk *et al.* en el año 1996⁴⁵ utilizaron electroforesis bidimensional para describir las proteínas presentes en la matriz peritrófica de los estómagos de *Ae. aegypti* y *An. gambiae*. Observaron 40 proteínas presentes en ambos dípteros, sin embargo, no realizaron la identificación de las proteínas mediante tecnología proteómica. Posteriormente, Prevot *et al.* en el año 2003⁴⁶ analizaron, usando la electroforesis en doble dimensión, los estómagos de machos y hembras de *An. gambiae*, alimentadas con azúcar y estómagos de hembras 19 horas post-alimentación con sangre. Estos autores reportaron aproximadamente 375 proteínas de las proteínas identificadas 10 fueron específicas de machos, mientras que 23 proteínas fueron específicas de hembras, y de éstas, 8 se expresaron por la ingesta de néctar, mientras que solo 10

proteínas se expresaron por la ingesta de sangre. Sin embargo en estos trabajos la identificación de las proteínas diferenciales se limitó a señalarlas por su punto isoeléctrico (pI) y peso molecular debido a que aun no era accesible la identificación por MS.

En el presente trabajo, mediante electroforesis unidimensional se observaron proteínas que disminuyen abruptamente en el estómago de hembras *Ae. aegypti* a tiempos tempranos PAS, lo cual puede explicarse sugiriendo que en el estómago del mosquito existen mecanismos de secreción, lo que lleva a la disminución de estas moléculas. En contraparte otras proteínas aumentaron al paso del tiempo PAS lo cual se interpreta como que ocurre la síntesis de proteínas, que por una parte son proteínas nuevas que son necesarias para el manejo de la sangre y por otra parte se producen moléculas que reponen las que se consumen en preparación a un siguiente ciclo de alimentación. Es interesante mencionar que el ciclo de alimentación con sangre esta vinculado al ciclo gonotrófico el cual es coordinado por diversas hormonas, como la hormona juvenil, hormona ecdisteroidogénica ovárica (OEH) entre otras, las cuales tienen como blanco diversos tejidos como las ovarias o los centros nerviosos modificando varios comportamientos del mosquito que incluyen el apareamiento, oviposición y búsqueda de alimento.⁴⁷ Asimismo, en los cambios observados en los patrones de proteínas PAS es probable que participen procesos de modificación post-traducciona de proteínas.

En contraste a los reportes anteriores, donde no se contaba con métodos de MS, en este trabajo, mediante el uso de ESI-LC-MS/MS se estableció una estrategia de tipo “proteómica de escopeta” (shotgun proteomics), esta tecnología se basa en el análisis de proteínas a partir de mezclas complejas, permitiendo la identificación de todas las proteínas presentes. La identificación se facilita con el uso de tecnología multidimensional incorporando técnicas de cromatografía líquida de alta presión (LC/LC), espectrometría de masas en tándem (MS/MS) y la búsqueda de las proteínas en bases de datos.⁴⁸ Con base a esta estrategia, se identificó una proteína de 40 kDa resuelta por PAGE-SDS seguido de MALDI-TOF, la cual es expresada

diferencialmente a consecuencia de la hematofagia y se encontró que es un posible ortólogo de la Serpina-4 de *D. melanogaster*.

Las serpinas son proteínas inhibidoras de serina proteasas involucradas en un gran número de procesos biológicos.^{49, 50} Estas moléculas se han identificado en mamíferos, poxvirus, plantas, bacterias y arqueas. Diversos análisis genómicos han revelado que todos los eucariotes multicelulares poseen serpinas.⁵⁰ En humanos, las serpinas participan en procesos como coagulación de la sangre, activación del complemento, fibrinólisis, angiogénesis e inflamación, entre otras.⁴⁹ En los insectos se han identificado varios inhibidores de serina proteasas en la hemolinfa. Estas moléculas pertenecen a la superfamilia de las serpinas, las que a su vez se clasifican en dos grupos: serpinas de bajo peso molecular (menores a 10 kDa) que son inhibidores canónicos y las serpinas de alto peso molecular (de alrededor de 45 kDa).⁴⁹ Dentro de la biología de los insectos, las serpinas participan activamente en la respuesta inmune regulando la activación de la cascada de la profenol oxidasa (proPO) mediante la inactivación de las enzimas activadoras de la profenol oxidasa (PAP).^{51, 52} En *D. melanogaster* se han identificado serpinas extracelulares que participan en la regulación de la respuesta inmune innata, cascada de melanización y desarrollo dorsoventral. Recientemente, los proyectos de secuenciación del genoma en *D. melanogaster* y *An. gambiae* revelaron un gran número de serpinas, sin embargo, la mayoría carece de péptido señal y por lo tanto se considera que son intracelulares.⁵³ En resumen, las serpinas participan regulando la maduración de las proteínas que se secretan, receptores unidos a membrana o péptidos bioactivos en un proceso dependiente del rompimiento proteolítico realizado por proprotein convertasas (PC).^{28, 29, 32}

La proteína identificada como Serpina-4 en este trabajo presenta 31% de homología con la Serpina4 (*Spn4*) de *D. melanogaster* y 60% de homología con la Serpina10 (SRPN10) de *An. gambiae*. En *D. melanogaster*, Richer *et al*, en el año 2004³⁰ analizaron al gen *Spn4* y encontraron que codifica una proteína que inhibe a la proprotein convertasa furina humana y a la proprotein convertasa 2 (PC2);

importantes moléculas que permiten la secreción de proteínas de *D. melanogaster*. Por lo tanto las serpinas participan en la regulación de la secreción de una gran cantidad de moléculas. En otro trabajo, Osterwalder *et al.* en el año 2004²⁹ encontraron que la secuencia de aminoácidos de Spn4 de *D. melanogaster* tiene alta homología con la neuroserpina de mamíferos y además presenta en el extremo C-terminal un péptido de retención para el retículo endoplásmico. Danielli *et al.* en el año 2005⁵³ analizaron la serpina 10 (SRPN10) en células intestinales de *An. gambiae* infectadas con *P. berghei* y observaron que esta serpina es translocada hacia el núcleo y que cuando esto ocurre, las células muestran indicios de apoptosis, sugiriendo su participación en el proceso de inducción de muerte celular programada. La serpina 4 de *Ae. aegypti* aquí identificada no se ha estudiado, y sólo puede sugerirse, debido a la homología que existe entre esta molécula y las de *D. melanogaster* y *An. gambiae*, su probable participación como regulador de la secreción de proteínas. Para corroborar esta hipótesis se requeriría observar la expresión del gen, obtener anticuerpos contra la proteína para observar su localización y/o silenciar al gen para analizar su efecto sobre la secreción, posiblemente afectando la actividad sobre la proproteína convertasa tipo furina.

Como parte de este trabajo también se analizó la actividad proteolítica total durante las 72 h que comprende el proceso de digestión de la sangre, tanto en estómagos como en contenido estomacal (CE) de *Ae. aegypti*, mediante un zimograma en geles de PAGE –SDS copolimerizados con gelatina. En un estudio previo, realizado por Cázares- Raga *et al.* en el año 1998⁴⁴ en *An. Albimanus*, se compararon las proteasas presentes en estómago, cabeza y cáscaras (cuerpo graso) de machos y hembras y ovarios por medio de PAGE-SDS en geles copolimerizados tanto con gelatina como con hemoglobina. En estómagos, se observó un patrón específico de sexo, con la presencia de una banda de 90 kDa específica de hembras, y tres bandas de 42, 46 y 60 kDa específicas de machos. En contraste, en las demás regiones estudiadas las bandas con actividad proteolítica fueron muy similares: en la cabeza se observaron aproximadamente 5 bandas entre los 38 y 55 kDa, en las cáscaras se presentó un patrón de bandas similar entre los 65 y 32 kDa. Finalmente,

en ovarios se presentó un patrón de 12 bandas en la zona de 200 a 25 kDa. Estos resultados indican que en el estómago de los mosquitos, existe una regulación diferencial entre los sexos en la expresión de genes. En el presente trabajo se estudió el estómago de *Ae. aegypti* hembra antes y durante la hematofagia y se observó que el mosquito antes de una alimentación con sangre presenta trazas de actividad de dos proteasas y al haber una alimentación con sangre se induce la síntesis de nuevas proteasas de bajo y alto peso molecular cuya aparición depende del tiempo post-alimentación, lo que nos sugiere que este proceso es regulado. Para el caso de las tripsinas en *Ae. aegypti* se ha descrito el factor modulador de tripsina (TMF), una hormona peptídica, como una molécula que controla la síntesis de proteasas durante el proceso de alimentación con sangre. La mayor actividad proteolítica se presentó entre las 12 y 36 hPAS. Anteriormente se describió, por métodos de degradación de sustrato en solución, donde se analizan juntas todas las actividades proteolíticas capaces de degradar un sustrato, que la actividad proteolítica temprana de las tripsinas se presenta a una hPAS y la tripsina tardía entre las 15 y 20 hPAS. En comparación, el análisis de proteasas realizado en este trabajo separando las moléculas por PAGE-SDS en geles copolimerizados con gelatina, permite discernir las proteasas de distintos pesos moleculares y arroja datos respecto a la magnitud de su actividad. En este sistema se puede conocer el tipo de enzimas en los extractos de estómagos, serina, cisteína o metaloproteasa, realizando los experimentos en presencia de inhibidores específicos. En el presente trabajo también se observó la presencia de proteasas presentes en el CE, lo que sugiere que estas proteasas se secreten desde el epitelio hacia el lumen intestinal y participen en la degradación de los componentes sanguíneos.

Dada la importancia de las membranas plasmáticas de los estómagos como frontera entre el mosquito y el contenido intestinal, tanto para la digestión/ absorción de componentes de la sangre, como por el papel que juega en la susceptibilidad a la entrada de agentes infecciosos, en este trabajo se probaron protocolos para hacer preparaciones enriquecidas en moléculas de membrana de células del estómago de *Ae. aegypti*. Para este estudio se usó el método de Kotsyfakis *et al.*²⁵ con el cual se

probó el papel de la anexina, proteína de membrana, de células en cultivos de *D. melanogaster*, *Ae. aegypti* y *An. gambiae*, en la interacción con *P. berghei*. En este método se realizó el fraccionamiento celular mediante ultracentrifugación y para enriquecer las proteínas de membrana se realizaron tratamientos con Na_2CO_3 en presencia de agentes desnaturizantes como urea o guanidina y, finalmente, las proteínas de membrana se estudiaron mediante electroforesis bidimensional para identificar la anexina. Para nuestro trabajo se modificó el método, se suprimió el tratamiento con Na_2CO_3 y los agentes desnaturizantes esto debido a que estos tratamientos se realizan para el análisis de proteínas en geles bidimensionales y la separación de las proteínas en este trabajo se realizó en geles unidimensionales. Para corroborar a que grado se obtuvieron membranas plasmáticas se requeriría realizar estudios adicionales de Western blot con anticuerpos dirigidos hacia proteínas de membrana que sirvieran como marcadores de esta fracción como anexina, o γ -glutamyltranspeptidasa o bien lectinas, dado que se sabe que en esta estructura celular, se encuentran la mayor parte de las glucoproteínas. También se podrían realizar estudios de microscopía electrónica para observar el enriquecimiento de membranas plasmáticas. Sin embargo, el recuento de las proteínas identificadas por espectrometría de masas en nuestro estudio como la sacaropina deshidrogenasa y chaperonina 60 kDa, parecen indicar que probablemente se hayan enriquecido membranas de la mitocondria, aunque existe la posibilidad de que se tenga una fracción mixta de membranas de organelos, además de las membranas plasmáticas.

La identificación de proteínas llevada a cabo mediante ESI-LC-MS/MS, se obtuvieron una gran cantidad de proteínas descritas para cada banda, sin embargo, en el análisis de los resultados se obtienen 2 valores, el porcentaje de cobertura, que se refiere a los péptidos presentes en la proteína blanco, y el mowse score que es la probabilidad de que la proteína obtenida sea un evento aleatorio, pero para el caso de estos dos parámetros el software MASCOT (www.matrixscience.com/), menciona que la presencia de dos péptidos obtenidos de manera experimental presentes en la proteína obtenida a partir de bases de datos se considera como un resultado óptimo, para el caso del mowse score, describe que un valor mayor de 65 se considera un

valor aceptable. Para el caso de este trabajo, se obtuvieron más de 15 proteínas, sin embargo, se discute la proteína que presentó los valores más altos.

Proteína identificada para la banda de 100 kDa. La sacaropina deshidrogenasa (SDH) es una enzima bifuncional codificada por el gen *LKR/SDH*, esta enzima fue clonada por primera vez en la planta *Arabidopsis thaliana*. Tanto en mamíferos como en plantas, la lisina es un aminoácido esencial, es decir es obtenido de la dieta, y para su catabolismo la célula sintetiza una enzima bifuncional la lisina cetoglutarato reductasa (LKR) y la sacaropina deshidrogenasa (SDH), que participan en la degradación de la lisina para la obtención de acetilcoenzima A (Acetil CoA) o Glutamato.³¹ Tang *et al.* en el año 2002³² identificaron el gen *LKR/SDH* en el algodón *Gossypium hirsutum* además realizaron un análisis genómico con *Arabidopsis*, *Zea mays* (maíz) y en el tomate *Lycopersicon esculentum* encontrando que estos vegetales pueden codificar el RNAm independiente para LKR o SDH, y caracterizaron las propiedades enzimáticas de cada una de ellas. Estos autores observaron que estas enzimas se localizan en la matriz mitocondrial, cloroplastos de la célula vegetal y sugirieron que es importante para la nutrición. Por otra parte, en mamíferos la *LKR/SDH* fue descrita por Higashino *et al.* en el año 1965⁵⁴ en el hígado de rata, donde observaron la presencia de la sacaropina deshidrogenasa en la matriz mitocondrial. En el presente trabajo identificamos la SDH en extractos que se esperaban enriquecidos en membranas, lo que contrasta con lo reportado en mamíferos donde la localización es mitocondrial lo que indica que en nuestro proceso de extracción de membranas puede haber restos de mitocondrias como contaminantes. Sin embargo la descripción de la expresión real de esta enzima es novedosa e interesante, ya que esta implicada en la degradación de la lisina, aminoácido abundante en sangre (150 a 220 micromoles/litro, $\mu\text{M/L}$).

MC 64 kDa. Proteína identificada para la banda de 64 kDa. Las α -amilasas son enzimas presentes en una amplia variedad de organismos y catalizan la hidrólisis de enlaces glucosídicos (α -1,4) en el almidón y otros carbohidratos. La degradación del almidón se considera como el primer paso para la degradación de polisacáridos y por

lo tanto para la asimilación de carbohidratos. Este conjunto de enzimas se han descrito en insectos, por ejemplo en *Tenebrio molitor*, donde los carbohidratos como el almidón, forman la mayor parte de la dieta. En este insecto la enzima es sintetizada en las células del estómago, empacada en vesículas que se secretan hacia el lumen intestinal donde degrada al almidón para obtener energía. Las α -amilasas se han estudiado en las glándulas salivales y en la saliva del mosquito *Ae. aegypti*.^{34, 35} En un primer ensayo, Grossman y James, en el año 1993⁵⁵ identificaron la presencia de un gen denominado *Amy I* activo en los lóbulos laterales y proximales de las glándulas salivales en hembras del mosquito *Ae. aegypti*, observaron que este gen codifica para una proteína de 81.5 kDa, y describieron que la molécula posee péptido señal, así como una gran cantidad de sitios de glicosilación. En otro estudio, Grossman, *et al.* en el año 1997⁵⁶ a partir de fragmentos de DNA genómico de hembras de *Ae. aegypti*, observaron que además del ya citado *Amy I* hay un segundo gen que codifica para amilasa al que llamaron *Amy II*. En otro estudio realizado por Silva-Filha, *et al.* en el año 1999⁵⁷ describieron que la toxina Bin de *Bacillus sphaericus* se une a una proteína de 60 kDa localizada en la membrana del estómago de la larva de *Culex pipiens*. Después de purificar la proteína realizaron la identificación mediante secuenciación del extremo n-terminal, al analizar los resultados en bases de datos observaron que pertenece a la familia de las α -amilasas. Para confirmar este trabajo, Darboux, *et al.* en el año 2001⁵⁸ realizaron la caracterización de la proteína de 60 kDa. A partir del cDNA de estómagos de larvas de *C. pipiens*, observaron que presenta un marco de lectura que codifica para una proteína de 580 aa, además presenta un péptido señal, presenta un sitio de anclaje a glicosil-fosfatidilinositol (GPI), la secuencia de esta proteína mostró una identidad del 39 al 43% con las maltosas de insecto (α -glucosidasas y α -amilasas). Debido a que estas proteínas se han descrito otros mosquitos, la presencia de esta proteína es un dato muy relevante en la biología del mosquito para la obtención de energía a partir de carbohidratos presentes en la sangre.

Proteína identificada para la banda de 57 kDa. Las proteínas de choque térmico (HSP), son proteínas altamente conservadas en todos los organismos, su síntesis es

inducida en respuesta al estrés, sea ambiental o metabólico. Entre las HSPs están las chaperoninas, moléculas que participan en la síntesis de proteínas, ya sea regulando su plegamiento o secreción y participan en el direccionamiento de las proteínas hacia la membrana plasmática, renaturalización de proteínas, regulan la interacción proteína – proteína y por todo esto están implicadas en la división celular y procesos de apoptosis, entre otras funciones.^{36, 59} La presencia de proteínas de choque térmico en el estómago del mosquito es muy interesante porque no ha sido descrita en estos insectos, y pueden ser importantes dado el estado de estrés que ocurre durante la alimentación con sangre.⁶⁰

Proteína identificada para la banda de 48 kDa. La 4-hidroxi-butirato-CoA transferasa, se ha descrito en las bacterias anaerobias como *Clostridium aminobutyricum* y *Clostridium kluyveri*, organismos anaerobios, cataliza la formación de 4-hidroxi-butiril - CoA usando tanto butiril-CoA o acetyl-CoA como coenzima donadora en procesos reversibles importantes para la obtención de energía. El único reporte de esta enzima en organismos diferentes fue realizado por Oulton *et al.* en el año 2003³⁷ identificaron esta proteína en el crustáceo *Artemia franciscana* por homología con la enzima 4-hidroxi-butirato CoA–transferasa virtual obtenida a partir del genoma de *D. melanogaster*, donde no ha sido descrita experimentalmente. Estos autores al realizar el análisis de la secuencia observaron que ésta posee un fragmento entre los aminoácidos 79 a 86 que posiblemente puede unir GTP, lo que induce un cambio conformacional produciendo la disociación de las proteínas asociadas a los microtubulos, lo que sugiere que esta proteína podría asociarse a este organelo celular. En el mosquito esta molécula tampoco había sido descrita y queda por estudiar su papel en el metabolismo de *Ae. aegypti* y su posible asociación con los microtúbulos.

Proteína identificada para la banda de 64 kDa. La actina es una proteína muy importante que reconstituye a los microfilamentos, uno de los componentes principales del citoesqueleto de las células eucariotas. La actina se expresa en todas las células, principalmente en las musculares, y está altamente conservada. En los

insectos hematófagos como el mosquito *Ae. aegypti*, el almacenamiento y digestión de la sangre ocurre en el estómago y se ha descrito que el de la hembra es más grande que el del macho. Cuando la hembra se alimenta de sangre el estómago incrementa su tamaño dramáticamente y Sodja *et al.* en el año 2007³⁹ observaron que en *An. gambiae* las células intestinales sufren cambios que incluyen que se ven estiradas por el volumen de sangre, se aplanan y pierden las microvellosidades. Estos cambios morfológicos se acompañan del incremento, tanto en la expresión del mensajero como de la producción de la proteína actina, lo que sugiere que necesaria para modificar la estructura del estómago y poder acomodar la sangre dentro de este órgano. A las 24 hPAS la producción del RNAm y de la proteína se normalizan.

VII. CONCLUSIONES

- ❖ La alimentación con sangre modifica las proteínas y proteasas totales presentes en el estómago y el contenido intestinal de mosquitos hembra *Ae. aegypti*.
- ❖ En los estómagos de *Ae. aegypti*, se observaron cambios en la expresión de proteínas una de ellas es la serpina-4 a consecuencia de la alimentación con sangre
- ❖ La Serpina-4 identificada en este trabajo es homóloga a la Serpina 4 (Spn4) de *D. melanogaster* y la Serpina 10 (SRPN10) de *An. gambiae*.
- ❖ Se reporta un proteoma parcial de preparaciones posiblemente enriquecidas en membranas plasmáticas de los estómagos de mosquitos hembra de *Ae. aegypti*, identificando proteínas relacionadas con el catabolismo de aminoácidos, metabolismo de carbohidratos, obtención de energía, estrés celular y citoesqueleto.

VIII. REFERENCIAS

1. Qi R-f, Zhang L, Chi C-w. Biological characteristics of dengue virus and potential targets for drug design. *Acta Biochim Biophys Sin.* 2008;40(2):91 - 101.
2. Corena MdP, VanEkeris L, Salazar MI, Bowers D, Fiedler MM, Silverman D, et al. Carbonic anhydrase in the adult mosquito midgut. *J Exp Biol.* 2005;208(17):3263-3273.
3. Okuda K, Caroci AdS, Ribolla PEM, Bianchi AGd, Bijovsky AT. Functional morphology of adult female *Culex quinquefasciatus* midgut during blood digestion. *Tissue Cell.* 2002;34(3):210-219.
4. Onken H, Moffett SB, Moffett DF. The anterior stomach of larval mosquitoes (*Aedes aegypti*): effects of neuropeptides on transepithelial ion transport and muscular motility. *J Exp Biol.* 2004;207(21):3731-3739.
5. Zieler H, Garon CF, Fischer ER, Shahabuddin M. A tubular network associated with the brush - boarder surface of the *Aedes aegypti* midgut: implications for pathogen transmission by mosquitoes. *J Exp Biol.* 2000;203(10):1599-1611.
6. Clements AN. Adult digestion. In: Hall C, editor. *The biology of mosquitoes;* 1963.
7. Müller HM, Catteruccia F, Vizioli J, Torre Ad, Crisanti A. Constitutive and Blood Meal-Induced Trypsin Genes in *Anopheles gambiae*. *Exp Parasitol.* 1995;81(3):371 - 385.
8. Noriega FG, Wells MA. A molecular view of trypsin synthesis in the midgut of *Aedes aegypti*. *J Insect Physiol.* 1999;45(7):613-620.
9. Müller HM, Crampton JM, Torre AD, Sinden R, Crisanti A. Members of a trypsin gene family in *Anopheles gambiae* are induced in the gut by blood meal. *EMBO J.* 1993;12(7):2891-2900.
10. Vizioli J, Catteruccia F, Torre AD, Reckman I, Müller HM. Blood digestion in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*: Molecular cloning and biochemical characterization of two inducible chymotrypsins. *Eur J Biochem.* 2001;268(14):4027-4035.
11. Jiang Q, Hall M, Noriega FG, Wells M. cDNA cloning and pattern of expression of an adult, female-specific chymotrypsin from *Aedes aegypti* midgut. *Insect Biochem Mol Biol.* 1997;27(4):283 - 289.
12. Cázares-Raga FE. Identificación de moléculas que se expresan en el estómago de mosquitos hembras de *Anopheles albimanus* (tesis doctoral). México DF: CINVESTAV-IPN; 2000.
13. Pootanakit K, Angsuthanasombat C, Panyim S. Identification of two isoforms of aminopeptidase N in *Aedes aegypti* larval midgut. *J Biochem Mol Biol.* 2003;36(5):508 - 513.
14. Villalon JM, Gosh A, Jacobs-Lorena M. The peritrophic matrix limits the rate of digestion in adult *Anopheles stephensi* and *Aedes aegypti* mosquitoes. *J Insect Physiol.* 2003;49(10):891 - 895.
15. Devenport M, Fujioka H, Jacobs-Lorena M. Storage and secretion of the peritrophic matrix protein Ag-Aper1 and trypsin in the midgut of *Anopheles gambiae*. *Insect Mol Biol.* 2004;13(4):349 - 358.

16. Pascoa V, Oliveira PL, Dansa-Petretski M, Silva JR, Alvarenga PH, Jacobs-Lorena M, et al. *Aedes aegypti* peritrophic matrix and its interaction with heme during blood digestion. *Insect Biochem Mol Biol*. 2002;32(5):517-523.
17. Shen Z, Jacobs-Lorena M. A type I peritrophic matrix protein from the malaria vector *Anopheles gambiae* binds to chitin. *J Biol Chem*. 1998;273(28):17665-17670.
18. Acosta EG, Castilla V, Damonte EB. Functional entry of dengue virus into *Aedes albopictus* mosquito cells is dependent on clathrin-mediated endocytosis. *J Gen Virol*. 2008;89(2):474 - 484.
19. Chu JJH, Leong PWH, Ng ML. Characterization of plasma membrane-associated proteins from *Aedes albopictus* mosquito (C6/36) cells that mediate West Nile virus binding and infection. *Virology*. 2005;339(2):249 - 260.
20. Ren J, Ding T, Zhang W, Sont J, Ma W. Does Japanese encephalitis virus share the same cellular receptor with other mosquito-borne flaviviruses on the C6/36 mosquito cells? *Virology*. 2007;6(4):83.
21. Terra WR, Costa RH, Ferreira C. Plasma membranes from insect midgut cells. *An Acad Bras Cienc*. 2006;78(2):255-269.
22. Aebersold R, Man M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*. 2003;422(6928):198-207.
23. Cravatt BF, Simon GM, Yates JR. The biological impact of mass-spectrometry-based proteomics. *Nature*. 2007;450(7172):991-1000.
24. Guerrero IC, Kleiner O. Application of Mass Spectrometry in Proteomics. *Biosci Rep*. 2005;25(1-2):71 - 93.
25. Kotsyfakis M, Ehret-Sabatier L, Siden-Kiamos I, Mendoza J, Sinden RE, Louis C. *Plasmodium berghei* ookinetes bind to *Anopheles gambiae* and *Drosophila melanogaster* annexins. *Mol Microbiol*. 2005;57(1):171-179.
26. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193(1):265-275.
27. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-685.
28. Oley M, Letzel MC, Ragg H. Inhibition of furin by serpin Spn4A from *Drosophila melanogaster*. *FEBS Lett*. 2004;577(1-2):165-169.
29. Osterwalder T, Kuhnen A, Leiserson WM, Kim Y-S, Keshishian H. *Drosophila* serpin 4 functions as a neuroserpin-like inhibitor of subtilisin-like proprotein convertases. *J Neurosci*. 2004;24(24):5482 - 5491.
30. Richer MJ, Keays CA, Waterhouse J, Minhas J, Hashimoto C, Jean F. The *Spn4* gene of *Drosophila* encodes a potent furin-directed secretory pathway serpin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(29):10560-10565.
31. Stepansky A, Less H, Angelovici R, Aharon R, Zhu X, Galili G. Lysine catabolism, an effective versatile regulator of lysine level in plants. *Amino Acids*. 2006;30(2):121 - 125.
32. Tang G, Zhu X, Gakiere B, Levanony H, Kahana A, Galili G. The bifunctional LKR/SDH locus of plants also encodes a highly active monofunctional lysine-ketoglutarate reductase using a polyadenylation signal located within an intron. *Plant Physiol*. 2002;130(1):147 - 154.

33. Zhu X, Tang G, Galili G. Characterization of the two saccharopine dehydrogenase isozymes of lysine catabolism encoded by the single composite *AtLKR/SDH* locus of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 2000;124(3):1363–1372.
34. Franco OL, Rigden DJ, Melo FR, Grossi-de-Sá MF. Plant α -amylase inhibitors and their interaction with insect α -amylases: structure, function and potential for crop protection. *FEBS J.* 2002;269(5):397 - 412.
35. Payan F. Structural basis for the inhibition of mammalian and insect α -amylases by plant protein inhibitors. *Biochim Biophys Acta.* 2004;1969(2):171 - 180.
36. Timakov B, Zhang P. The *hsp60B* gene of *Drosophila melanogaster* is essential for the spermatid individualization process. *Cell Stress Chaperones.* 2001;6(1):71 - 77.
37. Outlon MM, Amons R, Liang P, MacRae TH. A 49 kDa microtubule cross-linking protein from *Artemia franciscana* is a coenzyme A-transferase. *Eur J Biochem.* 2003;270(24):4962-4972.
38. Scherf U, Buckel W. Purification and properties of 4-hydroxybutyrate coenzyme A transferase from *Clostridium aminobutyricum*. *Appl Environ Microbiol.* 1991;57(9):2699-2702.
39. Sodja A, Fujioka H, Lemos FJA, Donnelly-Doman M, Jacobs-Lorena M. Induction of actin gene expression in the mosquito midgut by blood ingestion correlates with striking changes of cell shape. *J Insect Physiol.* 2007;53(8):833-839.
40. Noriega FG, Edgar KA, Bechet R, Wells MA. Midgut exopeptidase activities in *Aedes aegypti* are induced by blood feeding. *J Insect Physiol.* 2002;48(2):205 - 212.
41. Noriega FG, Wang X-Y, Pennington JE, Barillas-Mury CV, Wells MA. Early trypsin, a female-specific midgut protease in *Aedes aegypti*: isolation, amino-terminal sequence determination, and cloning and sequencing of the gene. *Insect Biochem Mol Biol.* 1996;26(2):119-126.
42. Barillas-Mury C, Graf R, Hagendorn HH, Wells MA. cDNA and deduced amino acid sequence of a blood meal-induced trypsin from the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochem.* 1991;21(8):825 - 831.
43. Graf R, Briegel H. Isolation of trypsin isozymes from the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol.* 1985;15(3):611 - 618.
44. Cázares-Raga FE, Sánchez-Contreras ME, Rodríguez MH, Hernández-Hernández FC. Sex specific proteins and proteases present in the midguts of *Anopheles albimanus* (Diptera: *Culicidae*). *J Med Entomol.* 1998;35(2):184-186.
45. Moskalyk LA, Oo MM, Jacobs-Lorena M. Peritrophic matrix proteins of *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti*. *Insect Mol Biol.* 1996;5(4):261-268.
46. Prévot G, Laurent-Winter C, Bourgouin C. Sex-specific and blood meal-induced proteins of *Anopheles gambiae* midguts: analysis by two-dimensional gel electrophoresis. *Malar J.* 2003;2(1).
47. Clements AN. The endocrine system and hormones. In: Hall C, editor. *The biology of mosquitoes*; 1992. p. 206-219.
48. Wu CC, MacCoss MJ. Shotgun proteomics: tools for the analysis of complex biological systems. *Curr Opin Mol Ther.* 2002;4(3):242-250.

49. Gent DV, Sharp P, Morgan K, Kalsheker N. Serpins: structure, function and molecular evolution. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003;35(11):1536-1547.
50. Law RH, Zhang Q, McGowan S, Buckle AM, Silverman GA, Wong W, et al. An overview of the serpin superfamily. *Genome Biol.* 2006;7(5):216.
51. Clynen E, Schoofs L, Salzet M. A review of the most important classes of serine protease inhibitors in insects and leeches. *Mini Rev Med Chem.* 2005;2(000-000).
52. Kanost MR, Jiang H, Yu X-Q. Innate immune responses of a lepidopteran insect, *Manduca sexta*. *Immunol Rev.* 2004;198(1):97 - 105.
53. Danielli A, Barillas-Mury C, Kumar S, Kafatos FC, Loukeris TG. Overexpression and altered nucleocytoplasmatic distribution of *Anopheles* ovalbumin-like SRPN10 serpins in *Plasmodium*-infected midgut cells. *Cell Microbiol.* 2005;7(2):181-190.
54. Higashino K, Tsukada K, Lieberman I. Saccharopine, a product of Lys breakdown by mammalian liver. *Biochem Biophys Res Commun.* 1965;20(3):285 - 290.
55. Grossman GL, James AA. The salivary glands of the vector mosquito, *Aedes aegypti*, express a novel member of the amylase gene family. *Insect Mol Biol.* 1993;1(4):223 - 232.
56. Grossman GL, Campos Y, Severson DW, James AA. Evidence for Two Distinct Members of the Amylase Gene Family in the Yellow Fever Mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol.* 1997;27(8-9):769-781.
57. Silva-Filha MH, Nielsen-LeRoux C, Charles JF. Identification of the receptor for *Bacillus sphaericus* crystal toxin in the brush border membrane of the mosquito *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Insect Biochem Mol Biol.* 1999;29(8):711-721.
58. Darboux I, Nielsen-LeRoux C, Charles JF, Pauron D. The receptor of *Bacillus sphaericus* binary toxin in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) midgut: molecular cloning and expression. *Insect Biochem Mol Biol.* 2001;31(10):981-990.
59. Abdallah MA, Pollenz RS, Nunamaker RA, Murphy KE. Identification and Characterization of a cDNA Clone Encoding the Heat Shock Protein (Hsp60) from the Biting Midge, *Culicoides variipennis sonorensis* Wirth and Jones. *Biochem Genet.* 2000;38(5-6):154 - 162.
60. Eggert-Kruse W, Neuer A, Clussman C, Boit R, Geissler W, Rohr G, et al. Seminal antibodies to human 60 kDa heat shock protein (HSP 60) in male partners of subfertile couples. *Hum Reprod.* 2002;17(3):726 - 735.