



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

“Análisis fosfoproteómico en la línea celular C6/36 HT de *Aedes albopictus* por efecto de PGE₂”

T E S I S

Que presenta

M. en C. CECILIA GONZÁLEZ CALIXTO

Para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE

INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

DIRECTOR DE TESIS: DR. FIDEL DE LA CRUZ HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ

México, D.F.

Mayo, 2015

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Entomología molecular del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del CINVESTAV-IPN bajo la dirección del Dr. Fidel de la Cruz Hernández Hernández, con el apoyo de Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (Proyectos: 83866 y 18054), UC-MEXUS-CONACyT(CN-10479), ICyTDF (PIFUTP09-298) y Fundación Miguel Alemán A. C (2012 #19).

Durante el desarrollo de la tesis se recibió apoyo de una beca de doctorado del CONACyT con número de registro 202753.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por permitirme llegar a este momento con vida.

Agradezco de mi director de tesis, Dr. Fidel de la Cruz Hernández Hernández por ser mi guía en el proceso de enseñanza-aprendizaje.

A la Dra. Febe Elena Cázares Raga por brindarme su comprensión y valioso apoyo en el transcurso de la realización de mis estudios de doctorado.

A la Bióloga Experimental Leticia Cortes Martínez por haberme tenido paciencia en el asesoramiento técnico. Gracias por tu amistad.

A mi comité tutorial: Dra. Rosa María del Ángel Núñez de Cáceres; Dra. Patricia Talamas Rohana; Dr. Mario Alberto Rodríguez Rodríguez, Dr. Mario Henry Rodríguez por sus valiosas aportaciones que hicieron posible la culminación de este trabajo.

A todos mis compañeros del laboratorio por su apoyo académico: Lore, Hugo, Tino, Abel, Sr. Juan, Juan Manuel, Beto. Gracias por el tiempo que compartimos.

DEDICATORIAS

A mis hijos Carlos Ociel y Moisés por comprender mi ausencia del hogar y brindarme su apoyo, nunca podre reponer ese tiempo tan importante para ustedes. Los amo.

A mis padres Pedro † y María Luisa por darme la vida y ser un pilar en mi educación y por sus sabios consejos que hicieron de mí la mujer que soy.

A mi amado esposo Carlos por su amor eterno e infinito apoyo que me brinda en cada momento de mi vida para lograr realizarme en el ámbito profesional.

A mí linda nuera Nancy por su apoyo y darme un lindo nieto, y ser más feliz de lo que soy.

A mi nieto Ethan Sebastián por hacerme reír cada vez que estoy con él y hacer feliz a mi familia.

A mí querida y hermosa suegra Edy por su apoyo incondicional que me brindó en todo este tiempo y darme sus sabios consejos para seguir adelante.

ÍNDICE

1.	Introducción.....	1
1.1	Clasificación de los insectos.....	1
1.2	Prostaglandinas.....	2
.1.2.1	Síntesis de prostaglandinas.....	2
1.2.2	Inhibidores de la síntesis de prostaglandinas.....	3
1.2.3	Receptores prostanooides.....	5
1.3	Función de las prostaglandinas en condiciones de estrés en vertebrados.....	7
1.4	Función de las prostaglandinas en invertebrados.....	8
1.5	Respuesta inmune en insectos.....	9
.1.5.1	Fagocitosis.....	10
1.5.2	Encapsulación.....	11
1.5.3	Nodulación.....	11
1.5.4	Melanización.....	11
1.5.5	Fenoloxidasa en el sistema inmune de los invertebrados.....	14
1.5.6	Producción de especies reactivas de oxígeno (ROS).....	15
1.6	Vías de señalización del sistema inmune en insectos.....	15
2.	Planteamiento del problema.....	19
2.1	Justificación.....	19
3.	Hipótesis.....	21

4.	Objetivo General.....	21
4.1	Objetivos particulares.....	21
5.	Materiales y Métodos.....	22
5.1	Línea celular C6/36 HT de <i>Ae. Albopictus</i>	22
5.2	Viabilidad celular.....	22
5.3	Ensayo de apoptosis.....	23
5.4	Tratamientos con fármacos a las células C6/36 HT.....	23
5.5	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE).....	24
5.6	Electroforesis en dos dimensiones (E-2D).....	25
5.7	Anticuerpos.....	26
5.8	Western blot.....	26
5.9	Análisis de datos.....	27
5.10	Ensayo de inmunoprecipitación.....	28
5.11	Identificación de proteínas fosforiladas por LC-MS/MS.....	29
5.12	Identificación de proteínas inmunoprecipitadas por MALDI TOF/TOF.....	29
5.13	Síntesis de cDNA.....	30
5.14	Análisis de PCR.....	31
5.15	Análisis de qPCR.....	32
5.16	Ensayo de inmunofluorescencia.....	33
6.	Resultados.....	34
6.1	Efecto de PGE2 y dexametasona sobre la viabilidad celular.....	34

6.2	Efecto del tratamiento con PGE ₂ , dexametasona y ausencia de suero sobre la apoptosis en las células C6/36 HT.....	34
6.3	Análisis por electroforesis en dos dimensiones (E-2D) de las proteínas de las células C6/36 HT expuestas a la ausencia de suero, a la PGE ₂ y a la dexametasona.....	39
6.4	Identificación de proteínas fosforiladas en las células C6/36 HT.....	41
6.5	Proteínas fosforiladas en las células C6/36 HT en ausencia de suero.....	49
6.6	Proteínas fosforiladas en las células C6/36 HT bajo tratamiento con PGE ₂	49
6.7	Proteínas fosforiladas en las células C6/36 HT bajo tratamiento con dexametasona	50
6.8	Identificación de proteínas fosforiladas por LC-MS/MS.....	54
6.9	Análisis con <i>Gene Ontology</i> (GO).....	54
6.10	Análisis de la secuencia de <i>Aea</i> RACK1.....	56
6.11	Efecto del estrés sobre la expresión de la proteína <i>Aea</i> /RACK1.....	60
6.12	Expresión diferencial de dos especies de <i>Aea</i> /RACK1.....	61
6.13	Interacción funcional de <i>Aea</i> /RACK1.....	64
6.14	Expresión del gen <i>Aea</i> /RACK1.....	73
6.15	Efecto del estrés sobre la expresión del gen <i>Aea</i> /RACK1.....	73
6.16	Localización de la proteína <i>Aea</i> /RACK1.....	73

7.	Discusión.....	77
7.1	Identificación de proteínas fosforiladas por LC-MS/MS y GO.....	78
7.2	Análisis bioinformático de RACK1.....	82
7.3	Comportamiento de <i>Aea</i> /RACK1 en las células C6/36 HT.....	85
7.4	Expresión de RNAm <i>Aea</i> /RACK1.....	86
7.5	Asociación de <i>Aea</i> /RACK1 con proteínas.....	87
7.6	Localización de <i>Aea</i> /RACK1 en células C6/36 HT.....	88
7.7	Análisis bioinformático del promotor del gen <i>Aeae</i> RACK1.....	90
8.	Conclusiones.....	93
9.	Referencias.....	95
10	Apendice	

ABREVIATURAS

PGs	Prostaglandinas
AA	Ácido araquidónico
COX	Ciclooxigenasas
LOX	Lipoxigenasa
PLA ₂	Fosfolipasa A ₂
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PGD ₂	Prostaglandina D ₂
PGI ₂	Prostaglandina I ₂
PGF _{2α}	Prostaglandina F _{2α}
PGA ₁	Prostaglandina A ₁
PGE ₁	Prostaglandina E ₁
TXA ₂	Tromboxano A ₂
DUSPI	Fosfatasa 1 de especificidad dual
MEC	Cremallera de leucina inducible por glucocorticoides
AnxA1	Anexina A1
DP	Prostanoide D
EP	Prostanoide E
FP	Prostanoide F
IP	Prostanoide I

TP	Prostanoide T
Ca	Calcio
AMPc	Monofosfato de adenosina cíclico
Ser	Serina
Thr	Treonina
Tyr	Tirosina
HSPs	Proteínas de choque térmico
HSFs	Factores de transcripción de choque térmico
MAPK	Proteína cinasa activada por mitogeno
Prx	Peroxiredoxina
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
AMPs	Péptidos antimicrobianos
LPS	Lipopolisacaridos
PO	Fenoloxidasa
proPO	Profenoloxidasa
Dcd	Dopadecarboxilasa
DOPA	Dihidroxi-fenil-alanina
DHI	5,6 Dihidroxiindol
NADA	<i>N</i> -acetildopamina
NBAD	<i>N</i> -β-alanildopamina

ROS	Especies reactivas de oxígeno
Duox	Oxidasa dual
IMD	Inmunodeficiente
NF-κB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras de kappa de las células B activadas
TAK	Cinasa activada por el factor de crecimiento transformante β
JNK	cinasa c-Jun-NTerminal
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
HJ	Hormona juvenil
MEM	Medio mínimo esencial
SFB	Suero fetal bovino
DEXA	Dexametasona
PMS	Metosulfato de fenazina
PBS	Buffer fosfato salino
TGF-β	Factor de crecimiento transformante-beta
SDS	Dodecilsulfato de sodio
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
WB	Western blot
HRP	Peroxidasa de rábano picante
NC	Nitrocelulosa
NaCl	Cloruro de sodio
EDTA	Ácido etildiaminotetraacético

RT-PCR	Retrotranscripción de la reacción en cadena de la polimerasa
RNA _m	Ácido ribonucleico mensajero
IP	Ioduro de propidio
RACK1	Receptor para activar a la cinasa C 1
GO	Gene Ontology
WD	Triptofano-aspartato
IgG	Inmunoglobulina G
IP	Inmunoprecipitación
DAPI	4,6-Diamidino-2-fenilindol, dihidroclorido
TOPK	Proteína cinasa originada en células T
IP ₃	Inositol 1, 4, 5-trifosfato
MPT	Modificación postraducciona
PP2A	Proteína fosfatasa 2 ^a
PHD	Prolil hidroxilasa
VHL	Von Hippel-Lindau
TP β	Receptor β de tromboxano A ₂
GFP	Proteína verde fluorescente

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Biosíntesis de prostaglandinas.....	4
Figura 2.	Vías de señalización mediadas por receptores EP-PGE ₂	6
Figura 3.	Síntesis de melanina.....	13
Figura 4	Las vías Toll, Imd y JAK-STAT controlan la expresión de genes relacionados con la respuesta a infección.....	18
Figura 5.	Efecto de prostaglandina E ₂ sobre la viabilidad celular.....	36
Figura 6.	Efecto de dexametasona sobre la viabilidad celular.....	37
Figura 7.	Efecto de la PGE ₂ , la dexametasona y la ausencia de suero sobre apoptosis en las células C6/36 HT.....	38
Figura 8.	Geles 2D representativos de las proteínas de las células C6/36 HT en diferentes condiciones.....	40
Figura 9.	Ensayos de Western blot representativos muestran el perfil de proteínas fosforiladas en Tyr en las células C6/36 HT en diferentes	

	condiciones.....	42
Figura 10.	Ensayos de Western blot representativos muestran el perfil de proteínas fosforiladas en Ser en las células C6/36 HT en diferentes condiciones.....	43
Figura 11.	Ensayos de Western blot representativos muestran el perfil de proteínas fosforiladas en Thr en las células C6/36 HT en diferentes condiciones.....	44
Figura 12.	Análisis de cuatro puntos en la ausencia de suero, tratadas con la PGE ₂ y la dexametasona.....	51
Figura 13.	Análisis de dos puntos en la ausencia de suero, tratadas con la PGE ₂ y la dexametasona.....	52
Figura 14.	Análisis de tres puntos bajo la inducción de la ausencia de suero, de la PGE ₂ y de la dexametasona.....	53
Figura 15.	Alineamiento múltiple de proteínas RACK1 de diferentes especies	58
Figura 16.	Modelo de <i>Aeae</i> RACK1.....	59

Figura 17.	Expresión de <i>Aea/RACK1</i> en células C6/36 HT en ausencia de suero, tratadas con la PGE ₂ y la dexametasona.....	62
Figura 18.	El aumento de dos especies de proteínas <i>Aea/RACK1</i> en células C6/36 HT en ausencia de suero, tratadas con la PGE ₂ y la dexametasona.....	63
Figura 19.	Proteínas asociadas con <i>Aea/RACK1</i> en ausencia de suero, tratamiento con la PGE ₂ y la dexametasona.....	66
Figura 20.	Clasificación de proteínas identificadas de <i>Ae. albopictus</i> en procesos biológicos.....	67
Figura 21.	Interacciones funcionales predichas de <i>AeaeRACK1</i> (AAEL013069).....	68
Figura 22.	Expresión del gen <i>Aea/RACK1</i> en células C6/36 HT en ausencia de suero, tratadas con la PGE ₂ y la dexametasona.....	74
Figura 23.	Expresión del gen <i>Aea/RACK1</i> en células C6/36 HT en ausencia de suero y tratadas con dexametasona.....	75

Figura 24.	Localización por microscopía confocal de <i>Aea/RACK1</i> en células C6/36 HT en ausencia de suero, tratamiento con la PGE ₂ y la dexametasona.....	76
Figura 25.	Identificación de los sitios de fosforilación en el dominio WD-IV responsable de la dimerización de <i>AeaRACK1</i>	84
Figura 26.	Sitios de unión a factores de transcripción putativos río arriba del gen <i>Aea/RACK1</i>	92

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Proteínas fosforiladas de las células C6/36 HT identificadas por LC-MS/MS.....	45
Tabla 2.	Clasificación funcional de 37 proteínas fosforiladas e identificadas por LC-MS/MS.....	55
Tabla 3.	Identificación de la proteínas <i>Aea/RACK1</i> en la línea celular C6/36 HT por E-2D/WB y LC-MS/MS.....	61
Tabla 4	Proteínas asociadas a <i>Aea/RACK1</i> en condiciones de ayuno de las células C6/36 HT identificadas por MALDI/TOF/TOF.....	69
Tabla 5.	Clasificación funcional de 33 proteínas identificadas por inmunoprecipitación y espectrometría de masas.....	72

RESUMEN

Las enfermedades transmitidas por mosquitos vectores son problemas de salud pública en el mundo e incluyen enfermedades virales como la fiebre amarilla, chikungunya y dengue transmitidas por *Aedes aegypti* y *Ae. albopictus* y la malaria, enfermedad parasitaria transmitida en el humano por mosquitos *Anopheles sp.* Los mosquitos vectores responden a diversos estímulos ambientales como los xenobióticos y a las infecciones por diferentes microorganismos patógenos adquiridas durante la alimentación con sangre, estos estímulos activan procesos celulares para contrarrestar la toxicidad e infecciones, entre ellos su sistema de detoxificación como los dependientes de la glutatión-S-transferasa, la familia de P450 y las esterasas; respuesta a estrés oxidativo, activando un sistema antioxidante compuesto por enzimas como la superóxido dismutasa, catalasa, peroxiredoxina entre otras, así como el sistema inmune innato (celular y humoral). Estos procesos se regulan por fosforilación/desfosforilación. En la homeostasis participan hormonas que incluyen a las prostaglandinas de los mosquitos, así como las contenidas en la sangre adquirida durante la alimentación y estas hormonas regulan, entre otros procesos, el sistema reproductivo, la conducta y el sistema inmune, pero no se conoce que proteínas de señalización activan y si éstas son fosforiladas/desfosforiladas. El objetivo de este trabajo fue analizar cambios en las proteínas fosforiladas en la línea celular C6/36 HT derivada de embriones de *Ae. albopictus* bajo el efecto de PGE₂. Se identificaron varias proteínas que modificaron su fosforilación ante la presencia de la hormona PGE₂ y de su inhibidor dexametasona así como a la ausencia de suero en el medio de cultivo. Estas proteínas incluyeron proteínas de plegamiento y ensamble (endoplasmina, HSP90, chaperonina), de respuesta a estrés oxidativo, proteínas de citoesqueleto, proteínas de procesos metabólicos, transporte de membrana, asociadas a calcio, y proteínas de señalización (RACK1). Los cambios en las proteínas fosforiladas sugieren que cada tratamiento aplicado a las células C6/36 HT activa vías de señalización particulares. PGE₂ activó la fosforilación de las proteínas de choque térmico y de estrés oxidativo, el cual sugiere que PGE₂ activa respuestas celulares relacionadas a estrés oxidativo.

En células incubadas en medio de cultivo sin suero y tratamiento con la dexametasona se encontró fosforilada *Aea/RACK1* y desfosforilada en tratamiento con la PGE_2 , estos cambios en la fosforilación de RACK1 puede estar indicando que participa en diferentes vías de señalización. RACK1 es una proteína conservada en todos los eucariontes con múltiples funciones fisiológicas como: proteína adaptadora, regulando eventos celulares incluyendo traducción y señalización. *Aea/RACK1* se caracterizó por su posible papel en la regulación de la homeostasis celular. Se detectaron dos especies de la proteína (diferente peso molecular y diferente pI) posiblemente por modificaciones postraduccionales, como fosforilación o glucosilación. Se observó su localización subcelular en diferentes compartimentos lo que sugiere una respuesta diferencial dependiendo del tipo de estrés y dirigiendo una respuesta específica y eficaz para la supervivencia. Por experimentos de inmunoprecipitación se encontró que *Aea/RACK1* se une a proteínas del ribosoma y de señalización. Se concluye que *Aea/RACK1*, como en otros sistemas, es un componente dinámico del ribosoma que cuando se asocia a él probablemente modula la traducción y que cuando esta disociada regula otras funciones como: proliferación, diferenciación respuesta a estrés oxidativo, apoptosis, respuesta inmune entre otras.

ABSTRACT

Diseases transmitted by mosquitoes are public health problems around the world, like yellow fever, chikungunya and dengue fever transmitted by *Aedes aegypti* and *Ae. Albopictus*, or malaria transmitted by *Anopheles sp.* The vector mosquitoes respond to environmental stimuli as xenobiotics and infections by different pathogen microorganisms during blood feeding. These stimuli activate cellular processes to counteract the toxicity and infections, including the detoxification systems depending of the glutathione-S-transferase, P450 family and esterases; activating an antioxidant system composed of enzymes as superoxide dismutase, catalase, peroxiredoxin and the innate immune system (cellular and humoral). These processes are regulated by phosphorylation and dephosphorylation. In addition, hormones as prostaglandins of the mosquito and those acquired during blood feeding, participate in regulation of homeostatic responses and these hormones regulate the reproductive system, behavior and immune system, but is unknown their effect on the phosphorylation and dephosphorylation of signaling proteins. The objective of this study was to analyze the changes in phosphorylated proteins in the C6/36 HT cell line (derived from embryos of *Ae. Albopictus*) due to PGE₂ effect. Proteins with different functions changed their phosphorylation levels in the presence of PGE₂, its inhibitor dexamethasone or serum deprivation, they were identified and included: folding and assembly (endoplasmic reticulum chaperonin); oxidative stress response; cytoskeleton proteins, proteins of metabolic processes and signaling proteins (RACK1). Stimuli-dependent changes in the phosphorylated proteins suggest that each treatment applied to the C6/36 cells HT activate specific signaling pathways. PGE₂ activated the heat shock proteins phosphorylation suggesting that PGE₂ activate cellular responses related to oxidative stress. In serum starvation, PGE₂ and dexamethasone experimental conditions there were found changes in RACK1 phosphorylation.

RACK1 is a conserved protein in all eukaryotes, with multiple physiological functions as adaptor protein, regulating cellular events including translation and pathway signaling. *Aea/RACK1* was characterized by its possible role in the

regulation of cellular homeostasis. Two species (different molecular weight and different pI) of the protein were detected, possibly differing in posttranslational modifications, such as phosphorylation or glycosylation. It was observed that subcellular location of *Aea/RACK1*, was different depending of the type of stress. In addition, by immunoprecipitation experiments, it was found that *Aea/RACK1* associate to ribosome and signaling proteins, suggesting that *Aea/RACK1*, similar to other systems, is a dynamic component of the ribosome and when it is associated probably modulates de translation and when it is released could develop other regulatory functions.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Clasificación de los insectos

Los insectos se agrupan en la clase insecta que se divide a su vez en dos subclases la Entognatha y Ectognatha. La subclase Ectognatha presenta 25 órdenes, encontrando a los Anoplura (piojos chupadores), Coleóptera (escarabajos y gorgojos), Lepidóptera (mariposas y polillas), Himenóptera (Hormigas, abejas, avispas, etc.), Díptera (moscas, mosquitos, etc.) entre otros (Trautwein *et al.*, 2012).

En el orden Díptera encontramos a más de 250 000 especies ubicadas en 12 familias y varias de estas especies tienen importancia médica y veterinaria. Una de las familias más importantes del orden es la Culicidae, donde localizamos a los mosquitos con cerca de 3 500 especies y subespecies distribuidas en todo el mundo. Los principales mosquitos de esta familia se encuentran ubicados los géneros; *Anopheles*, *Culex* y *Aedes* (Le Goff *et al.*, 2012).

Una de las características más relevantes de los culícidos es la hematofagia (alimentación con sangre), hábito exclusivo de las hembras, que emplean las proteínas, lípidos, carbohidratos y hormonas como las **prostaglandinas (PGs)** contenidas en la sangre para la maduración de los huevecillos. Por este hábito los mosquitos hembras transmiten enfermedades virales y parasitarias a humanos, tales como la malaria, filariasis linfática, encefalitis del Oeste del Nilo, fiebre amarilla, fiebre dengue y chikungunya (Scott *et al.*, 2012). La transmisión de los arbovirus está asociada con insectos de la subfamilia *Culicidae*, los parásitos de la filaria linfática con la subfamilia *Culicidae* y la subfamilia *Anophelinae* y los parásitos que causan la malaria con los *Anophelinae* (Nene *et al.*, 2007).

1.2 Prostaglandinas

Las PGs y otros eicosanoides son derivados oxigenados del ácido araquidónico (AA) y otros dos ácidos grasos poliinsaturados de 20 carbonos (20-C). Los tres principales grupos de eicosanoides reconocidos son: PGs derivadas de la vía de las cicloxigenasas (COX), Leucotrienos derivados de la vía de la lipoxigenasa (LOX) (Stanley 2011). Las PGs son derivados de los ácidos grasos de 20-C que se encuentran de forma ubicua en todos los tejidos y órganos mediando funciones fisiológicas y patológicas (Dey 2006).

1.2.1 Síntesis de prostaglandinas

La biosíntesis de las PGs comienza a partir de ácidos grasos liberados de los fosfolípidos de membrana por acción de la fosfolipasa A₂ (PLA₂). Estos ácidos grasos son convertidos en ácido araquidónico, que es el sustrato común para la síntesis de toda la familia de eicosanoides que incluye las PGs, tromboxanos, lipoxinas y leucotrienos, todas estas moléculas tienen actividades biológicas importantes. La síntesis de estas moléculas depende de un primer paso de conversión por las ciclooxigenasas 1 y 2 (COX 1/2) y posteriormente por las sintetasas (oxidoreductasas) específicas para cada uno de las moléculas de PGs (Reader *et al.*, 2011). Las PGs derivadas del ácido araquidónico (AA) son: PGE₂, PGD₂, PGI₂, PGF_{2α} y tromboxano A₂ (TXA₂) (Reader *et al.*, 2011) (Dey *et al.*, 2006; Figura 1).

1.2.2 Inhibidores de la síntesis de prostaglandinas

Los inhibidores de la cascada del AA pertenecen a los fármacos anti-inflamatorios y son utilizados para el tratamiento de condiciones inflamatorias patofisiológicas. Estos inhibidores se clasifican en drogas anti-inflamatorias no-esteroides (NSAIDs, por sus siglas en inglés) y esteroides (glucocorticoides). Los NSAIDs inhiben a la enzima COX y los glucocorticoides a la enzima PLA₂. Los eicosanoides son sintetizados *de novo* desde el AA, éste es liberado de los fosfolípidos de la membrana plasmática de las células por las fosfolipasas principalmente la PLA₂ α citosólica (Meirer *et al.*, 2014). Un inhibidor de la PLA₂ es la dexametasona. La dexametasona es un glucocorticoide sintético de la clase de fármacos esteroides con propiedades anti-inflamatorias y tiene efectos pleiotropicos en diferentes vías de señalización que dan como resultado la expresión de genes como *DUSP1* (Fosfatasa 1 de especificidad dual), *GILZ* (cremallera de leucina inducible por glucocorticoides), *AnxA1* (Anexina A1): la expresión de estos genes pueden interferir con vías de señalización que son activadas por estímulos pro-inflamatorios (Clark *et al.*, 2007, Guerrero *et al.*, 2011).

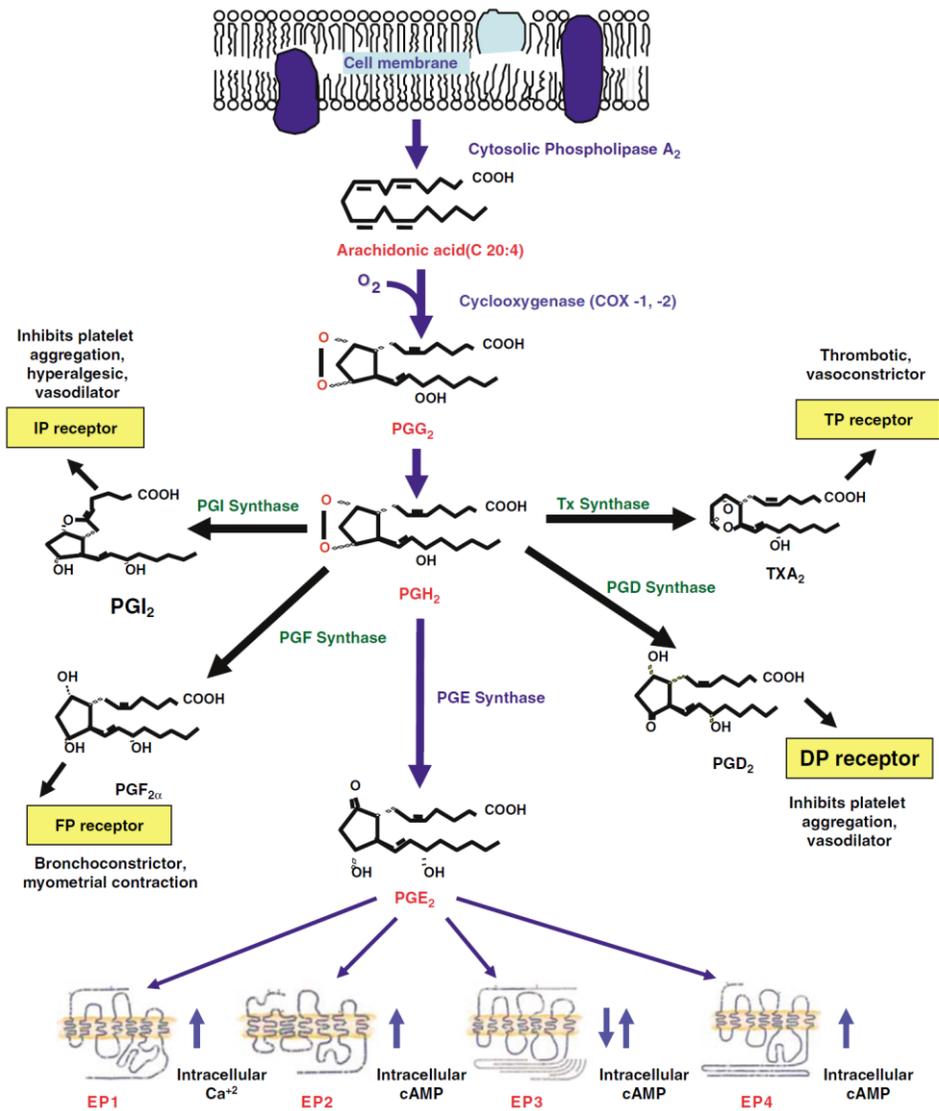


Figura 1. Biosíntesis de prostaglandinas. El ácido araquidónico liberado por la acción de la fosfolipasa A₂ es metabolizado por las ciclooxigenas produciendo PGG₂ que se transforma a PGH₂ que es el sustrato de las sintasas específicas que dan lugar a PGs individuales, las cuales tienen sus receptores específicos como DP, IP, FP, EP1, EP2, EP3, EP4 y TP (Dey *et al.*, 2006).

1.2.3 Receptores prostanoideos

Los receptores prostanoideos pertenecen a la familia de receptores tipo rodopsinas caracterizados por siete dominios transmembrana que están acoplados intracelularmente a diferentes proteínas G. Se conocen cinco tipos de receptores prostanoideos; prostanoide D (DP), prostanoide E (EP), prostanoide F (FP), prostanoide I (IP) y prostanoide T (TP), para la PGD_2 existen 2 receptores DP_1 , DP_2 , para PGE_2 hay cuatro receptores EP_1 , EP_2 , EP_3 , EP_4 , los cuales activan señales a través de segundos mensajeros como el calcio (Ca^{2+}) o la adenosina monofosfato cíclico (AMPc), el resultado de la activación de los segundos mensajeros son las cinasas para regular diversas funciones celulares a través de la fosforilación/desfosforilación (Dey *et al.*, 2006. Fig. 2).

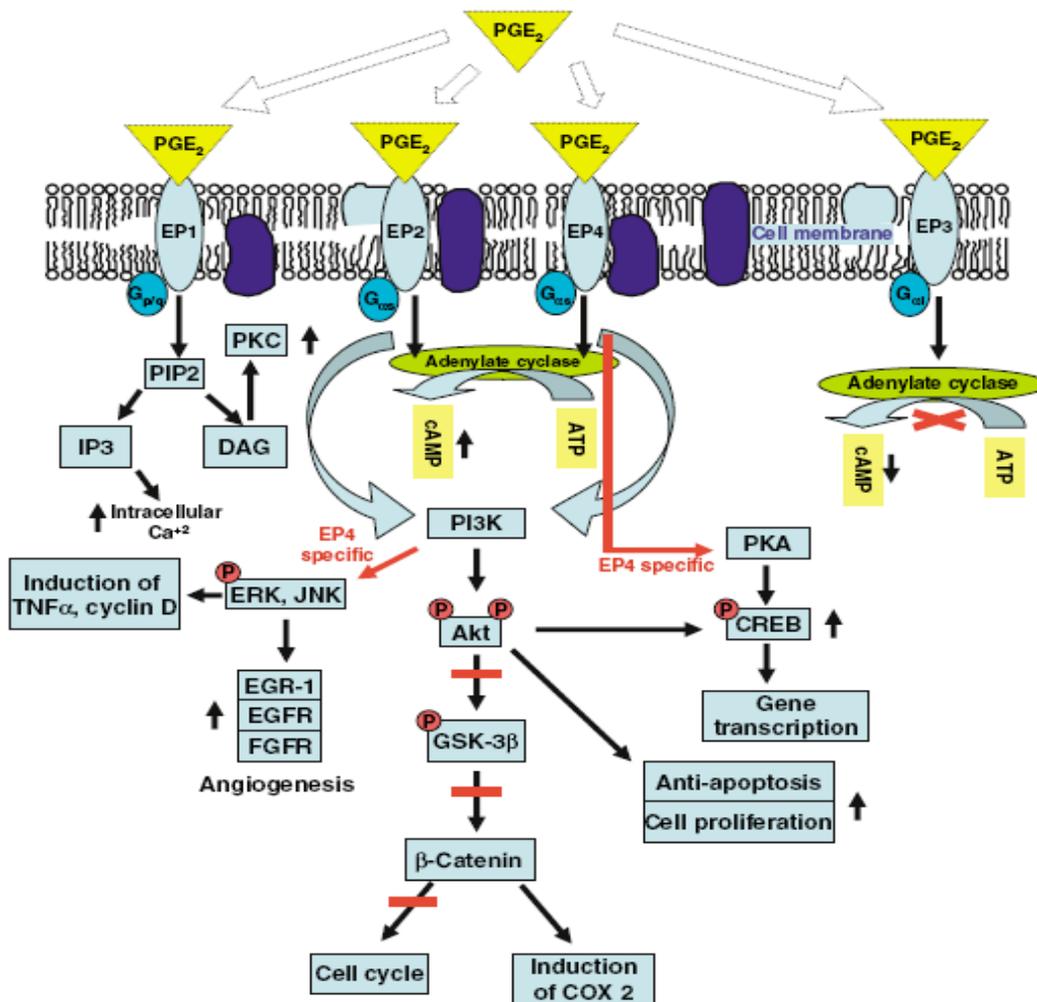


Figura 2. Vías de señalización mediadas por receptores EP-PGE₂. Cuatro tipos de receptores EP participan en las vías de señalización mediante la interacción con diferentes proteínas G (p/q, as y ai) usando diferentes segundos mensajeros. PGE₂ incrementa el Ca²⁺ intracelular o la producción de AMPc y estos procesos se inician por la señal a través de receptores EP1 o EP2/4. Sin embargo el AMPc intracelular disminuye cuando la señal es a través del receptor EP3. Diferentes cinasas participan en la vía de señalización inducida por PGE₂. La unión de EP4-PGE₂ induce TNF_α, ciclina D y angiogénesis usando una vía específica que es mediada por diferentes MAP cinasas (Dey *et al.*, 2006).

1.3 Función de las prostaglandinas en condiciones de estrés en vertebrados

La mayoría de las células producen proteínas de choque térmico (HSPs) cuando son expuestas a estrés biológico tales como el calor y sustancias químicas. Estas HSPs se clasifican por su peso molecular, se conoce como HSPs de peso molecular alto tales como HSP90 y HSP70. Estas actúan como chaperonas moleculares para el plegamiento de proteínas, oligomerización y translocación; las de peso molecular bajo entre 15 a 30 kDa, tales como HSP27 también pueden actuar como chaperonas moleculares (Kozawa *et al.*, 2001). La expresión de las HSPs es regulada por factores de transcripción de choque térmico (HSFs) y la activación de las HSF se lleva a cabo en diversas maneras, según el caso, como la liberación de HSF de las proteínas inhibitorias, trimerización, translocación y fosforilación (Cornelussen *et al.*, 2001). Las PGs ciclopentanonas (cyPG) tienen actividad antiviral e inducen la síntesis de proteínas de choque térmico a través del factor de transcripción conocido como factor 1 de choque térmico (HSF1) (Kaul *et al.*, 2011). La PGD₂ induce la expresión de HSP27 a través de la vía MAPK p44/p42 y MAPKp38 en osteoblastos (Kozawa 2001). También se ha documentado que PGE₁ tiene efecto protector en la célula (Togo *et al.*, 2008) sugiriendo que después de una hepatectomía masiva, PGE₁ puede prevenir la insuficiencia hepática aguda mediante la producción de HSP70 en el hígado residual. Por otra parte, se ha demostrado que PGD₂, PGE₂, PGA₁ y PGA₂ inducen la expresión del RNAm de la peroxiredoxina 6 (Prx 6) en macrófagos derivados de médula ósea (Erttmann *et al.*, 2011). Peroxiredoxina (Prx) es una familia de enzimas antioxidantes que tienen actividad peroxidasa la cual reduce el peróxido de hidrógeno a agua en la presencia de un donador de electrón. Las Prxs se clasifican por el número de residuos de cisteínas involucradas en la actividad peroxidasa (Park *et al.*, 2014). La enzima 2-Cys Prx tiene distintas funciones en diversos procesos celulares tales como: proliferación, migración, apoptosis y metabolismo entre otros, gracias a sus diversas isoformas que se localizan en diferentes compartimentos celulares. Por ejemplo Prx1 y Prx2 son las enzimas antioxidantes más abundantes en el citosol y Prx3 es la principal peroxidasa mitocondrial responsable de la eliminación del peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (Park

et al., 2014). Las 2-Cys Prxs están asociadas a las redes de fosforilación y sus actividades se regulan por fosforilación. Chang *et al.*, (2002) reportaron que las 2-Cys Prxs contienen una secuencia de fosforilación.

1.4 Función de las prostaglandinas en invertebrados

Las prostaglandinas también participan en la fisiología de los invertebrados como se demostró en estudios previos utilizando inhibidores de la síntesis y secreción basal de las PGs. Los eicosanoides se han implicado en la regulación del sistema inmune de los insectos, especialmente en la formación de nódulos. La formación de nódulos ocurre rápidamente después del desafío inmune e inicia con la agregación de hemocitos, los cuales forman una estructura multicelular o nódulo que atrapa en su interior una gran cantidad de bacterias. El papel de las PGs en la regulación de la respuesta inmune en los insectos se encuentra actualmente en estudio (Stanley y Kim, 2011).

En *An. albimanus* se demostró que diferentes órganos del mosquito producen PGE₂ y que ésta participa en la respuesta inmune del mosquito. La PGE₂ se incrementa en el cuerpo graso y estómago desafiados con bacterias muertas por calor y modula la expresión de los RNAm que codifican para tres péptidos antimicrobianos (García Gil de Muñoz *et al* 2008).

En el caso de las células C6/36 (línea celular de embriones de *Ae. albopictus*) se describió que la PGA₁ inhibe la replicación del virus de la estomatitis vesicular (VSV) e induce la síntesis de la proteína HSP70 en células no infectadas (Burlandy *et al.*, 2004).

En *Spodoptera exigua* se investigó la relación entre el péptido de extensión de los plasmatócitos (Plasmatocyte-spreading peptide, PSP) y la señalización de las PGs y se demostró que PSP y PGE₂ median independientemente la función del hemocito y que inhibidores de PLA₂ inhiben la función del hemocito de modo dependiente de la dosis y los mismos inhibidores la función del hemocito estimulado por el PSP también dependiendo de la dosis (Srikanth *et al.*, 2011).

Por otra parte los inhibidores de los eicosanoides tienen diferentes efectos sobre las células. Por ejemplo, las PGE₁ y PGA₁ en células BCIRL-HzAM1 de *Helicoverpa zea* influyen sobre la expresión de al menos 30 proteínas incluyendo la HSP70 (Stanley *et al.*, 2008). Igualmente, la Dexametasona, drogas esteroidea tipo glucocorticoide que es un potente inhibidor sintético de la síntesis de PGs, presenta efectos pleiotrópicos en la fisiología de los insectos. En otro estudio con larvas de *Pieris brassicae* (mariposa de la col) infectadas con el hongo fitopatógeno *Beauveria bassiana* y tratadas con diferentes inhibidores de prostaglandinas (dexametasona, naproxeno, fenidona y esculetina) se observó que las larvas presentaron mayor susceptibilidad a infecciones, registrándose un alto porcentaje de mortalidad (Tunaz *et al.*, 2006).

1.5 Respuesta inmune en insectos

Los insectos carecen de un sistema inmune adaptativo basado en anticuerpos como en los vertebrados. La inmunidad de los insectos es exclusivamente innata (Stanley y Kim, 2011). La inmunidad innata es la primera línea de defensa de organismos multicelulares que reaccionan a varios estímulos como a invasores patógenos, ambiente, xenobióticos entre otros y es regulada por el reconocimiento de patrones moleculares asociadas a patógenos (PAMPs) y por diferentes receptores que reconocen a los PAMPs provocando cascadas de señalización (Myllymaki *et al.* 2014). La respuesta inmune innata se divide en respuesta inmune celular y humoral. En la respuesta inmune celular se encuentran procesos de fagocitosis, nodulación y melanización. La respuesta inmune humoral se caracteriza por la síntesis de varios péptidos antimicrobianos (AMPs), proteínas de unión a tioleter (TEPs) y la activación de la cascada de la fenoloxidasas (Syatavathi *et al.*, 2014).

En experimentos con mosquitos usando como estímulo a lipopolisacáridos (LPS) y bacterias, es posible inducir la respuesta inmune, tanto celular como humoral. En líneas celulares de insecto y en mosquitos estos mismos estímulos inducen la expresión de moléculas implicadas en inmunidad como péptidos antimicrobianos de varios tipos como defensinas, cecropinas y gambicinas (García Gil de Muñoz *et*

al., 2008; Wang *et al.*, 2014; Merchant *et al.*, 2008) y otras proteínas incluyendo transferrinas y lisozima (Mizutani *et al.*, 2003).

En cuanto a las reacciones de defensa celular, éstas se caracterizan por interacciones directas entre los hemocitos del insecto con organismos invasores externos. Las reacciones de defensa celular incluyen: fagocitosis, micro agregación, nodulación, melanización y en el caso de invasores grandes, la encapsulación (Buchon *et al.*, 2014; Krautz *et al.*, 2014). La fagocitosis la realizan principalmente los plasmocitos o granulocitos y otros hemocitos como los oenocitoides que también pueden internalizar patógenos (Krautz *et al.*, 2014). En mosquitos *Ae. aegypti* se han descrito los granulocitos oenocitoides y prohemocitos; los granulocitos tienen función fagocítica mientras que los oenocitoides exhiben actividad fenoloxidasa (phenoloxidasa, PO), y estos tres tipos de hemocitos están presentes en larvas, pupas y adultos (Strand, 2008).

1.5.1 Fagocitosis

La fagocitosis es una actividad celular conservada que algunos tipos celulares la despliegan para llevar a cabo la defensa, en la cual la unión de la partícula blanco al receptor induce la formación de un fagosoma lo que resulta en la internalización del blanco vía mecanismos dependientes de la polimerización de actina. Posteriormente el fagosoma madura, dando origen a un fagolisosoma, por una serie de eventos de fisión y fusión con endosomas y lisosomas y así destruir a los patógenos. En insectos la fagocitosis se lleva a cabo principalmente por los plasmocitos o granulocitos que circulan en la hemolinfa (Marmaras y Lampropoulou., 2009; Syatavathi *et al.*, 2014).

1.5.2 Encapsulación

La encapsulación ocurre cuando múltiples hemocitos se unen y rodean a invasores grandes como parásitos o nematodos, que no pueden ser internalizados por una sola célula. Después de la unión al agente patógeno los hemocitos forma una cápsula con multicapas, Este proceso se acompaña de melanización. Dentro de la cápsula los patógenos mueren por el efecto de radicales libres como las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno o por asfixia (Strand M 2008; Marmaras y Lampropoulou, 2009; Satyavathi *et al.*, 2014).

1.5.3 Nodulación

El proceso de nodulación se refiere a agregados multicelulares que forman los hemocitos para atrapar a un gran número de bacterias. El proceso de nodulación requiere del reconocimiento de moléculas tanto del hemocito como de los microorganismos invasores. Se sabe que la formación de nódulos es mediada por lectinas, pero esta hipótesis todavía no ha sido confirmada; sin embargo, si está relacionada con la producción de eicosanoides, profenoloxidasa (proPO) y DOPA decarboxilasa (Dcd) en los hemocitos (Strand M 2008; Marmaras y Lampropoulou., 2009; Satyavathi *et al.*, 2014).

1.5.4 Melanización

La melanización es un proceso de defensa contra los patógenos diversos a través de una cadena de reacciones que llevan a la producción de melanina. La melanina participa en los diferentes procesos inmunes, incluyendo la formación de nódulos y cápsulas y en la curación de heridas, además de que inicia vías de señalización que activan otras actividades de los hemocitos (Satyavathi *et al.*, 2014). La síntesis de melanina depende de la activación de la enzima fenoloxidasa (PO) por lipopolisacáridos, peptidoglucanos y glucanos que poseen los patógenos. La melanina se forma a partir del amino ácido fenilalanina el cual es hidroxilado a tirosina por la fenilalanina hidroxilasa. La tirosina es hidroxilada por la PO para producir dihidroxi-fenil-alanina (DOPA). DOPA tiene dos vías para transformarse en 5,6 dihidroxiindol (DHI). En la primera vía DOPA se decarboxila por la enzima

Ddc a dopamina y dopamina se oxida por PO a dopamina-quinona. Dopamina-quinona es convertida espontáneamente sin la participación de enzimas a DHI. En la segunda vía DOPA se oxida por PO a dopaquinona. Dopaquinona es convertida a dopacromo por reacción espontánea no enzimática. Dopacromo se descarboxila generando DHI. El DHI es oxidado por PO para formar 5-6 indolequinona y finalmente, la indolequinona se polimeriza a eumelanina (Fig. 3). Dopamina es un sustrato importante y punto de bifurcación para los metabolitos derivados de dopamina tanto por la vía de la PO o a través de enzimas de otras vías metabólicas, participando en neurotransmisión, esclerotización cuticular, fagocitosis y curación de heridas (Marmaras y Lampropoulou 2009; González-Santoyo y Córdoba-Aguilar., 20012; Satyavathi *et al.*, 2014).

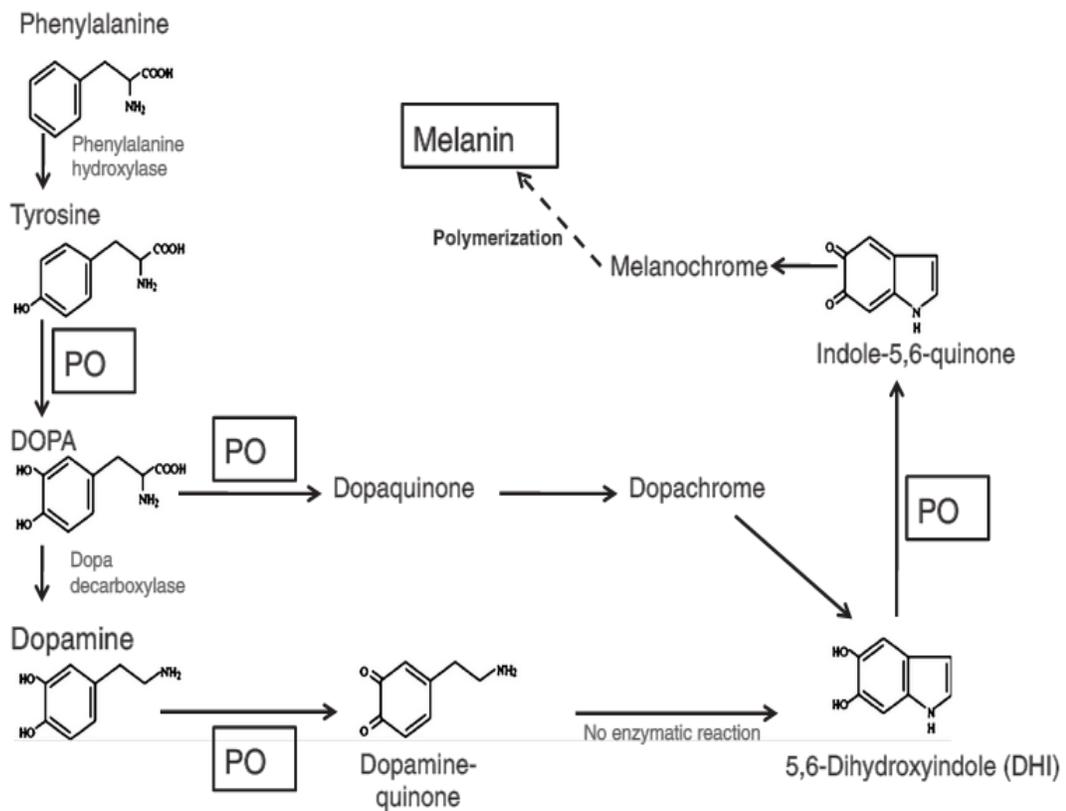


Figura. 3. Síntesis de melanina. Fenoloxidasas (PO) participan en la formación de DOPA a partir de tirosina (Tyr). PO convierte a DOPA en dopaquinona y 5,6 dihidroxiindol (DHI) y DHI a indol-5,6-quinona. La vía alterna para obtener DHI es de la dopamina la cual PO está participando.

1.5.5 Fenoloxidasa en el sistema inmune de los invertebrados

La fenoloxidasa es un miembro del grupo de las tirosinasas (oxidasas) y su función principal es la oxidación de los fenoles. Las proteínas oxidasas de las diferentes especies tienen diferentes propiedades estructurales, distribución y localización celular. La mayoría de las proteínas oxidasas poseen un sitio activo conocido como centro binuclear, que tiene tres cobres y está rodeado por tres residuos de histidina (González-Santoyo y Córdoba-Aguilar., 20012). Las POs se expresan como zimógenos inactivos (proPOs) en todos los insectos y son convertidas a POs activas cuando se requieren. La síntesis de proPO ocurre en los hemocitos. En *Drosophila melanogaster* ocurre en las células cristal, mientras que en mosquitos se sintetiza en los hemocitos granulares y oenocitoides. Las proPO pueden activarse de manera natural en los insectos por lípidos anfífilos como el isolecitina y por daño celular, al igual que por otros activadores naturales son el beta-1,3 glucano, lipopolisacáridos y peptidoglicanos. Todas estas moléculas se han identificado en varios patógenos como las bacterias Gram +, bacterias Gram- y hongos, y provocan cambios conformacionales en la proPO, lo que origina un sitio de unión accesible para el sustrato (González-Santoyo y Córdoba-Aguilar., 20012). Hay dos clases de sustratos en insectos para las POs: (1) monofenoles como tirosina o tiramina, (2) catecol como 1,2 dihidroxibenceno, 4-metilcatecol, DOPA, dopamina, N-acetildompamina (NADA), N-β-alanildopamina (NBAD), de estas moléculas DOPA es la más usada para ensayos de actividad PO. Dopamina, NADA y NBAD por sus propiedades oxidativas y solubilidad pueden emplearse como agonistas de las PO (González-Santoyo y Córdoba-Aguilar., 20012).

Las POs catalizan tres tipos de reacciones en el proceso de melanogénesis: (1) hidroxilación de un monofenol, (2) oxidación de o-difenol y (3) dehidrogenación de un dihidroxiindole. Sin embargo las POs en insectos y tirosinasas en mamíferos tienen diferentes secuencias de amino ácidos en la estructura de la proteína (González-Santoyo y Córdoba-Aguilar., 20012).

1.5.6 Producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)

En los mosquitos el epitelio del estómago interacciona con microorganismos que entran, sea por la ingestión de néctares vegetales o de sangre, lo cual activa la respuesta inmune innata (respuesta celular y humoral) y entre otras reacciones se producen radicales libres como las especies reactivas de oxígeno (ROS) por la oxidasa dual (Duox) (Oliveira *et al.*, 2012). Otra vía de producción de ROS durante la alimentación con sangre es cuando la hemoglobina, es digerida en el estómago del mosquito liberando grandes cantidades del grupo prostético hemo. El grupo hemo tiene efectos pro-oxidantes y citotóxicos. La generación de ROS por el sistema inmune y la liberación del grupo hemo pueden causar daño en los insectos hematófagos por el estrés oxidativo que provocan (Oliveira *et al.*, 2011). Se ha documentado que el estrés oxidativo incrementa en los insectos la producción de enzimas anti-oxidantes. En larvas de polilla de la cera (*Galleria mellonella*) se observó que los inhibidores de prostaglandinas (esculetina, dexametasona y fenidona) inducen la activación de las enzimas súper óxido dismutasa, glutatión-S-transferasa, glutatión peroxidasa y una disminución de la actividad catalasa en la hemolinfa. La activación de las enzimas anti-oxidantes resultó similar a la inducida por la xantotoxina (inductor de ROS) (Büyükgüzel *et al.* 2010).

1.6 Vías de señalización del sistema inmune en insectos

Las células poseen sistemas que les permiten “sentir” las condiciones del ambiente y mandar señales al interior, de tal manera que se inicie la transcripción de genes adecuados y sinteticen proteínas funcionales para adaptarse a las condiciones del ambiente. Un mecanismo muy frecuente de activación/desactivación de proteínas en estas cadenas de transducción es la fosforilación/defosforilación, un tipo frecuente de modificación post-traducciona (Deribe *et al.*, 2010). En los insectos el sistema inmune tiene vías de señalización que regulan su actividad en respuesta al ataque de patógenos donde la fosforilación/defosforilación de proteínas tiene gran importancia (Myllymaki *et al.*, 2014). La fosforilación de proteínas es el tipo de modificación post-traducciona

más usado en la transducción de señales y se encuentra en todos los procesos celulares básicos incluyendo metabolismo, crecimiento, división, diferenciación, movilidad, tráfico de organelos, transporte de membrana, contracción muscular e inmunidad. La fosforilación de proteínas es mediada por cinasas que catalizan la transferencia de un fosfato del ATP a amino ácidos específicos de la proteína. Por lo general la fosforilación ocurre en residuos de serina (Ser) treonina (Thr) y tirosina (Tyr) (Deribe *et al.*, 2010).

Varias vías de señalización se han descrito para la respuesta humoral de los insectos y a la fecha las más estudiadas son: la vía Toll, la vía inmunodeficiente (Imd) y la Jak-Stat, las cuales son capaces de reconocer diferentes clases de patógenos para activar la expresión de genes que codifican péptidos antimicrobianos específicos como cecropina, atacina, gambicina y genes relacionados con el estrés como *totA*, *Tep1* (Kingsolver *et al.*, 2013; Krautz *et al.*, 2014; Myllymaki *et al.*, 2014). La vía Toll responde a bacterias Gram-positivas y hongos, activando factores de transcripción similares al Factor Nuclear kappa B (NF- κ B) como son REL 1A y REL 1B, resultando en la activación de genes efectores como los productores de péptidos antimicrobianos como cecropina y defensina entre otros. Por otra parte, la vía Imd reconoce bacterias Gram-negativas activando al factor de transcripción NF- κ B/REL 2 y se activa la expresión de genes que codifican péptidos antimicrobianos como atacina y diptericina entre otros (Satyavathi *et al.*, 2014; Myllymaki *et al.*, 2014). Finalmente se ha descrito que en el cuerpo graso de *Drosophila* la vía Jak-Stat induce la expresión de genes que responden al estrés como *totA* y *Tep1*, cuyos productos son proteínas que contienen enlaces tioléster y están implicadas en la lisis de los microorganismos patógenos (Kingsolver *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013) (Kim y Kim, 2005, Fig. 4)

Otros estudios indican que existe interrelación entre estas tres vías de señalización propias de los insectos, ya que se observó que durante el desarrollo de *Drosophila* la cinasa activada por el factor de crecimiento transformante β (dTAK) puede actuar como un componente que modula también la vía de

transducción de señal de la Jun-N-cinasa (JNK). Además, en el desarrollo del ojo de *Drosophila* dTAK también puede activar otras cinasas como MAPKs p38 y la cinasa Nemo (Mihaly *et al.*, 2001). La activación de dTAK requiere de una proteína de unión a dTAK (dTAB2) río arriba y el aumento en la expresión de dTAB2 permite la activación de la vía de señalización NF-kB/Relish (Zhuang *et al.*, 2006).

En la línea celular C6/36 derivada de mosquito *Aedes albopictus* se caracterizó una proteína parecida a JNK, que es activada en respuesta a infección por bacteria, LPS y choque térmico (Mizutani *et al.*, 2003 b). Otras MAPKs se han caracterizado en *Ae. aegypti* como p38 MAPK que participa en la regulación de la expresión del gen de la defensina después de la inducción por LPS (Chen-Chin Wu *et al.*, 2007), MEK3 aumenta la expresión cuando *Ae.aegypti* es inoculado con bacterias confirmando que participa en la respuesta inmune (Huang *et al.*, 2003).

En células de mamíferos se ha documentado que tanto la PGE₂ como inhibidores de su producción modulan la actividad de moléculas que participan en vías de señalización, y aunque en insectos se ha documentado que PGE₂ tiene efecto sobre la expresión de genes implicados en la respuesta inmune se desconocen las vías de señalización.

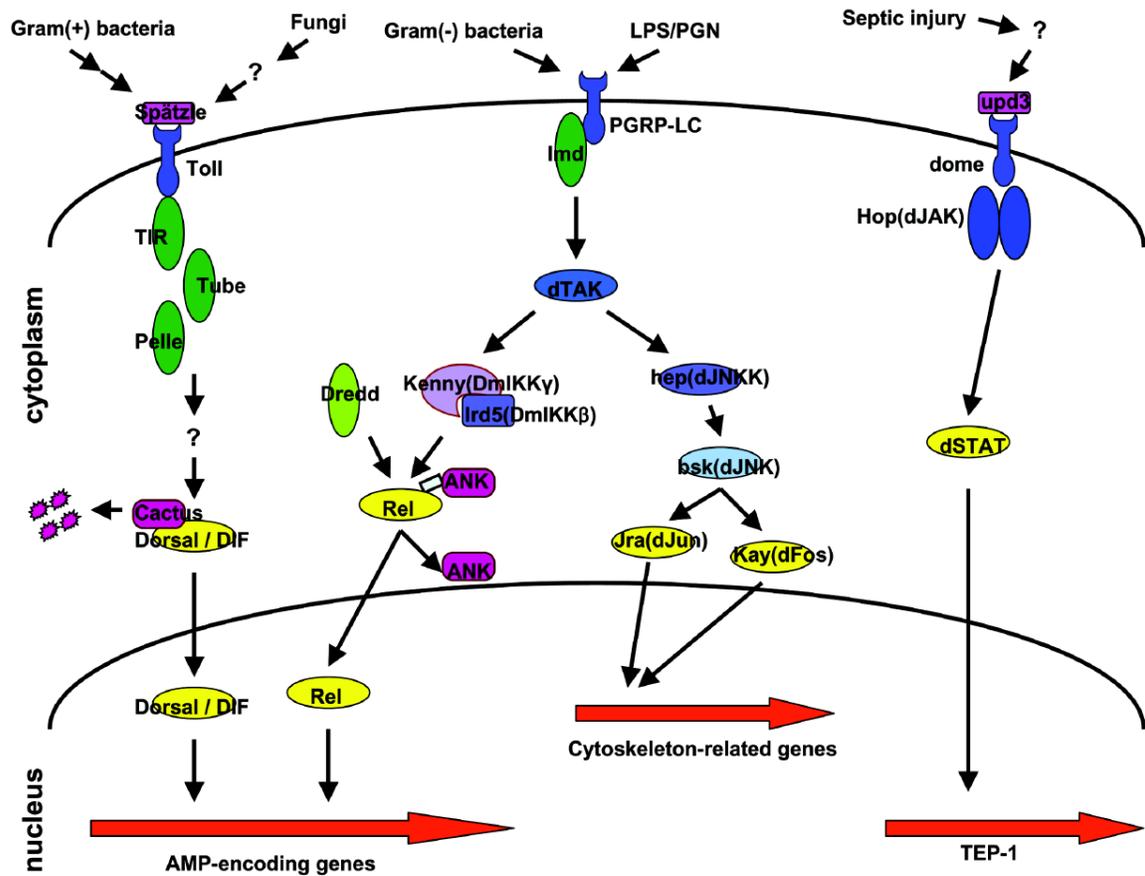


Figura 4. Las vías Toll, Imd y JAK-STAT controlan la expresión de genes relacionados con la respuesta a infección. En la vía Toll, Spätzle es procesado por una cascada de serina proteasas activadas durante la infección y se une a Toll, lo que activa una cascada de señalización intracelular y culmina en la degradación de Cactus y la translocación al núcleo de factores de transcripción parecidos al NF- κ B conocidos como Dorsal y Dif. La vía Imd se inicia con la activación de PGRP-LC, activándose la proteína Imd seguido de la activación de dTAK después de lo cual se bifurca en dos rutas, una con IKK y la otra con JNK. Relish se fosforila por el complejo IKK, es cortado a una forma pequeña activa que se transloca al núcleo para la expresión de genes. Alternativamente la vía JNK continua con la activación de Hep y Bsk los cuales en *Drosophila* se llaman dJNKK y dJNK y culmina con el ensamble de dAP1 (un homólogo al heterodímero de dJun y/o dFos). La vía JAK inicia con un receptor tipo citocina clase 1, Domeless (Dome), que inicia a la cinasa Hop (dJAK) que activa STAT que ahora forma un dímero que es translocado al núcleo para activar al gen TEP (Kim and Kim 2005)

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

2.1 Justificación

La transmisión de enfermedades virales y parasitarias a humanos por insectos vectores implica que el agente invasor debe evadir la respuesta inmune tanto del vector como del huésped vertebrado pues de otro modo su ciclo de transmisión se interrumpe. El sistema inmune de los insectos, incluyendo los mosquitos vectores es una respuesta innata, no adaptativa y sin memoria, pero capaz de eliminar una variedad de infecciones por protozoarios, helmintos y virus, aunque no siempre logra detenerlas (Buchon *et al.*, 2014). La activación del sistema inmune también es producida por agentes estresantes como los mismos patógenos, agentes químicos como xenobióticos e insecticidas y hormonas tales como las prostaglandinas (Rani *et al.*, 2015). Los sistemas efectores del sistema inmune incluyen respuestas celulares como la fagocitosis, nudulación, encapsulación y melanización, efectuadas por varios tipos de células presentes en la hemolinfa (hemocitos) y respuestas inmunes humorales, que incluyen la secreción de péptidos antimicrobianos, principalmente por las células del cuerpo graso, reacciones de melanización y generación de radicales como las ROS y las especies reactivas de nitrógeno (RNS) (Buchon *et al.*, 2014; Krautz *et al.*, 2014) y la mayor parte de estos procesos, si no todos, están regulados por vías de señalización, las cuales tienen como un mecanismo principal para su función la fosforilación/desfosforilación de proteínas específicas.

La respuesta inmune en insectos depende en primer lugar de la cascada de enzimas proteolíticas que conducen a la activación de la enzima fenoloxidasa (ruta de la proPO). Otro mecanismo de coordinación es la secreción de hormonas peptídicas por distintos órganos como el estómago y el cuerpo graso; también la producción y secreción de hormonas esteroides como la ecdisona o derivadas de terpenos como la hormona juvenil (HJ) (Evans y Wood., 2014). Otras hormonas menos estudiadas en sus efectos en el sistema inmune del insecto son las

prostaglandinas, pertenecientes al grupo de los eicosanoides, metabolitos oxidados del ácido araquidónico. Hay descripciones preliminares de que las PGs intervienen en varios aspectos de la inmunidad de los insectos incluyendo reacciones de defensa tanto humoral como celular a bacterias, hongos, parásitos y virus (Stanley y Kim, 2011).

En *Aedes sp.*, existen estudios en donde han identificado proteínas cinasas participantes de vías de señalización las cuales son activadas por bacterias y choque térmico incluyendo JNK, MEK3, p38 MAPK, pero las vías no se ha descrito en detalle, ni tampoco cuáles proteínas de vías de señalización o efectoras se fosforilan por la presencia de PGE₂, prostaglandina muy importante en la fisiología en vertebrados, y poco estudiada en insectos, aunque se tienen resultados preliminares que apuntan a que participa de manera significativa. En este trabajo se estudió el efecto de la PGE₂ en la fosforilación de proteínas, utilizando como modelo células de la línea C6/36 originada de embriones de *Ae. albopictus*.

3. HIPÓTESIS

La PGE₂ modifica la fosforilación de proteínas participantes en cascadas de señalización de respuestas al ambiente en células del insecto *Ae. albopictus*.

4. OBJETIVO GENERAL

Analizar las proteínas fosforiladas en células C6/36 derivadas de *Ae. albopictus* bajo tratamiento con PGE₂, para identificar y caracterizar alguna(s) que participe en vías de señalización.

4.1 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Comparar los perfiles de proteínas fosforiladas en células C6/36 en estado basal, en ausencia de suero, bajo tratamiento con la PGE₂ y la dexametasona, seleccionando aquéllas que presenten cambios en su fosforilación.
2. Identificar mediante MS proteínas que presenten cambios en su fosforilación.
3. Caracterizar una proteína específica implicada en señalización celular:
 - 3.1 Analizar la expresión del RNAm de la proteína fosforilada/desfosforilada de interés bajo tratamiento con PGE₂ y dexametasona.
 - 3.2 Investigar la localización de la proteína fosforilada/desfosforilada en las células C6/36 HT
 - 3.3 Investigar la asociación de la proteína fosforilada/desfosforilada con otras proteínas.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Línea celular C6/36 HT de *Ae.albopictus*

Las células C6/36 HT derivadas de *Ae. albopictus* (Iragashi, 1978; Kuno y Oliver, 1989) se cultivaron a 34°C en medio mínimo esencial (MEM; Gibco, Life Technology) suplementado con aminoácidos no esenciales (GIBCO BRL, Grand Island, NY), 7% de suero fetal bovino (SFB) (GIBCO BRL Grand Island, NY), vitaminas, 0.370 g/l de bicarbonato de sodio, 50 U/ml de penicilina y 50 U/ml de estreptomicina (Mosso *et al.*, 2008).

5.2 Viabilidad celular

Para los ensayos de viabilidad fueron utilizadas 3.4×10^6 células en fase exponencial crecidas en placas de 96 pozos, estas fueron lavadas suavemente con MEM libre de suero. Después a las células se les agregaron 100 μ l de MEM libre de suero (condición ayuno); o MEM libre de suero + dexametasona [DEXA, (11 β , 16 α),-9 fluoro 11, 17, 21- trihidroxi-16-1- metilpregna-1-4-diene-3, 20-dione (Sigma-Aldrich Corporation)], en concentraciones de (8, 13, 25, 38 y 51 μ M); MEM libre de suero + PGE₂ en concentraciones de 14, 28, 42, 85 y 142 μ M, y se incubaron por 30, 60 y 120 min. Células sin tratamientos se usaron como control. La viabilidad celular se evaluó usando el reactivo CellTiter 96® AQueous One Solution (Promega Corporation, Woods Hollow Road, Madison, WI, USA) siguiendo las indicaciones del protocolo del fabricante. Este es un método colorimétrico que tiene una solución del compuesto tetrazolium[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium] (MTS) y un reactivo acoplado a metosulfato de fenazina (PMS). El MTS es reducido por las deshidrogenasas presentes en las células metabólicamente activas formando formazán que es soluble en el medio de cultivo. La absorbancia del formazán a 490 nm fue medida directamente en las placas de 96 pozos (Corning, NY, USA) sin procesamiento adicional usando un lector de ELISA (ELx808™, BioTek® Instruments, Inc. Winooski, Vermont. USA).

Los experimentos se realizaron por triplicado. Los datos se realizaron por una ANOVA de un solo paso, donde la diferencias fueron consideradas significativas cuando $p \leq 0.05$.

5.3 Ensayo de apoptosis.

Para los ensayos de apoptosis se utilizó el kit de Annexin-V-Fluos (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Germany) siguiendo el protocolo del fabricante. Células C6/36 HT se crecieron en multicámaras de 24 pozos (1×10^6 /pozo), éstas se lavaron suavemente con MEM libre de suero y en pozos diferentes por triplicado se agregó: MEM libre de suero; MEM libre de suero + dexametasona (13 y 51 μM); y PGE_2 (28 y 142 μM), y todas las células tratadas se incubaron a 34°C por 120 min. Luego las células se lavaron con PBS, pH 7.2 y centrifugadas a $200 \times g$ por 5 min. El botón de células se disolvió en 100 μl de la solución de marcaje Annexin-V-fluos/Ioduro de propidio e incubadas a 25°C por 10 min. Después del marcaje, las células se analizaron en un citómetro de flujo (Cyan ADP Analyzer, Beckman Coulter). En cada experimento se analizaron 10000 células, y se utilizó el software versión 1.5 (Beckman Coulter Inc, CA, USA) para el registro y análisis. Los experimentos se realizaron por triplicado.

5.4 Tratamientos con fármacos a las células C6/36 HT

Para investigar los efectos de la PGE_2 , la dexametasona y la usencia de suero en el medio cultivo (S/Suero) en la fosforilación de proteínas, 7.5×10^6 células C6/36 HT en fase de crecimiento exponencial se lavaron suavemente con MEM libre de suero y luego al primer lote de células se le adicionaron 10 ml de MEM libre de suero, al segundo lote de células se le adicionaron 10 ml de MEM libre de suero + PGE_2 (28 μM), al tercer lote 10 ml de MEM libre de suero + dexametasona (13 μM) y todos los lotes se incubaron a 34°C por 2 h. Células sin tratamiento se usaron como control, y los experimentos fueron realizados por triplicado. Después de los tratamientos las células C6/36 HT se lavaron tres veces con buffer sultado salino (PBS) (137 mM NaCl, 10 mM KCl, 8.1 mM Na_2HPO_4 y 4.5 mM KH_2PO_4) pH 7.4 estéril y centrifugadas a $800 \times g$. Las células se lisaron en buffer de muestra 2x

(Tris-HCl 0.5 M, glicerol 10 %, SDS 5 %) con inhibidores de proteasas (Complete, Roche Diagnostics, Mannheim Germany) y fosfatasas (PhosSTOP, Cat: 04906837001, Roche Diagnostics, Mannheim Germany). Los lisados celulares se centrifugaron a 16000 x g a 4°C por 15 min, los sobrenadantes se colectaron y se usaron y guardaron a -80°C hasta su uso.

5.5 Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)

Para investigar el patrón de proteínas totales de las células C6/36 HT se realizó el ensayo de electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE), en forma discontinua, se utilizó gel concentrador con bajo grado de reticulación de 4% y pH 6.8, un gel separador con grado de reticulación mayor de 12 %, para preparar la mezcla de los geles se utilizó solución de 30% de acrilaminada/0.8% de bisacrilamida, SDS al 10%, persulfato de amonio 10%, TEMED, Tampón del gel separador Tris-HCl 1.5.M pH 8.8, Tampón del gel concentrador Tris-HCl 0.5 M pH 6.8. Después de los tratamientos las células C6/36 HT se lisaron con buffer de lisis 2X (SDS 5%, Glicerol 10 %, 0.5 M Tris-HCl pH 8.8), en presencia de inhibidores de proteasas y fosfatasas. Los lisados celulares se centrifugaron a 12000 rpm por 15 min a 4°C, los sobrenadantes se colectaron y la concentración de proteína se determinó usando el ensayo de proteína BCA (Thermo Scientific, Rockford IL, USA). A 40 µg de proteína de cada tratamiento se le adicionó 1 µl de β-Mercaptoetanol al 0.01% y Azul de Bromofenol al 0.05% y cada muestra se hirvió por 5 min. Posteriormente se colocaron en los diferentes carriles del gel, así como también se colocaron los marcadores de peso molecular preteñidos (Precision Plus Protein™ Standards Cat. No.161-0374. Bio-Rad Laboratories, INC, CA. USA). A los geles colocados en las cámaras se les agregó buffer de corrida (Trisma base, glicina, SDS) y se conectaron a una fuente de poder a 80 V hasta que la banda de azul de bromofenol entró en el gel separador y el voltaje se incrementó a 120 V. Finalizada la corrida electroforética, el gel se colocó a una solución fijadora de ácido acético 10%, metanol 30 %, y se tiñó con Azul de Coomasie Bio-Safe y se destiñó con solución de ácido acético

10% y metanol 10 %, los geles obtenidos se utilizaron para ensayos de Western blot. (Los ensayos se realizaron por duplicado).

5.6 Electroforesis en dos dimensiones (E-2D)

El análisis detallado de proteínas se hizo por electroforesis en dos-dimensiones (E-2D). Para la primera dimensión por isoelectroenfoque (IPG) se usaron tiras con gradiente de pH inmovilizado (Immobiline™ Drystrips pH 3-10 NL, 7 cm, GE Healthcare) (O'Farrell, 1975; Görg *et al.*, 2004). Para este fin, las proteínas de las células C6/36 HT después de los tratamientos se disolvieron en 200 µl de buffer de muestra [urea 7M, tiourea 2M, CHAPS 4%, IPG buffer 2%(GE Healthcare Bio Sciences AB, Sweden), DTT 40mM], al cual se le agregaron 20 µl del coctel de inhibidores de proteasas (Complete, Roche) y fosfatasa (PhosStop, Roche) para su homogenización. Las muestras se centrifugaron a 16000 x g a 4°C por 15 min, a los sobrenadantes se le agregó acetona para la precipitación de proteínas. Las proteínas se solubilizaron en 200 µl de solución de rehidratación (urea 7M, tiourea 2M, CHAPS 2%, IPG buffer 0.75 %, DTT 20mM) adicionada con inhibidores de proteasas y fosfatasa. La concentración de proteínas se determinó con el sistema 2-D Quant Kit (GE Healthcare). Una vez definida la concentración de proteína, se cargaron 200 µg de proteínas en las tiras Immobililine™ dejándose rehidratar toda la noche a temperatura ambiente. Las tiras IPG se electroenfocaron en un equipo Ettan IPGphor 3 system (GE Healthcare), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las tiras enfocadas se usaron inmediatamente o se almacenaron a -80°C hasta su uso. Para la segunda dimensión, las tiras se trataron por 15 min en buffer de equilibrio (urea 6 M, Tris-HCl, pH 8.8 75 mM, glicerol 29.3%, SDS 2%, Azul de Bromofenol 0.002%) más DTT (2.5 mM) y posteriormente 15 min con buffer de equilibrio más iodoacetamida (1.35 mM), las tiras equilibradas se colocaron sobre un gel al 12 % SDS-PAGE. Los geles se tiñeron con solución de Azul de Coomassie Bio-Safe (Bio-Rad Laboratories, Inc. CA, USA) y las imágenes de los geles se registraron usando un equipo ImagenQuant LAS 4000 System (GE Healthcare).

5.7 Anticuerpos

Para identificar las proteínas fosforiladas de las células C6/36 HT separadas por electroforesis se hizo Western Blot (WB) con anticuerpos policlonales de ratón anti-fosfotreonina (Cat. No. 13-9200, Invitrogen Corporation, Camarillo, CA.USA), conejo anti-fosfo serina (Cat. No. 61-8100, Invitrogen Corporation, Camarillo, CA.USA), y el anticuerpo monoclonal de ratón anti-fosfotirosina acoplado a peroxidasa (Cat. No. 136620, Invitrogen Corporation, Flynn Rd, Camarillo CA.USA) todos en dilución 1:2000. Para caracterizar a la proteína RACK1 se utilizó un anticuerpo policlonal de conejo anti-RACK1 (ab62735 COMPAÑIA). En cada caso se usó el anticuerpo secundario, correspondiente a la especie del anticuerpo primario, conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP, por sus siglas en inglés): *Goat anti-Rabbit IgG -HRP* (Cat. No. 81-6120), *Goat anti-Mouse IgG-HRP* (Cat. No. 8-6520) (Invitrogen Flynn Rd, Camarillo CA, USA) todos a una dilución 1:40000.

5.8 Western-blot

Para conocer las proteínas fosforiladas se realizó el análisis de WB en E-2D, los geles se corrieron por duplicado, uno se tiñó con Azul de Coomassie y su réplica electrotransferida a una membrana de nitrocelulosa (NC, Código RPN303D. Amersahm™ Hybond™ –ECL. GE Healthcare). Las membranas se bloquearon con albúmina (BSA) 3% en Buffer tris salino-Tween 20 (Tris-HCl 62.5 mM, cloruro de sodio 136 mM, Tween 20 0.1%), y se incubaron toda la noche con anticuerpos policlonales anti-fosfotreonina, anti-fosfo serina o el anticuerpo monoclonal anti-fosfotirosina, todos en dilución 1: 2000. Después las membranas de NC fueron incubadas con su correspondiente anticuerpo secundario conjugado con HRP. Los experimentos se realizaron por duplicado. Los puntos que presentaron cambios en la fosforilación en el análisis de WB, se localizaron en el gel teñido con Azul de Coomassie, se cortaron y analizaron por espectrometría de masas acoplada a cromatografía líquida (LC-MS/MS).

Para detectar la proteína RACK1 por WB en SDS-PAGE y E-2D se utilizaron 40 y 200 µg de proteínas totales electrotransferidas respectivamente sobre membranas de NC, se bloquearon e incubaron con un anticuerpo policlonal anti-RACK1, seguido de un anticuerpo secundario (*goat anti-IgG Rabbit-HRP*). Como control de carga se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-β-actina (ab8224, Abcam Cambridge, MA, USA: dilución 1: 40000), seguido de un anticuerpo secundario (*goat anti-IgG Mouse*) (AP308P, Millipore, dilution 1: 40000). Como control positivo para la detección por WB de la presencia de RACK1 en los ensayos se incluyó un lisado de células de carcinoma humano A431 sin estímulo (Lisado celular A431) (Cat. No. 12-301, Millipore Corporation, Temecula CA, USA). En todos los experimentos de WB, las señales se detectaron usando el kit Supersignal West pico Chemiluminescent (Thermo Scientific, Rockford, USA) y las imágenes se registraron en el equipo ImageQuant LAS 4000 system (GE Healthcare).

Para reutilizar las membranas de NC que ya se habían analizado con un anticuerpo, éste se retiró usando el amortiguador Restore™ Western Blot Stripping Buffer (Thermo Scientific, Rockford, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

5.9 Análisis de Datos.

Para la cuantificación de las señales obtenidas en los WB en SDS-PAGE, las intensidades de las bandas obtenidas en las imágenes digitales se analizaron con software ImageQuant TL 1D gel *Analysis* integrado a los controladores del equipo ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare). Para asignar significancia a las diferencias en intensidad de las señales, los resultados se compararon estadísticamente por la prueba t de Student para muestras no pareadas con $p < 0.05$. Para el análisis cuantitativo de los puntos de proteínas en E-2D teñidos con Azul de Coomassie y WB en E-2D, las imágenes se registraron en el ImageQuant LAS 4000 y las intensidades de los puntos se analizaron usando el software ImageMaster 2D Platinum 7.0 (GE Healthcare). La serie de resultados del porcentaje relativo de los puntos se analizaron por ANOVA de un paso con una $p < 0.05$.

5.10 Ensayo de Inmunoprecipitación

Para identificar proteínas asociadas a *Aea/RACK1* se hicieron ensayos de inmunoprecipitación. Para este fin se utilizaron 7.5×10^6 células C6/36 HT en cada condición: a) células sin tratamiento, b) en ayuno de suero, c) tratadas con dexametasona, d) tratadas con PGE_2 , todas las condiciones incubadas por 2 horas. Las células se lisaron con buffer de lisis no-desnaturalizante [Tris 10 mM pH 7.5, cloruro de sodio (NaCl) 150 mM, ácido etildiaminotetraacético (EDTA) 5 mM, Nonidet-P40 1%] en presencia de inhibidores de proteasas y fosfatasa. Los lisados celulares se centrifugaron a 12000 rpm por 15 min a 4°C, los sobrenadantes se colectaron y se determinó la concentración de proteína usando el ensayo de proteína BCA (Thermo Scientific, Rockford IL, USA). Dos mg de proteína de los extractos totales se pre-aclararon (eliminación de componentes potencialmente reactivos a partir del lisado celular) con 50 μ l de perlas de agarosa acopladas a proteína G (Invitrogen) más 1 μ g de anticuerpo IgG de conejo (como control negativo) (Cat: Sc 2027, Santa Cruz Biotechnology, Inc) durante 2 h a 4°C en agitación en vortex. Las perlas de G agarosa se dejaron precipitar y los sobrenadantes (proteínas pre-aclaradas) se recuperaron. Las proteínas pre-aclaradas se incubaron con 3 μ g del anticuerpo policlonal anti-RACK1 toda la noche a 4°C en agitación en vortex. Los lisados previamente incubados con el anticuerpo anti-RACK1 se le adiciono 60 μ l de Proteína-G-agarosa previamente incubada con albumina al 2%, y se incubaron por 2 h a 4°C en agitación. Las perlas con el complejo inmune se lavaron con el buffer de lavado (Tris 10 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, EDTA, 5mM, Nonidet-P40 1%), las proteínas de interés se extrajeron por la adición del buffer de muestra 2X (SDS 5%, glicerol 10%, Tris-HCl 0.5 M, pH 8.0) y se hirvieron durante 4 min y resueltas por SDS-PAGE 12%. Las proteínas resueltas se transfirieron a membranas de NC, estas se bloquearon con albumina al 3%, y se incubaron con anti-RACK, seguida de anticuerpo secundario (*goat anti-IgG Rabbit-HRP*, 1:10000). Los experimentos se realizaron por duplicado. Del gel teñido con Azul de Coomassie Bio-safe las bandas de proteínas inmunoprecipitadas se cortaron de la condición de ayuno y de la condición de PGE_2 , se analizaron por LC-MS/MS.

5.11 Identificación de proteínas fosforiladas por LC-MS/MS

El análisis e identificación de proteínas por LC-MS/MS se realizó en la Protein Core Facility de Columbia University Medical Center por la Dra. Ann Gawinowics (New York, NY, USA). Para la identificación de proteínas, los puntos generados en los sistemas de E-2D se seleccionaron manualmente, se cortaron a partir de los geles teñidos con Azul de Coomassie y se colocaron individualmente en tubos Eppendorf de 1.5 ml. Las proteínas se digirieron con tripsina siguiendo procedimientos estándar para la obtención de péptidos (Shetti *et al.*, 2013). Los fragmentos de proteínas fueron reducidos/desalados, para obtener secuencia de los péptidos se realizó LC/MS/MS sobre un espectrómetro de masas híbrido de tiempo de vuelo ortogonal con un cuádrupolo (Micromass QTOF 1, Waters, USA) con cromatografía líquida (LC), operando en nonoflujo *electrospray* modo ion positivo. Los datos de MS y MS/MS se investigaron e integraron (Mascot v. 2.1, Matrix Science) contra la base de datos de Uniprot (UniprotKB/Swiss-Prot) para la especie *Ae. aegypti*.

5.12 Identificación de proteínas inmunoprecipitadas por MALDI TOF/TOF

Las bandas de proteínas inmunoprecipitadas fueron identificadas en un espectrómetro de masas tiempo de vuelo (QSTAR XL Hibrid LC-MS/MS system; Applied Biosystems, Foster City, CA) con un cuádrupolo operando a temperatura ambiente con fuente *Electro-Spray* en modo ion positivo para la API 150EX, API 3000, y QSTAR systems (Applied Biosystems) en la Protein Chemistry Section, Research Technology Branch, NIAID; NHI (Rockville, MD, 20852, USA). Los archivos de los datos crudos fueron procesados usando los softwares MassLynx ProteinLynx y MASCOT (<http://www.matrixscience.com/>) usando la base de datos NCBI nr. Los parámetros fueron ajustados considerando posibles oxidaciones de residuos de metionina, carbamidometilación, cisteínas y valores de masas monoisotópicas para la identificación por MASCOT.

5.13 Síntesis de cDNA

Para analizar la expresión del gen de *RACK1* bajo diferentes condiciones, se usó la reacción en cadena de la polimerasa punto final y cuantitativa (qRT-PCR) usando como molde cDNA generado a partir de los mensajeros celulares mediante transcriptasa reversa. El RNA total se aisló de la células C6/36 usando Trizol (Invitrogen, CA, USA) se siguió las instrucciones del fabricante. Para eliminar el DNA contaminante en el RNA, se procedió a mezclar 8 μ l RNA total con 1 μ l de buffer 10X (Tris-HCl 100 mM pH 7.5, MgCl₂ 25 mM, CaCl₂ 1 mM), 1 μ l de enzima TurboDNase (Fermentas, Thermo Scientific), se incubó a 37°C por 30 min, se inactivó la enzima a 75°C por 10 min, después de inactivarla se le adicionó 1 μ l de EDTA 5 mM. La calidad del RNA se verificó por electroforesis en un gel de agarosa al 2 %, teñido con bromuro de etidio, se visualizó bajo luz UV, la imagen se registró la imagen usando el software ImageMaster 2D Platinum 7.0 (GE Healthcare). La hebra de cDNA se sintetizó a partir de 500 ng de RNA total, para ello se utilizó oligo (dT) primers y transcriptasa reversa SuperScript II (Cat. No. 1864-014, Invitrogen, Life Technologies, CA, USA). A 500 ng de RNA total se le agregó 1 μ g de oligo (T) y agua estéril hasta completar 12 μ l, posteriormente se desnaturalizó a 70°C por 10 min y se colocó en hielo, se le adicionó 4 μ l de buffer 5X (Tris-HCl 250 mM, pH 8.3, KCl 375 mM, MgCl₂ 15 mM), 2 μ l de DTT 0.1 mM, 2 μ l de dNTP's 10 mM, se mezcló con mucho cuidado y se centrifugo dando un pulso solamente, se incubó 42°C por 2 min y se agregó 1 μ l de transcriptasa reversa SuperScript II, se incubó a 42°C por 50 min, seguido de 70°C por 15 min para inactivar la enzima. Se obtuvo el cDNA y se procedió a realizar la PCR punto final y cuantitativo.

5.14 Análisis de PCR

Para confirmar la presencia de *Aea/RACK1* en la células C6/36 HT, Dos μl de cDNA de células sin tratamiento, en medio de cultivo sin suero, tratadas con PGE_2 y tratadas con dexametasona (de un total de $20\mu\text{l}$) se usaron para cada reacción de PCR de $50\ \mu\text{l}$ que incluye: $2\ \mu\text{l}$ de cada uno de los iniciadores específicos diseñados a partir del análisis en la base de datos *Biology WorkBench* (<http://workbench.sdsc.edu/>) del gen correspondiente a *AeaeRACK1* (AAEL013069). Las secuencias fueron: para el oligo sentido 5'-CCGTGTCGCCCGATGGTTCC-3' (posición 596 a 615) y para el oligo anti-sentido 5'-GAGCCGAGACCGACACCTGC-3' (posición 931 a 912). $0.25\ \mu\text{l}$ de Taq polimerasa (2U), $2\ \mu\text{l}$ de dNTPs, $5\ \mu\text{l}$ de amortiguador de PCR 10x (Invitrogen), $2\ \mu\text{l}$ de cloruro de magnesio (50 mM) y $34.75\ \mu\text{l}$ de agua estéril. Las condiciones para la PCR fueron de 35 ciclos de: 95°C por 4 min y 95°C por 30 s para la desnaturalización de la cadena de DNA; $68\ ^\circ\text{C}$ por 30 s para la unión de los iniciadores; $72\ ^\circ\text{C}$ por 30 s y una extensión final de $72\ ^\circ\text{C}$ por 8 min para los productos no terminado.

Como control, se amplificó un fragmento de 400 pb correspondiente al gen de actina de *An. albimanus* el cual se consideró un control de expresión constante, usando los iniciadores: ACA TGG AGA AAA TCT GGC ACC ACA (Act 5-3') y ACA GCT TTT CTT TGA TGT CGC GAA (Act 5-3'); (Montero-Solís *et al.*, 2004) bajo las condiciones de: $95\ ^\circ\text{C}$ por 5 min, $94\ ^\circ\text{C}$ por 1 min, $55\ ^\circ\text{C}$ por 1.10 min, $72\ ^\circ\text{C}$ por 2 min y una extensión final de $72\ ^\circ\text{C}$ por 7 min (30 ciclos). Los reactivos en cada reacción fueron: $0.5\ \mu\text{l}$ de cada uno de los iniciadores, $0.3\ \mu\text{l}$ de Taq polimerasa (2U), $2\ \mu\text{l}$ de cDNA, $0.5\mu\text{l}$ de dNTPs, $5\ \mu\text{l}$ de amortiguador de PCR 10x, $5\ \mu\text{l}$ de cloruro de magnesio (50 mM) y $36.2\ \mu\text{l}$ de agua estéril.

El fragmento de 369 pb se verificó por electroforesis en un gel de agarosa al 2 %, teñido con bromuro de etidio, visualizado bajo luz UV y registrada la imagen usando el software ImageMaster 2D Platinum 7.0 (GE Healthcare). Los geles se prepararon con el amortiguador TAE 1X (Tris acetado 40 mM, EDTA 1 mM pH 8.0. Posteriormente el fragmento se clonó en el vector PCRTM2.1-TOPO (Invitrogen) y

se secuenció (3500xL Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Life Technologies). El fragmento *Aea/RACK1* mostró 100 % de identidad con la secuencia de *AeaeRACK1* obtenida de la base de datos del genoma de *Ae. aegypti* cepa Liverpool accesible en el sitio VectorBase.

(<https://www.vectorbase.org/organisms/aedes-aegypti>).

5.15 Análisis q-PCR

Para cuantificar la expresión de *Aea/RACK1* de las células C6/36 HT sin tratamiento, en ausencia de suero y tratadas con dexametasona se utilizó qRT-PCR y se midió la formación de amplificadores usando la incorporación del colorante intercalante SYBR Green usando una mezcla comercial (SYBR Green PCR Master Mix, Invitrogen) llevando a cabo las reacciones en un equipo 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Para las reacciones los oligos se diseñaron a partir de la secuencia de RACK1 de *Ae. aegypti* (AAEL013069) con la ayuda del programa REAL-TIME PCR disponible en

<http://www.idtdna.com/scitools/Applications/RealTimePCR/>: sentido 5'-CAT CAG TGA CGT TGT CCT CTC-3' (posición 195–216), y anti-sentido 5'-GGA CAT CCT TGG TAT GGT CTT C-3' (posición 304–326) (el oligo sentido se ubicó en el exón 2 y el anti-sentido en el exón 3) y se obtuvo un fragmento de 113 pb. Adicionalmente se amplificó un fragmento de 113 pb de la proteína ribosomal S7 de *Ae. aegypti*, usando el oligo sentido 5'-GAG ATC GAG TTC AAC AGC AAG A-3' (posición 145-167) y el anti-sentido 5'-GAG AAC TTC TTC TCC AGC TCA C-3' (posición 236-258) (Liu *et al.*, 2007). Esta secuencia se usó como control interno para las amplificaciones. Los cambios relativos en las cantidades del RNAm fueron calculados usando el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak *et al.*, 2001).

5.16 Ensayo de inmunofluorescencia

Para localizar la proteína *Aea/RACK1* en las células C6/36 HT se hicieron ensayos de inmunofluorescencia. Las células fueron crecidas al 60 % de confluencia sobre cubreobjetos en medio MEM con suero, el cual fue retirado y sustituido por MEM libre de suero, MEM sin suero con dexametasona y MEM sin suero con PGE₂, las células se incubaron por 120 min y posteriormente se fijaron con solución al 1 % de paraformaldehído por 30 min a temperatura ambiente. Las células se permeabilizaron con acetona fría por 3 min y se trataron con solución bloqueadora (PBS, pH 7.2, FCS 10 %, BSA 3 %, glicina 10 mM) por 60 min a 37°C. Las células tratadas se incubaron con el anticuerpo policlonal anti-RACK1 de conejo dilución 1:50 (ab62735) por 2 h, seguido del anticuerpo secundario (*goat anti-IgG Rabbit Alexa 488 conjugate*) (A-11034, Invitrogen, Paisley, UK), el DAPI (H-1200, VECTASHIELD, Vector Laboratories, Inc, Burlingame, USA; 1:400) utilizado para teñir los núcleos. Las células teñidas se analizaron en un microscopio confocal invertido Leica LSM-SPC-5 Mo equipado con lentes para aceite de inmersión HCX PL apo lambda blue 63 x 1.4. Las imágenes se registraron y se procesaron utilizando el software LAS AF (Leica TCS-SPE, USA). Células sin tratamiento fueron usadas como control.

6. RESULTADOS

6.1 Efecto de la PGE₂ y la dexametasona sobre la viabilidad celular.

Para investigar el efecto de PGE₂ sobre las funciones celulares y para seleccionar una dosis que ejerciera un efecto farmacológico sin comprometer su supervivencia, primero se evaluó la viabilidad de las células C6/36 HT usando el reactivo CellTiter 96® AQueous One Solution. Para este fin las células se incubaron con diferentes dosis de PGE₂; 14, 28, 42 y 142 μM durante 30, 60 y 120 min, con base en reportes previos (Miller *et al.*, 2005; Dean *et al.*, 2002; García-Gil de Muñoz *et al.*, 2008; Stanley *et al.*, 2008). En estos experimentos se observó que en las dosis entre 14 y 42 μM de PGE₂, la viabilidad fue del 80 % (Fig. 5A), y en las concentraciones de 85 y 142 μM durante 120 min la viabilidad se redujo por abajo del 55 % (Fig.5B).

Por otra parte en las células incubadas con dexametasona en concentraciones de 8, 13 y 25 μM durante 30, 60 y 120 min., la viabilidad fue mayor al 80 %, mientras que en 38 y 51 μM durante 120 min la viabilidad fue menor al 75 % (Fig. 6). Por lo tanto, para experimentos posteriores se eligieron las concentraciones de 28 μM de PGE₂ y 13 μM de dexametasona.

6.2 Efecto del tratamiento con PGE₂, dexametasona y ausencia de suero sobre la apoptosis en las células C6/36 HT.

Para investigar si los diferentes tratamientos (supresión del suero, PGE₂ y dexametasona) inducían apoptosis en las células C6/36 HT, las células se analizaron después de 120 min de tratamiento, por el método de doble tinción con Anexina V/Ioduro de propidio. En el grupo de células sin tratamiento el porcentaje basal de células apoptóticas fue de 4.72 ± 0.16 % (Fig. 7A), mientras que en el grupo de células en ausencia del suero fue de 9.83 ± 0.15 % (Fig. 7B). En el tratamiento con dexametasona los porcentajes de células en apoptosis fueron de 7.31 ± 0.09 % en 13 μM y 18.43 ± 0.19 % en 51 μM ($p < 0.05$)(Fig. 3C y D). En el tratamiento con PGE₂ los porcentajes de las células apoptóticas en diferentes

concentraciones fueron de 7.42 ± 0.2 % en (28 μM) y 17.88 ± 0.13 % en 142 μM ($p < 0.05$) (Fig. 7E y F). Para los siguientes experimentos se eligieron las concentraciones de 28 μM de PGE_2 y 13 μM de dexametasona. Las células en ausencia suero comparadas con las células sin tratamiento presentaron un moderado incremento en apoptosis ($p < 0.05$). En todos los tratamientos la población de células necróticas detectado por la tinción del yoduro de propidio, se mantuvo por debajo de 8% comparado al 4% de las células sin tratamiento.

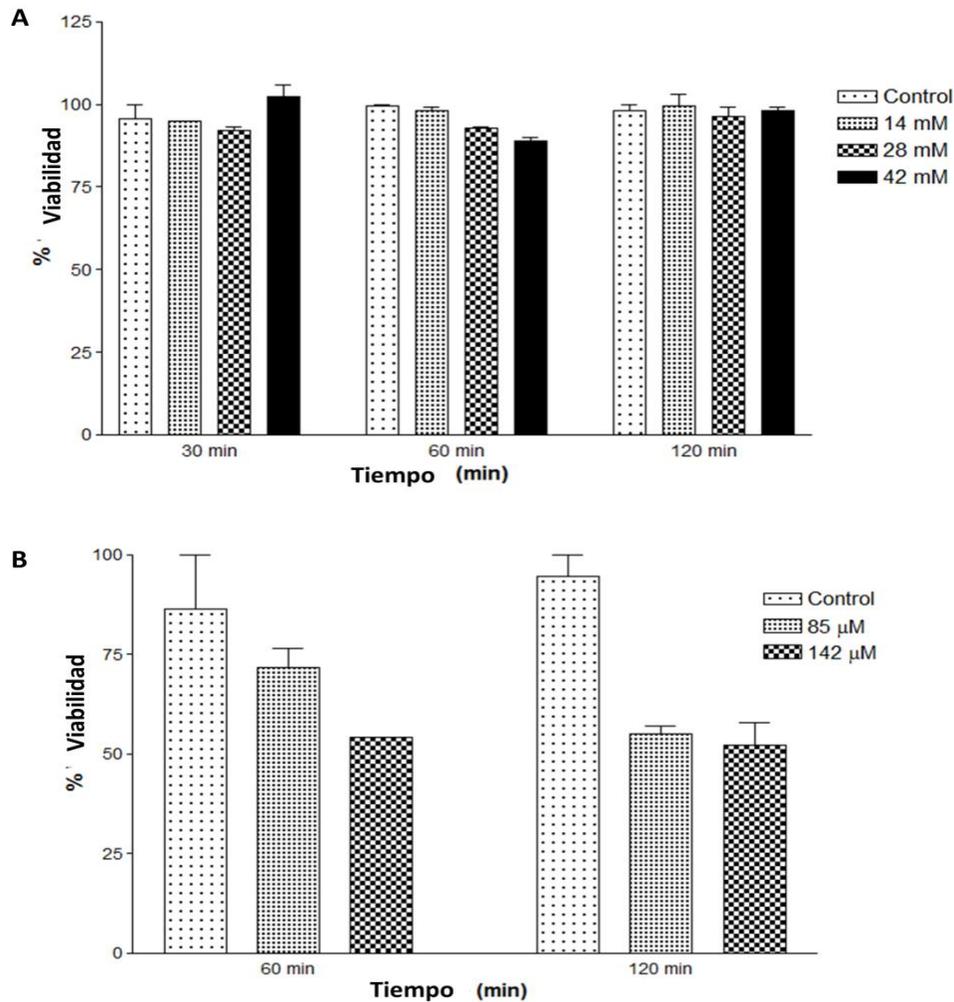


Figura. 5- Efecto de Prostaglandina E₂ sobre la viabilidad celular. Para el ensayo de viabilidad 3.4×10^6 células se cultivaron en placas de 96 pozos, se lavaron suavemente y se agregó PGE₂ en dosis de 14, 28, 42, 85 y 142 μM disuelto en medio MEM libre de suero, se incubaron por 30, 60 y 120 min. Células sin tratamiento se usaron como control. La viabilidad celular fue medida usando el sistema CellTiter 96® Aqueous One Solution Reagent. La cantidad de formazán soluble producido se registró por absorbancia a 490 nm usando un lector de placas de 96 pozos. Los experimentos se realizaron por triplicado y las barras representan la media de los experimentos independientes de cada concentración de PGE₂ (Media \pm DE). Los experimentos fueron realizados por triplicado. El porcentaje se calculó usando el 100 % el valor obtenido con las células de la condición control ($p < 0.05$).

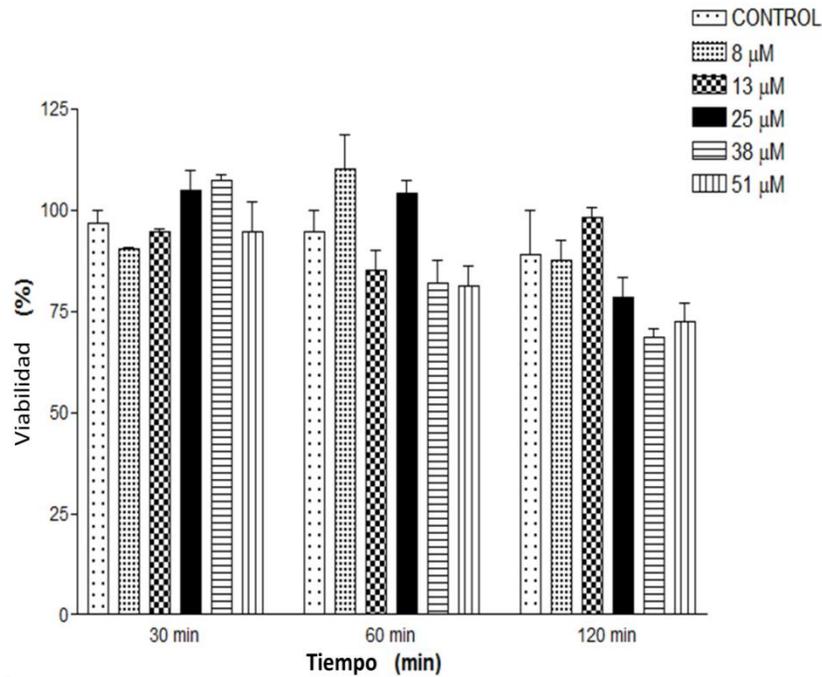


Figura. 6- Efecto de la dexametasona sobre la viabilidad celular. Para el ensayo de viabilidad 3.4×10^6 células se crecieron en placas de 96 pozos, las células se lavaron suavemente y se agregó la dexametasona en dosis de 8, 13, 25, 38 y 51 μM disuelta en medio MEM libre de suero, se incubaron por 30, 60 y 120 min. Las células sin tratamiento se usaron como control. La viabilidad celular se determinó usando el sistema CellTiter 96® Aqueous One Solution Reagent. La cantidad de formazan soluble producido fue registrado a 490 nm de absorbancia usando un lector de placas de 96 pozos. Los experimento se realizaron por triplicado y las barras representan la media de los experimentos independientes de cada concentración de dexametasona (Media \pm DE), El porcentaje se calculó usando como 100 % el valor obtenido con las células de la condición control ($p < 0.05$).

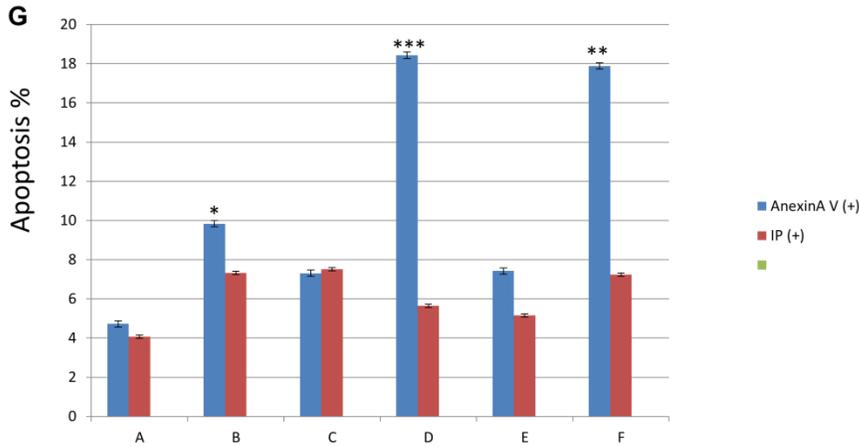
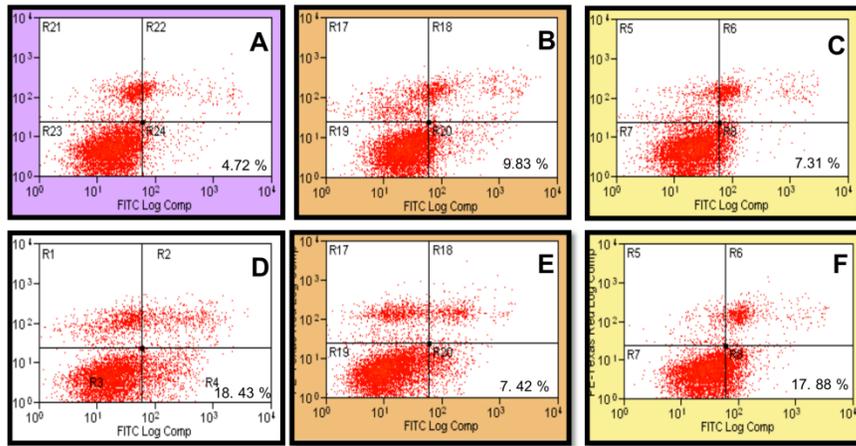


Figura. 7- Efecto de la PGE₂, la dexametasona y la ausencia de suero sobre apoptosis en las células C6/36 HT (A-F). Gráficas de dispersión de la doble tinción de las células con Anexina V/IP, en las condiciones probadas se obtuvieron por citometría de flujo. (A) Células sin tratamiento; (B) Células en ausencia de suero; (C) Células tratadas con dexametasona (13 μM); (D) Células tratadas con dexametasona (51 μM); (E) Células tratadas con PGE₂ (28 μM); (F) Células tratadas con PGE₂ (142 μM). (G) Las barras muestran el porcentaje de apoptosis (Anexina V +) y necrosis (Ioduro de propidio IP +) de la población de células tratadas. El porcentaje fue calculado usando como referencia el valor obtenido con las células de la condición control (A). *** $p < 0.05$ vs A; ** $p < 0.05$ vs A; * $p < 0.05$.

6.3 Análisis por electroforesis en dos dimensiones (E-2D) de las proteínas de las células C6/36 HT expuestas a la ausencia de suero, a la PGE₂ y a la dexametasona.

Para conocer y analizar las proteínas totales de las células C6/36 HT en las diferentes condiciones, estas se incubaron en medio de cultivo sin suero (ausencia de suero), con PGE₂ y dexametasona por 120 min, y posteriormente se realizó la extracción y separación de las proteínas de cada condición por electroforesis en 2D (E-2D). Imágenes de E-2D representativas de tres experimentos independientes se presentan en la figura 8. Aproximadamente 400 puntos (proteínas) se resolvieron en cada gel teñido con Azul de Coomassie Bio-safe el cual tiene una sensibilidad hasta del 85 %. El peso molecular de estos puntos abarcó desde los 15 hasta los 150 kDa en un rango de punto isoeléctrico (pI) de 3 a 9; las proteínas mayoritarias se observaron en un rango de 15 a 75 kDa con pI de 4 hasta 8.

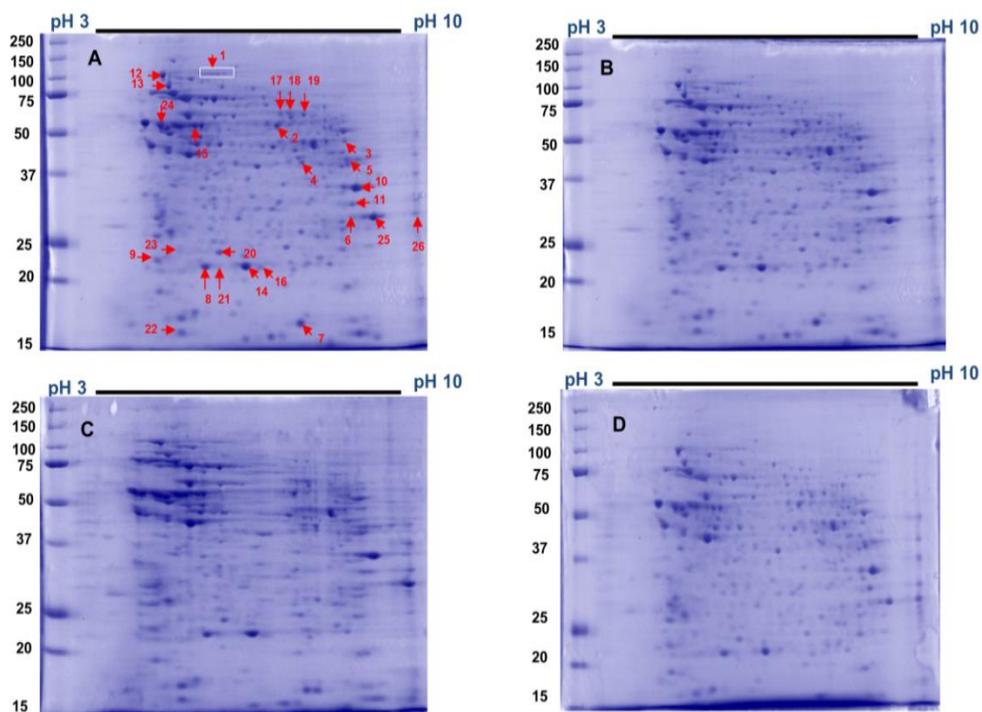


Figura. 8- Geles 2D representativos de las proteínas de las células C6/36 HT en diferentes condiciones. Las proteínas totales de (A) Células sin tratamiento (S/T); (B) Células sin suero (S/SUERO); (C) Células tratadas con PGE₂ 28 μM; (D) Células tratadas con dexametasona 13 μM por 2 h y se separaron por electroforesis en 2D. Los 26 puntos (proteínas) señalados en la imagen corresponden a proteínas que además están fosforiladas y por ello se seleccionaron para su identificación por LC-MS/MS (Tabla 1).

6.4 Identificación de proteínas fosforiladas en las células C6/36 HT

Para investigar posibles cambios en la fosforilación de proteínas de las células C6/36 HT, bajo los tratamientos aplicados en este trabajo se realizaron ensayos de Western blot en E-2D. Las membranas de nitrocelulosa se incubaron con anticuerpos fosforilados. Fueron identificadas 42 proteínas a partir de 26 puntos fosforilados las proteínas se resolvieron entre 15 y 150 kDa con pI 3 a 10 (Fig. 9, 10 y 11). Debido a que no existe una base de datos del genoma de *Ae. albopictus*, los péptidos se analizaron en el programa MASCOT, para la identificación de proteínas se utilizó la base de datos del genoma de *Ae. aegypti*. Las proteínas identificadas se muestran en la tabla 1.

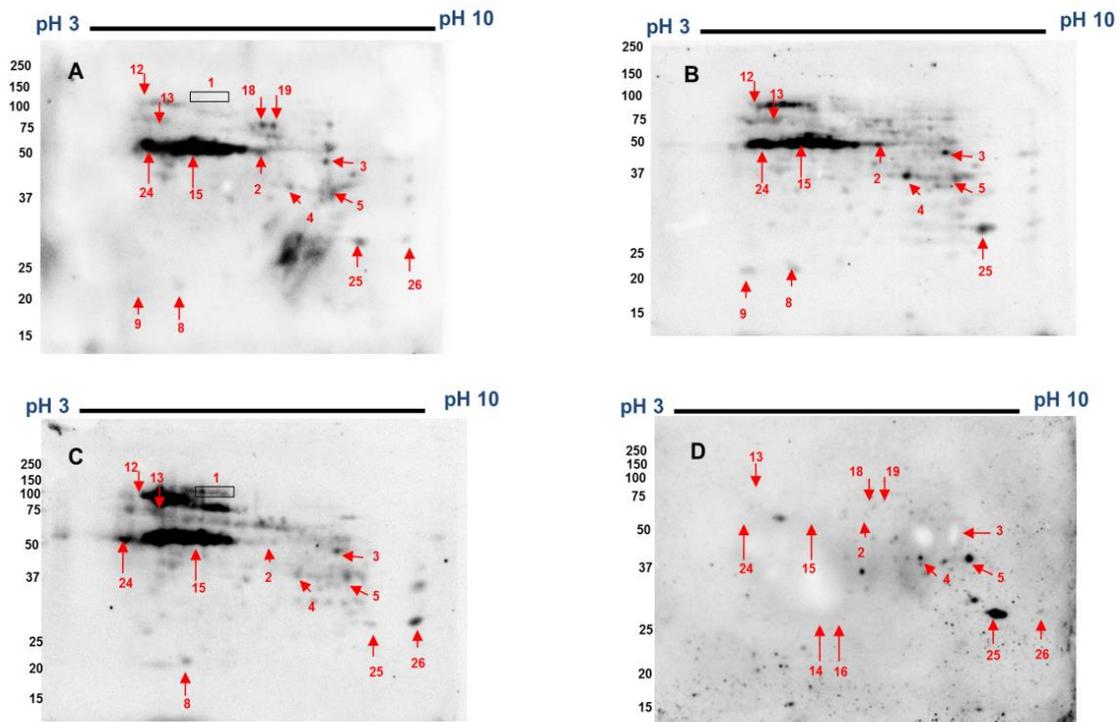


Figura. 9- Ensayos de Western blot representativos muestran el perfil de proteínas fosforiladas en tirosina (Tyr) en las células C6/36 HT en diferentes condiciones. (A) Células sin tratamiento (S/T); (B) Células en ausencia de suero (S/SUERO); (C) Células tratadas con la PGE_2 28 μM ; (D) Células tratadas con la dexametasona 13 μM por 2 h; los puntos fosforilados se detectaron usando un anticuerpo anti-tirosina y revelando con el kit Supersignal West pico Chemiluminescent y se registraron en un ImageQuant LAS 4000 system. Los puntos (proteínas) señalados en la imagen (flechas) se seleccionaron para su identificación por LC-MS/MS.

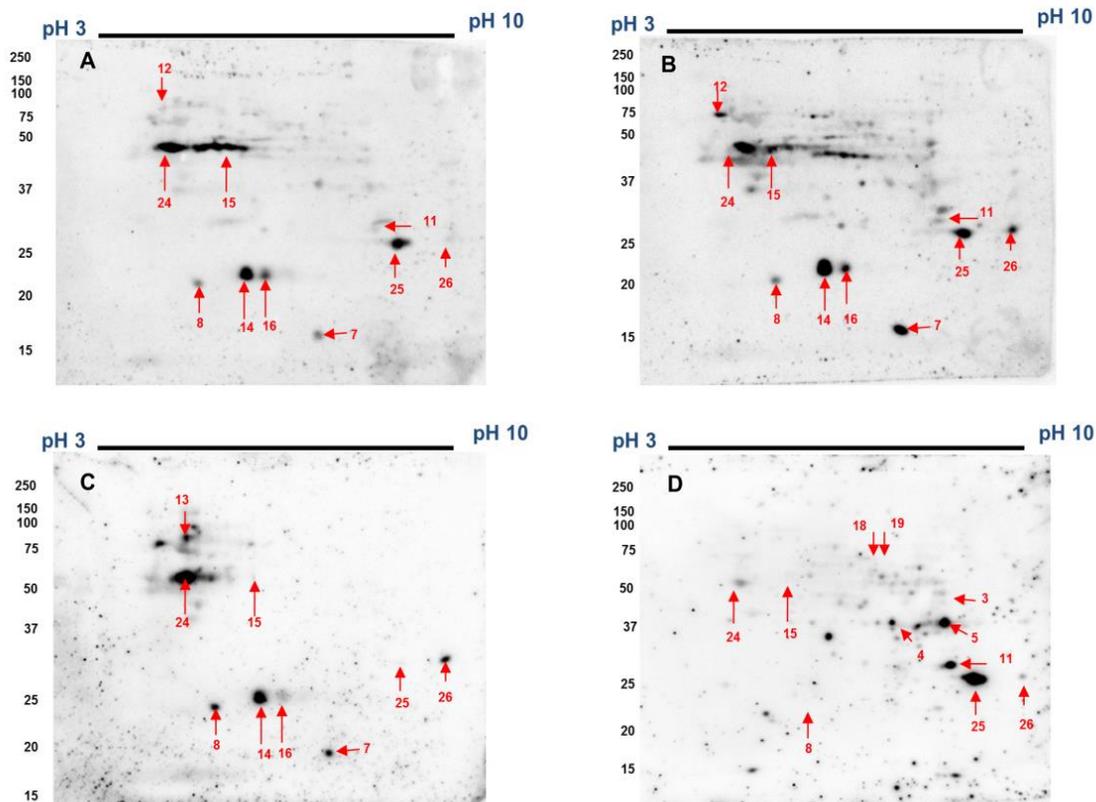


Figura. 10- Ensayos de Western blot representativos muestran el perfil de proteínas fosforiladas en serina (Ser) en las células C6/36 HT en diferentes condiciones. (A) Células sin tratamiento (S/T); (B) Células en ausencia de suero (S/SUERO); (C) Células tratadas con PGE₂ 28 μM; (D) Células tratadas con dexametasona 13 μM por 2 h y los puntos fosforilados se detectaron usando un anticuerpo anti-serina y se revelaron con el kit Supersignal West pico Chemiluminescent. Las imágenes se registraron en un ImageQuant LAS 4000 system. Los puntos (proteínas) señalados en la imagen (flechas) se seleccionaron para su identificación por LC-MS/MS.

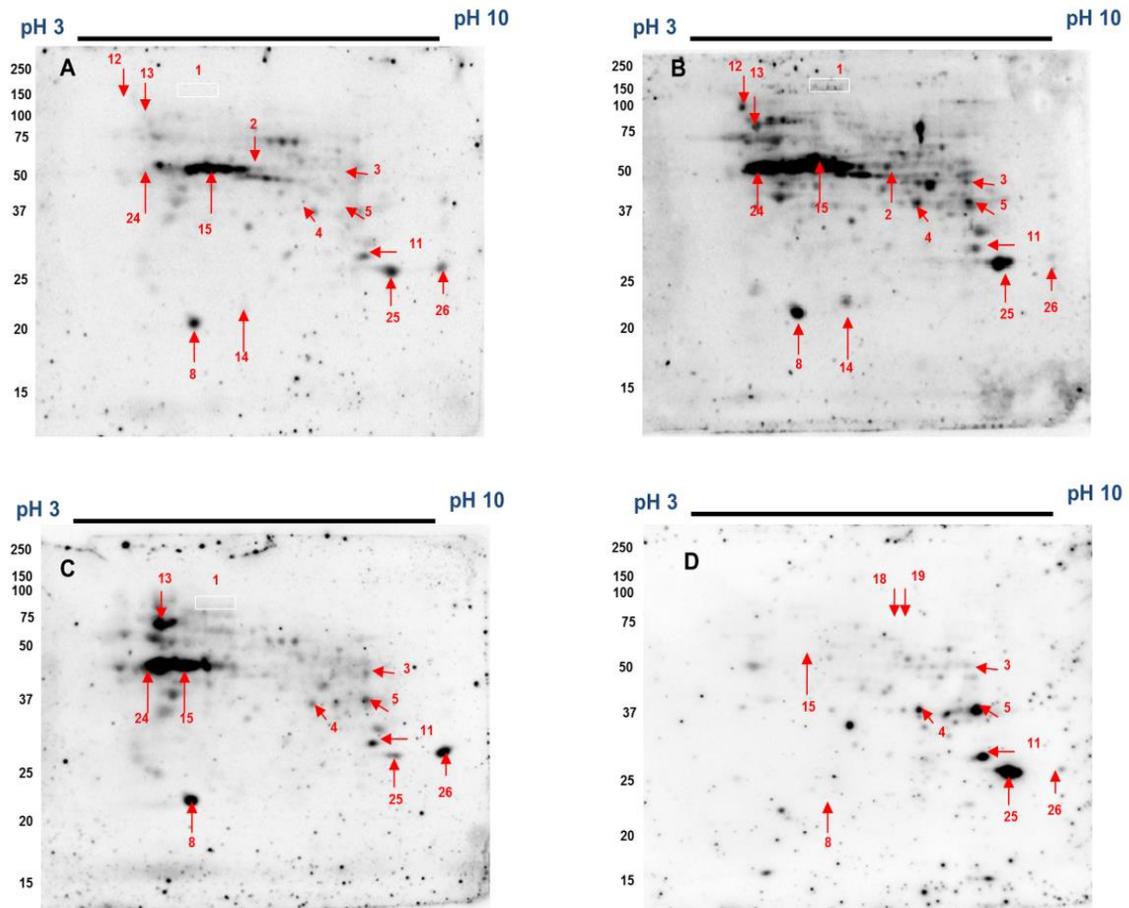


Figura. 11- Ensayo de Western blot representativos que muestran las proteínas fosforiladas en treonina (Thr) en las células C6/36 HT en diferentes condiciones. (A) Células sin tratamiento (S/T); (B) Células en ausencia de suero (S/SUERO); (C) Células tratadas con PGE₂ 28 μM; (D) Células tratadas con dexametasona 13 μM por 2 h y los puntos fosforilados se detectaron usando un anticuerpo anti-treonina y se revelaron con el kit Supersignal West pico Chemiluminescent. Las imágenes se registraron en un ImageQuant LAS 4000 system. Los puntos (proteínas) señalados en la imagen (flechas) se seleccionaron para su identificación por LC-MS/MS.

Tabla 1. Proteínas fosforiladas de las células C6/36 HT identificadas por LC/MS/MS

Num de punto	Id Sec	Nombre de proteína	Función	Num de acceso VectorBase ^a	PM Teor/Exp ^b	pl Teor ^c	Pep Ident ^d	Score	SC % ^e
1	Q16KZ2	Endoplasmina	Proteína plegamiento, respuesta a estrés, unión a ATP	AAEL012827	91.1/100	4.8	26	1070	26
1	J9HSH6	Proteína de choque térmico	Proteína plegamiento, respuesta a estrés, unión a ATP	AAEL017315	91.1/100	5.6	23	1228	36
1	Q16SH1	Factor asociado de la espermatogenesis	Pertenece a la familia AAA ATPasa	AAEL010585	89.4/100	5.3	19	914	26
1	Q16NY8	Factor del inicio de la replicación del DNA	Inicio de la replicación de DNA, actividad helicasa	AAEL011811-RA	91.9/100	5.9	11	529	15
2	Q17P27	Chaperonina	Proteína plegamiento, unión a ATP	AAEL000486-RA	60/58	6.1	26	1260	55
2	Q17GT4	Tioredoxina reductasa	Homeostasis en redox celular, actividad reductasa, unión a dinucleotido flavina adenina	AAEL002886	54/58	6.2	17	886	38
3	Q16LZ0	Liasa aspartato de amonio	Proteína de plegamiento, respuesta a estrés	AAEL010585	54.4/58	4.79	9	492	15
3	Septina	Septina	Procesos metabólicos del fumarato, actividad fumarato hidratasa	AAEL008167	54.7/48	8.6	16	733	34
4	Q178U8	Aldolasa fructosa bifosfato	Familia de proteínas asociadas a GTP, scaffold multimolecular, recluta componente de vías de señalización. Unión a filamentos de actina. Metabolismo, glucolisis	AAEL004668-RA	45.5/48	8	9	344	19
4	Q178U8	Aldolasa fructosa bifosfato	Metabolismo, glucolisis	AAEL005766	39.9/42	8.4	9	428	24

Num del punto	Id Sec	Nombre de proteína	Función	Num de acceso VectorBase ^a	PM Teor/Exp ^b	pI Teor ^f	Pep Ident ^d	Score	C % ^e
4	Q17PK0	Malato dehidrogenasa	Actividad oxidoreductasa	AAEL000314	21/42	8.8	7	371	32
4	Q16F83	Piruvato dehidrogenasa	Metabolismo, glucolisis	AAEL014865	41/42	8.2	8	382	25
5	Q178U8	Aldolasa fructosa bifosfato	Metabolismo, glucolisis	AAEL005766	40/40	8.4	16	884	47
5	Q173P7	Proteína de control de la mitosis y proteína de exportación de RNA poly(a)+	Ciclo celular	AAEL007066	40/40	7.9	11	436	32
5	ABF1835	Co-chaperona STI1	Citosqueleto de actina y transducción de señal	-----	38/40	7.5	9	339	22
6	Q1HR57	Canal selectivo de aniones dependiente de voltaje	Transporte transmembrana	AAEL001872	30.7/29	8.6	13	799	46
7	Q1HQF5	Proteína hipotética	Organización del citoesqueleto, unión a actina	AAEL003957	17.3/18	6.7	13	721	75
8	Q17MA9	Glutation-S-Transferasa (GSTD1)	Unión a proteínas	AAEL001061	24/23	5.6	11	606	45
8	Q17DN4	Peroxiredoxina	Actividad peroxidoxina	AAEL004112	22/23	5.6	6	267	28
9	Q1HQR5	Calsifosina	Unión al ion calcio	AAEL008489	24/24	4.9	3	143	14
9	ABL7441 4	Rab7	Transducción de señal y tráfico de membrana	-----	23.8/24	5.9	2	93	10
10	J9HYM2	Gliceraldehido-3-fosfato dehidrogenasa	Proceso metabólico de la glucosa	AAEL016984	35.5/36	8.2	15	817	59
10	Q16HL9	Proteína 4 con motivo de unión a RNA (lark)	Unión a ácido nucleico	AAEL013982	38.2/36	9.1	10	442	36
11	Q16HQ0	Prohibitina	Proteína de membrana	AAEL012282	38.8/35	9.3	9	473	24

Num de banda	Id Sec	Nombre de proteína	Función	Num de acceso VectorBase ^a	PM Teor/Exp ^b	pl Teor ^c	Pep Ident ^d	Score	SC % ^e
12	Q16KZ2	Endoplasmina	Proteína plegamiento, respuesta a estrés, unión a ATP	AAEL012827	91/100	4.8	32	1475	34
12	Q16FA5	Proteína de choque térmico	Plegamiento de proteínas, respuesta a estrés	AAEL014843	82/100	4.9	26	1283	36
13	Q16KZ2	Endoplasmina	Proteína plegamiento, respuesta a estrés, unión a ATP	AAEL012827	91/87	4.8	32	1475	34
13	Q16FA5	Proteína de choque térmico	Proteína de plegamiento y ensamble. Respuesta a estrés	AAEL014843	81.8/87	4.9	44	2214	50
14	Q17DN4	Peroxiredoxina	Actividad peroxidoxina	AAEL004112	22/23	5.6	9	436	43
15	Q1HR53	Cadena alfa tubulina	Actividad GTPasa, componente estructural del citoesqueleto	AAEL006642	50.5/55	5	22	1275	51
15	Q17L92	Proteína disulfuro isomerasa	Homeostasis redox celular, cataliza los nuevos arreglos de los enlaces disulfuros en las proteínas.	AAEL001432	55.5/55	5.5	20	1037	39
16	Q17DN4	Peroxiredoxina	Actividad peroxidoxina	AAEL004112	22/23	5.6	7	412	37
17	Q16U15	Chaperonina (Proteína 1 subunidad gamma del complejo T)	Plegamiento de proteína, unión a ATP	AAEL010063	60/62	6.1	33	1727	60
18	Q174C6	Chaperonina	Plegamiento de proteína, unión a ATP	AAEL006946	59/62	6.3	24	1296	44
19	Q17P27	Chaperonina	Plegamiento de proteína, unión a ATP	AAEL000486	60/62	6.1	19	942	41
20	Q17IM5	Peroxiredoxina 6	Actividad de peroxidoxina	AAEL002309	25/24	5.4	15	818	59
21	Q17DN4	Peroxiredoxinas	Actividad peroxidoxina	AAEL004112	22/24	5.6	5	275	25

Num de banda	Id Sec	Nombre de proteína	Función	Num de acceso VectorBase ^a	PM Teor/Exp ^b	pI Teor ^c	Pep Ident ^d	Score	C % ^e
22	Q16P63	Actina	Principal componente del citoesqueleto	AAEL011750	41.7/17	5.2	7	352	21
23	Q17H05	Captepsina	Actividad peptidase tipo cisteína	AALE002833	38/25	5.7	5	454	19
23	-----	Proteína tumor D54-like	Regulación de la proliferación celular, unión a RNA poly(A)	-----	23.3/25	5.2	3	118	13
24	Q1HR53	Cadena de alfa tubulina	Componente de microtubulos, actividad GTPasa, procesos de los microtubulos	AAEL006642	49.8/55	5	23	1362	51
25	Q1HRQ2	Receptor para activar a la proteína cinasa C	Rack1, proteína con repetidos WD, implicada en transducción de señales y otros procesos.	AAEL013069	34.8/35	8	9	385	33
26	Q1HR57	Canal selectivo de aniones dependiente de voltaje	Transporte transmembrana	AAEL001872	30.7/35	8.6	13	799	46

Los puntos fueron revelados por 2D-SDS-PAGE e identificados por LC-MS/MS en un QSTAR XL Hybrid System, Applied Biosystems. Analizadas por el programa Mascot v.2.1.

^aSecuencia de *Aedes albopictus* [European Nucleotide Archive (www.ebi.ac.uk)].

^bNúmero de acceso VectorBase(www.vectorbase.org).

^cPeso molecular Teorico/Experimental (PM).

^dpI teorico pI reportado en UniProtKB (www.uniprot.org).

^eNumero de peptidos matched por LC-MS/MS para cada proteína identificada por el programa Mascot

^f Cobertura de la secuencia: porcentaje de amino ácidos de péptidos matched en relación a la secuencia completa para cada proteína identificada.

6.5 Proteínas fosforiladas en las células C6/36 HT en ausencia de suero.

Catorce puntos presentaron cambios en la fosforilación en respuesta a la ausencia de suero (células en cultivo sin suero) de las células C6/36 HT, de los cuales cuatro incrementaron su fosforilación en tirosina (Tyr) y treonina (Thr): punto **3** (1.43 y 16.8 veces), **4** (1.72 y 7.1 veces, Fig. 14B), **5** (1.23 y 3.9, Fig. 14F y J) y **3** (1.23 y 2.3 veces Fig. 12Q), dos proteínas incrementaron su fosforilación en serina (Ser): punto **7** (3.28 veces) y **26** (4.1 veces, Fig. 13J); cuatro proteínas incrementaron su fosforilación en Thr punto **1**, **8** (5.7 veces. Fig. 12E), **11** (6.5 veces), y **15** (3.1 veces); una incrementó en Ser y Thr punto 14 (1.5 y 3.4 veces, Fig. 12I) y tres se fosforilaron en Tyr, Ser y Thr: punto **2** (1.16, 11.4 y 19.9 veces), **12** (1.6, 5.2 y 2.4 veces fig. 12M) y **25** (1.8, 1.3 y 6.6 veces, Fig. 10R, V y Z). Lo anterior en comparación con las células sin tratamiento (control) (Fig. 9, 10 y 11).

6.6 Proteínas fosforiladas en las células C6/36 HT bajo tratamiento con PGE₂.

Once puntos (proteínas) presentaron cambios en la fosforilación en respuesta a PGE₂. Dos proteínas fueron fosforiladas en Tyr: punto **1** y **15** (1.32 veces), dos proteínas incrementaron su fosforilación en Ser: punto **7** (2,2 veces), **14** (1.8 veces, Fig. 12J), tres proteínas incrementaron su fosforilación en Thr: punto **4** (1.3 veces), **5** (1.2 veces Fig. 14K), **11** (1.65 veces); una en Ser y Thr: punto **8** (3.4 y 5.7 veces, Fig. 12C y F), dos proteínas incrementaron su fosforilación en Tyr, Ser y Thr: punto **13** (1.24, 3.5 y 5.2 veces, Fig. 12R y V) y **26** (2.2, 8.2 y 4.2 veces, Fig. 13G, K y O) y una proteína aumentó su fosforilación en Tyr y Thr: punto **12** (2.3 y 22 veces, Fig. 12N). También fueron detectadas cuatro proteínas que disminuyeron la fosforilación. Una proteína disminuyó la fosforilación en Tyr punto **2** (0.8 veces) y una proteína disminuyó su fosforilación en Tyr, Ser y Thr punto **25** (0.5, 0.98 y 0.64 veces) (Fig. 9, 10 y 11).

6.7 Proteínas fosforiladas en las células C6/36 HT bajo tratamiento con dexametasona.

En respuesta a dexametasona dos proteínas incrementaron su fosforilación en Tyr, Ser y Thr: punto **5** (3.4, 3.8 y 12.4 veces, Fig. 14H, L, P) y **25** (6.9, 2.5 y 16.2 veces, Fig. 14T, X, YY), una incremento en Ser y Thr: punto **6** (4.7 y 6.8 veces), dos en Ser: punto **7** (1.6 veces) y **26** (1.2 veces) y una en Tyr y Thr: punto **4** (1.5, 4.6 veces, Fig. 14D). Ahora bien, dexametasona inhibió la fosforilación de diez proteínas: punto 1, 2, 3, 8, 11, 13, 14, 15 y 16 (Fig. 9, 10 y 11).

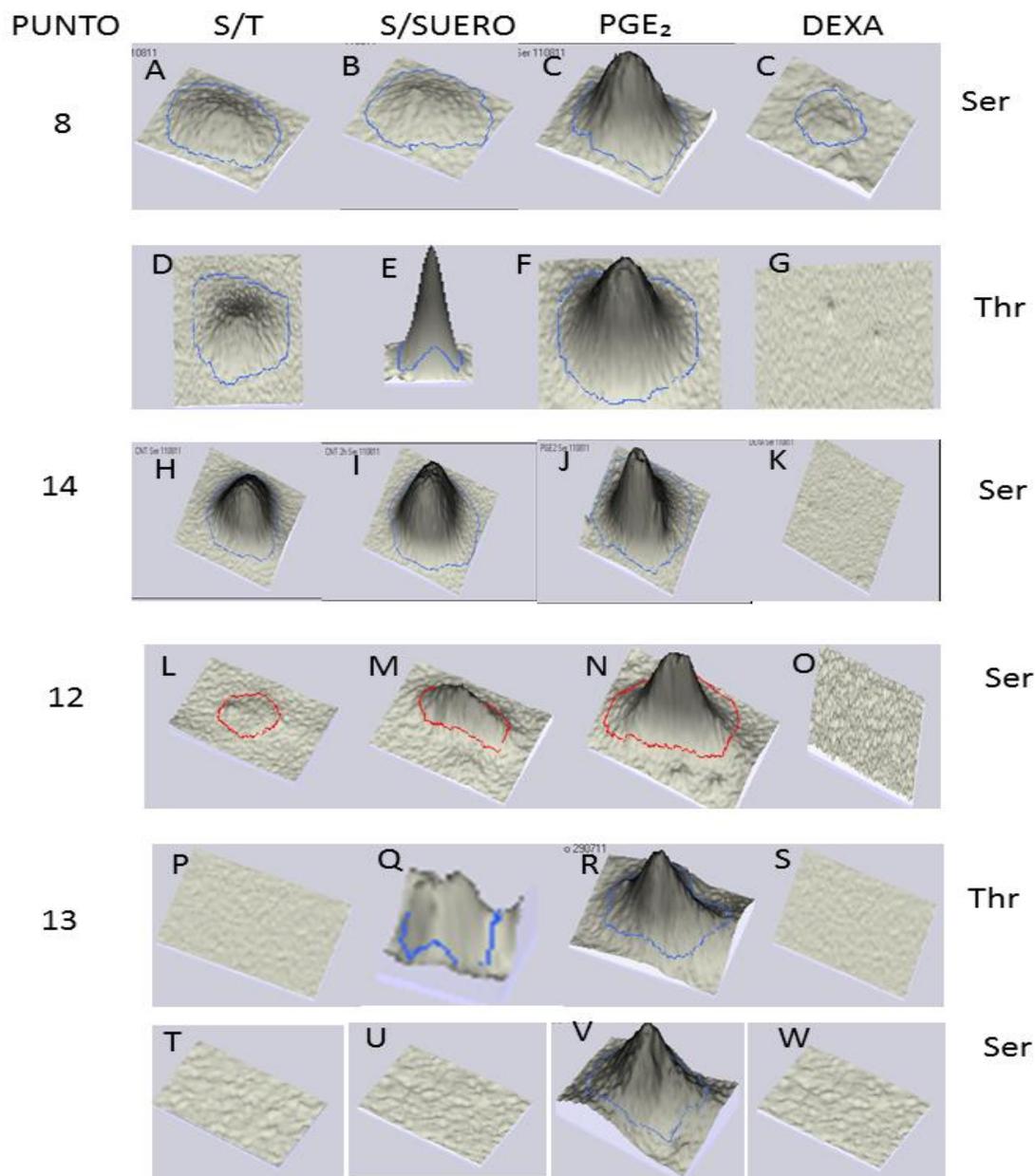


Figura. 12- Análisis de cuatro puntos en la ausencia de suero, tratadas con la PGE₂ y la dexametasona. Los puntos analizados se obtuvieron de las membranas incubadas con anticuerpos anti-tirosina (Tyr), anti-serina (Ser) y anti-treonina (Thr), los cambios en la fosforilación de los 4 puntos se compararon con respecto al nivel de fosforilación en la condición control (S/T) (C- 3.4; E-5.7; F-5.7; I-1.5; J-1.8; M-2.4; N-22; R-5.2; V- 3.5 veces incrementaron la fosforilación). Las imágenes se analizaron y se graficaron usando el software ImageMaster 2D Platinum 7.0.

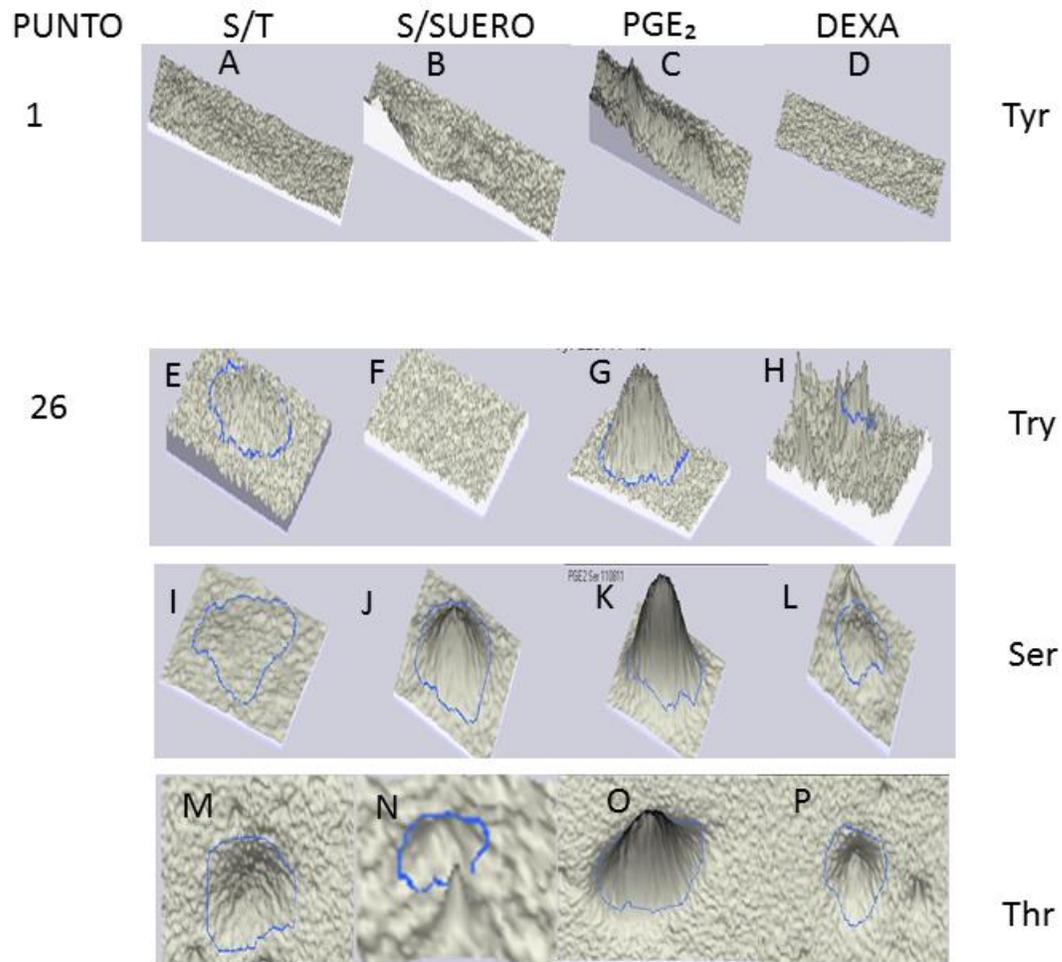


Figura. 13- Análisis de dos puntos en la ausencia de suero, tratadas con la PGE₂ y la dexametasona. Los puntos analizados se obtuvieron de las membranas incubadas con anticuerpos anti-tirosina (Tyr) y anti-serina (Ser) y anti-treonina (Thr). Los cambios en la fosforilación de los 2 puntos se compararon con respecto al control (S/T) (G-2.2; J-4.1; K-8.2, O-4.3 veces incrementaron la fosforilación). Las imágenes se obtuvieron usando el software ImageMaster 2D Platinum 7.0.

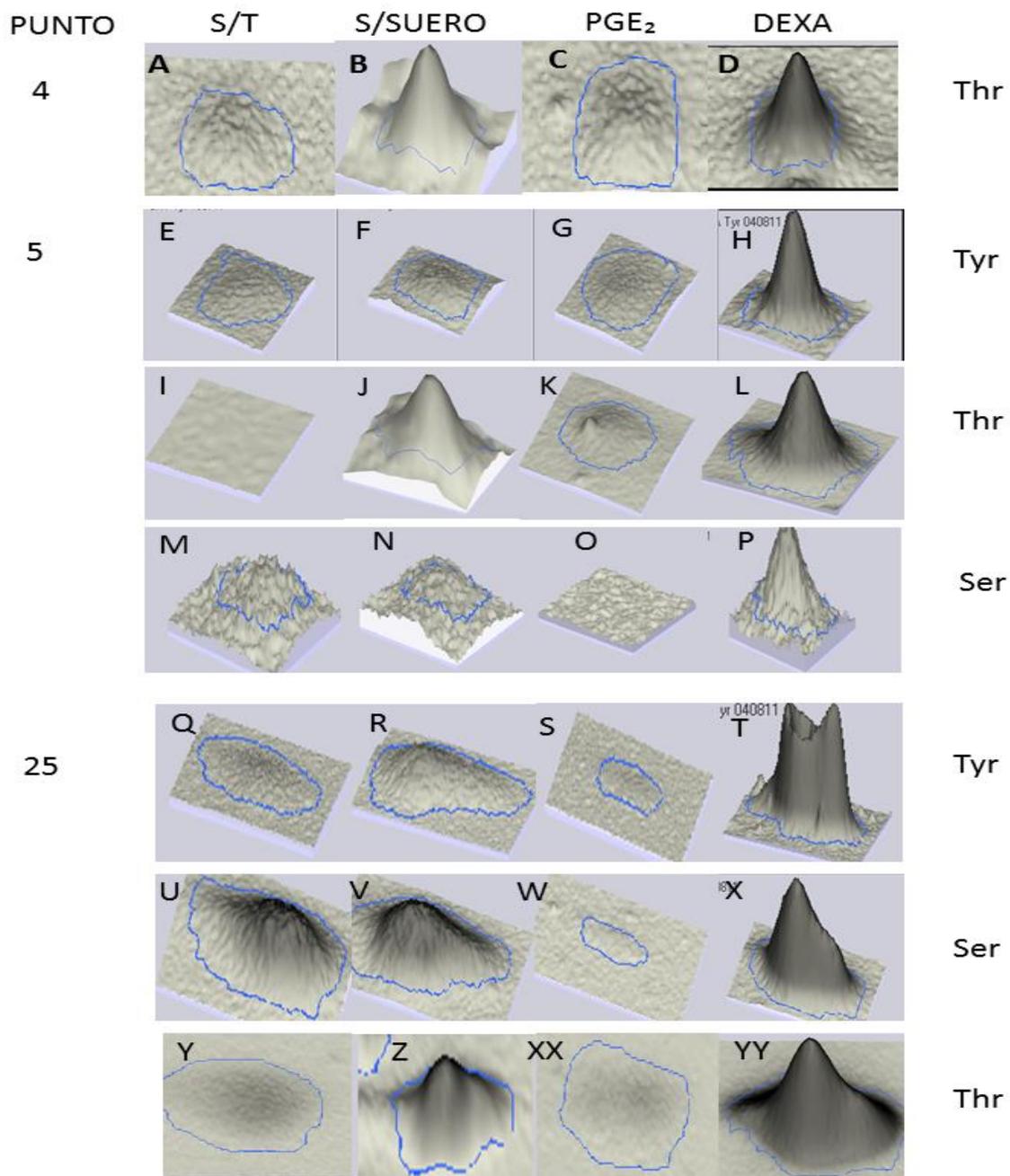


Figura. 14- Análisis de tres puntos bajo la inducción de la ausencia de suero, de la PGE₂ y de la dexametasona. Los puntos analizados se obtuvieron de las membranas incubadas con anticuerpos anti-tirosina (Tyr), anti-serina (Ser) y anti-treonina (Thr), los cambios en la fosforilación de los 3 puntos se compararon con respecto a las células control (S/T) (D-4.6, H-3.4, J-4.1, L-3.8, P-12.4, R-1.8, T-6.9, V-1.3, X-2.5, Z-6.6, YY-16.2 veces incrementaron la fosforilación). Las imágenes se obtuvieron usando el software ImageMaster 2D Platinum 7.0.

6.8 Identificación de proteínas fosforiladas por LC-MS/MS

Las proteínas que cambiaron su nivel de fosforilación en respuesta a ayuno, PGE₂ y dexametasona fueron identificadas: los puntos 1, 12 y 13 se identificaron como proteína de choque térmico (HSP 90) y estas mismas correspondieron a endoplasmína; el punto 2 se identificó a una chaperonina y a una tioredoxina reductasa; el punto 3 correspondió a una septina; en el punto 4 se identificaron una aldolasa fructosa-bifosfato, piruvato deshidrogenasa y malato deshidrogenasa; en el punto 5 se identificó la aldolasa fructosa-bifosfato; en el punto 7 se identificó al factor de depolimerización de actina (ADF); los puntos 8, 14 y 16 fueron peroxiredoxinas; el punto 9 correspondió a calcifosina y a la proteína Rab 7; el punto 15 correspondió a la proteína disulfuro isómerasa y a la cadena alfa actina; el punto 24 como cadena de alfa tubulina; el punto 25 se identificó como receptor para activar la proteína cinasa C (RACK1); el punto 11 correspondió a prohibitina; el punto 26 como canal selectivo-anión dependiente de voltaje (Tabla 1).

6.9 Análisis con *Gene Ontology* (GO)

Se realizó un análisis con GO de las proteínas fosforiladas para identificar los procesos biológicos y funciones moleculares de las proteínas que sufren variaciones en su fosforilación en respuesta a la ausencia de suero, a la PGE₂ y a la dexametasona. El análisis de los procesos biológicos reveló que ocho fosfoproteínas que presentaron cambios en su fosforilación participan en el plegamiento y ensamble de proteínas, cinco fosfoproteínas son parte de los procesos oxido-reducción / homeostasis de redox celular, tres son proteínas del citoesqueleto, cuatro participan en vías de señalización, una proteína pertenece a la familia de las ATPasas, una participa en la replicación del DNA, una proteína está involucrada en el proceso metabólico del fumarato, una proteína es parte del ciclo celular, dos proteínas forman parte del proceso glicolítico, dos proteínas presentan dominios WD (repetidos de triptófano y aspartato) y una proteína pertenece a las de transporte transmembrana (Tabla 2).

Tabla 2. Clasificación funcional de 37 proteínas fosforiladas e identificadas por LC/MS/MS

Categorías^a	Proteína
Proteína de plegamiento y ensamble (7)	Endoplasmina Endoplasmina Proteína de choque térmico 90 Proteína de choque térmico 90 Tres Isoformas de Chaperonina
Respuesta a estrés oxidativo (7)	Oxidoreductasa putativa Tioreoxina reductasa 2-Cys-Peroxiredoxina 1-Cys-Peroxiredoxina Peroxiredoxina 6 Glutathion-S-Transferasa Disulfuro Isomerasa
Síntesis de DNA (1)	Factor del Inicio de la replicación del DNA
Proteínas de citoesqueleto (5)	Actina Septina Co-chaperona ST11 Factor de depolimerización de actina (Proteína hipotética) Tubulina
Procesos metabólicos (4)	Liasa aspartato de amonio fructosa bifosfato Aldolasa Piruvato dehidrogenasa Gliceraldehído-3-fosfato dehidrogenasa
Ciclo celular (2)	Proteína de control de la mitosis y de exportación de RNA poly (a)+ Proteína tumor D54-like
Inicio de la transcripción (1)	Proteína 4 con motivo de unión a RNA (lark)
Proteínas con repetidos-WD (2)	Receptor para activar a la proteína cinasa C Prohibitina
Proteínas de Señalización (3)	Receptor para activar a la proteína cinasa C Rab7 Prohibitina
Transporte transmembrana (1)	Canal selectivo de aniones dependiente de voltaje
Transporte intracelular (1)	Rab7
Proteínas de unión a ATP (1)	Factor asociado de la espermatogénesis
Asociadas al Ion Calcio (1)	Calisfosina

^aCategorías fueron tomadas de las anotaciones Gene Ontology de los procesos biológicos en VectorBase DB.

De las proteínas identificadas que participan en vías de señalización la proteína *Aea*RACK1 fue la que presentó un incremento en la fosforilación en Ser, Tyr y Thr en células en ausencia de suero y con dexametasona, pero se desfosforiló en presencia de PGE₂. Nosotros no identificamos la posición de los aminoácidos que se fosforilan, pero reportes previos han documentado que RACK1 se fosforila en Tyr 302 para la interacción con PP2A y β -integrina (Kiely *et al.*, 2008), RACK1 es fosforilado por la cinasa 8 sin lisina (WNK8) en Ser 122 y Thr 162 (Urano *et al.*, 2014). En otro estudio se comprobó que RACK1 es defosforilado en Ser 146 por calcineurina para inhibir la dimerización (Liu *et al.*, 2007). Para estudiar el comportamiento de la proteína RACK1 se procedió a su caracterización, se investigó su secuencia en el genoma de *Ae. aegypti*, se confirmó la presencia de la molécula y su RNAm en las células C6/36 HT, se comprobó su interacción con otras proteínas y se estudió su localización subcelular.

6.10 Análisis de la secuencia de *Aeae*RACK1

RACK1 es una proteína altamente conservada (Adams *et al.*, 2011; Yatime *et al.*, 2011) que contiene siete repetidos (WD) y es un miembro bien caracterizado de la familia de proteínas *scaffold* con multirepetidos WD; RACK1 coordina una variedad de actividades celulares tales como transducción de señales, adhesión, migración, desarrollo, respuesta inmune y de estrés, también está relacionada con la síntesis de proteínas como un componente de la subunidad ribosomal 40S y regula la biogénesis y función de los microRNAs (Adams *et al.*, 2011).

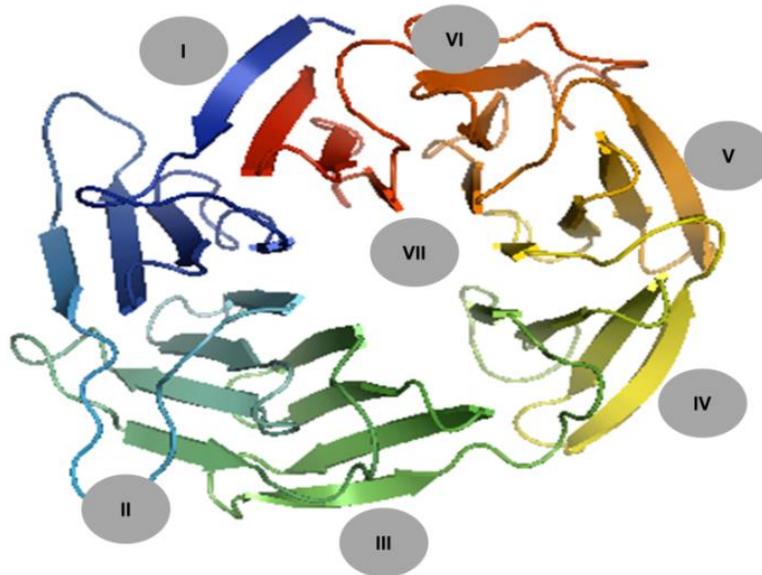
La caracterización de la molécula RACK1 se inició con los datos genómicos, secuencia completa del gen y sus derivados informáticos, transcrito, RNA mensajero y proteína, información contenida en las base de datos de *Ae. aegypti* accesibles en línea (<https://www.vectorbase.org/>), dado que el genoma de *Ae. Albopictus* aún no está secuenciado. A partir de la secuencia del gen de *Aedes aegypti* (*Aeae*) RACK1 se predice que es una proteína de 311 aminoácidos con un peso molecular de 34.89 kDa y un punto isoeléctrico (pI) de 7.97. La proteína *Aeae*RACK1 tiene 100% de identidad con la ortóloga de *Cx. quinquefasciatus* y *An. gambiae*; 87% de identidad y 93% de similitud con RACK1 de *B. mori* y *D.*

melanogaster; 74% de identidad y 84% de similitud a RACK1 de *H. sapiens*; 66% de identidad y 79% de similitud con la de *C. elegans* y 50% de identidad y 67% de similitud con la de *S. cerevisiae* (Fig.15). Un alineamiento de la secuencia de aminoácidos indica que AeaRACK1 contiene siete repetidos (dominios) Glyc-His (GH) y Trp-Asp (WD) similares a RACK1 de humano (HumRACK1) (43). El modelo construido con la proteína AeaRACK1 muestra una estructura de siete repetidos (hojas) β -hélice, con hojas radialmente arregladas alrededor del eje (Fig. 16A), muy similar a HumRACK1 y a otras especies (Adams *et al.*, 2011; Ruiz-Carrillo *et al.*, 2012). Los repetidos WD son dominios conservados de aproximadamente 40-60 aminoácidos que poseen un dipéptido GH en el lado N-terminal y un dipéptido WD en el lado C-terminal. Los repetidos I, II, IV y V contienen dipéptidos GH, mientras que el repetidos III contiene Asp-His (DH), el repetido VI presenta Glu-His (EH) y el repetido VII tiene dipéptidos Asp-Pro (DP) en el extremo N-terminal. En el extremo C-terminal los repetidos II, V y VI contienen dipéptidos WD, mientras que el repetido I tiene Trp-Lys (WK), el repetido III y IV contiene Trp-Asn (WN) y el repetido VII contiene Trp-Gln (WQ) Fig. 16B).

Ae._aegypti	1	--MTETLQLR	GQLVGHSGWV	TQIATNPKY-	PDMILSSSRD	KTLIV	WK	LT-	46
Cx._quinquefasc	1	--MTETLQLR	GQLVGHSGWV	TQIATNPKY-	PDMILSSSRD	KTLIV	WK	LT-	46
An._gambiae	1	--MTETLQLR	GQLLGHSGWV	TQIATNPKY-	PDMILSSSRD	KTLIV	WK	LT-	46
B._mori	1	--MSETLKLK	GTLRGHNGWV	TQIATNPKY-	PDMILSSSRD	KTLIV	WK	LT-	46
D._melanogaster	1	--MSETLQLR	GTLIGHNGWV	TQIATNPKD-	PDTIISASRD	KTLIV	WK	LT-	46
H._sapiens	1	--MTEQMTLR	GTLKGHNGWV	TQIATTPQF-	PDMILSASRD	KTIIM	WK	LT-	46
C._elegans	1	--MVQEQMKL	GTLEHGTGWV	TQIATYTRND	KTTVLSSSRD	KTILV	WD	VDS	49
S._cerevisiae	1	MASNEVLVLR	GTLEGHNGWV	TSLATSAGQ-	PNLLLSASRD	KTLIS	WK	LT-	48
Ae._aegypti	47	---RDD-ASY	GIPQKRLYGH	SHFISDVVLS	SDGNYALSGS	WDKTLRL	WD	L	92
Cx._quinquefasc	47	---RDD-ASY	GIPQKRLYGH	SHFISDVVLS	SDGNYALSGS	WDKTLRL	WD	L	92
An._gambiae	47	---RDE-LSY	GIPQKRLYGH	SHFISDVVLS	SDGNYALSGS	WDKTLRL	WD	L	92
B._mori	47	---RDE-NNY	GIPQKRLYGH	SHFISDVVLS	SDGNYALSGS	WDKTLRL	WD	L	92
D._melanogaster	47	---RDEDTNY	GYPQKRLYGH	SHFISDVVLS	SDGNYALSGS	WDQTLRL	WD	L	93
H._sapiens	47	---RDE-TNY	GIPQRALRGH	SHFVSDVVIS	SDGQFALSGS	WDGTLRL	WD	L	92
C._elegans	50	VAPVDE-GPI	GRPVRSLTGH	NHFVSDVVIS	SDGQFALSGS	WDKTLRL	WD	L	98
S._cerevisiae	49	---GDD-QKF	GVPVRSFKGH	SHIVQDCTLT	ADGAYALSAS	WDKTLRL	WD	V	94
Ae._aegypti	93	AAGKSTRFE	DHTKDVLSVA	FSDVNRQIVS	GSRDKTIKL	WN	TLAECKYTI		142
Cx._quinquefasc	93	AAGKSTRFE	DHTKDVLSVA	FSDVNRQIVS	GSRDKTIKL	WN	TLAECKYTI		142
An._gambiae	93	AAGQSTRFE	DHTKDVLSVA	FSDVNRQIVS	GSRDKTIKL	WN	TLAECKYTI		142
B._mori	93	AAGKTTRFE	DHTKDVLSVA	FSDVNRQIVS	GSRDKTIKL	WN	TLAECKYTI		142
D._melanogaster	94	AAGKTTRFE	GHTKDVLSVA	FSADNRQIVS	GSRDKTIKL	WN	TLAECKFTI		143
H._sapiens	93	TTGTTTRRFV	GHTKDVLSVA	FSSDNRQIVS	GSRDKTIKL	WN	TLGVCKYTV		142
C._elegans	99	NQGTVSTRQFI	SHTKDVLSVA	FSADNRQIVS	GSRDKSIKL	WN	TLAQCKYTI		148
S._cerevisiae	95	ATGETYQRFV	GHKSDVMSVD	IDKKASMIIS	GSRDKTIKV	WT	IKGQCLATL		144
Ae._aegypti	143	QEDGHSWV	CVRFSPN---	-HSNPIIVSA	GWDRTVKV	WN	LANCKLKIDH		188
Cx._quinquefasc	143	QEDGHSWV	CVRFSPN---	-HSNPIIVSA	GWDRTVKV	WN	LANCKLKIDH		188
An._gambiae	143	QEDGHSWV	CVRFSPN---	-HTNPIIVSA	GWDRTVKV	WN	LANCKLKIDH		188
B._mori	143	QDDGHSWV	CVRFSPN---	-HANPIIVSC	GWDRTVKV	WH	LTNCKLKINH		188
D._melanogaster	144	QEDGHTDWV	CVRFSPN---	-HSNPIIVSC	GWDRTVKV	WN	LANCKLKNNH		189
H._sapiens	143	QDESHSEWV	CVRFSPN---	-SSNPIIVSC	GWDKLVKV	WN	LANCKLKTNH		188
C._elegans	149	TDDCHTDWV	TVRFSPS---	-NRDPVIVSA	GWDKVVKV	WN	LGNCRLKTNH		194
S._cerevisiae	145	LG--HNDWV	QVRVVPNEKA	DDDSVTIISA	GNDKMVKA	WN	LNQFQIEADF		192
Ae._aegypti	189	LGHNGYLSV	SVSPDGS LCT	SGGKDC AFL	WD	LNDGKHLH	TLEHNEVINA		238
Cx._quinquefasc	189	LGHNGYLSV	SVSPDGS LCT	SGGKDC AFL	WD	LNDGKHLH	TLEHNEVINA		238
An._gambiae	189	LGHNGYLSV	SVSPDGS LCT	SGGKDC AFL	WD	LNDGKHLH	TLEHNEIINA		238
B._mori	189	LGHSGY LNTV	TVSPDGS LCA	SGGKDMKAML	WD	LNDGKHLH	TLDHNDIITA		238
D._melanogaster	191	HGHNGY LNTV	TVSPDGS LCT	SGGKDS KALL	WD	LNDGKNLY	TLEHNDIINA		239
H._sapiens	190	IGHGTGY LNTV	TVSPDGS LCA	SGGKDGQAML	WD	LNEGKHLY	TLDGGDIINA		238
C._elegans	193	IGHGTGY LNTV	TVSPDGS LCA	SGGKDGQAML	WD	LNEGKHLY	TLPGNDVINA		244
S._cerevisiae	191	IGHNSNINTL	TASPDGTLIA	SAGKDGEIML	WN	LAACKAMY	TLAQDEVFS		242
Ae._aegypti	239	LCFSPNRYWL	CVAYGPSIKI	WD	LACKTMV	ELKPSK----	----ADPPQC		280
Cx._quinquefasc	239	LCFSPNRYWL	CVAYGPSIKI	WD	LACKTMV	ELKPSK----	----ADPPQC		280
An._gambiae	239	LCFSPNRYWL	CVAYGPSIKI	WD	LASKTMV	ELKPAKN----	----GDPPQC		281
B._mori	239	LCFSPNRYWL	CAAFGPSIKI	WD	LESKEMVE	ELRPEIINQT	QTSKTDPPQC		288
D._melanogaster	240	LCFSPNRYWL	CVAYGPSIKI	WD	LACKKTV	ELRPEVVS P-	-TSKADQPPQC		287
H._sapiens	239	LCFSPNRYWL	CAATGPSIKI	WD	LEGLIIVD	ELKQEVIST-	-SSKAEPQC		286
C._elegans	245	MSFSPNRYWL	CAAVGSSIKI	WD	LEDKKEIE	ELKPEIASS-	GSSRGSSPQC		293
S._cerevisiae	243	LAFSPNRYWL	AAATATGIKV	FS	LDPQYLV	DLRPEFAGY-	--SKAAEPHA		289
Ae._aegypti	281	LSLAWSTDGQ	TLYAGYSDNI	IRV	WQ	VSVSA	R-		311
Cx._quinquefasc	281	LSLAWSTDGQ	TLYAGYSDNI	IRV	WQ	VSVSA	R-		311
An._gambiae	282	LSLAWSTDGQ	TLYAGYSDNI	IRV	WQ	VSVSA	R-		312
B._mori	289	LSLAWSTDGQ	TLFAGYSDNT	IRV	WQ	VSISA	R-		319
D._melanogaster	288	LSLAWSTDGQ	TLFAGYSDNT	IRV	WQ	VSVSA	H-		318
H._sapiens	287	TLAWSADGQ	TLFAGYTDNL	VRV	WQ	VTIGT	R-		317
C._elegans	294	ISLAWSQDGQ	TLFAGYTDNI	IRV	YQ	VSIRA	SN		325
S._cerevisiae	290	VSLAWSADGQ	TLFAGYTDNV	IRV	WQ	VMTAN	--		319

Figura. 15- Alineamiento múltiple de proteínas RACK1 de diferentes especies. El alineamiento de la secuencia de la proteína RACK1 de varios organismos se realizó usando el programa de alineamiento múltiple ClustalW disponible en el sitio *Biology Workbench v. 3.2* (San Diego Supercomputer Center). Las secuencias alineadas de RACK1 incluyen: *Aedes aegypti* RACK1 [GenBank: XP001663282.1], *Culex quinquefasciatus* RACK1 [GenBank: XP001863303.1], *Anopheles gambiae* RACK1 [GenBank: XP319347.2], *Bombyx mori* RACK1 [GenBank: NP001041703.1], *Drosophila melanogaster* RACK1 [GenBank: NP477269], *Homo sapiens* RACK1 [GenBank: NP006089.1], *Caenorhabditis elegans* RACK1 [GenBank: NP501859.1] and *Saccharomyces cerevisiae* RACK1 [GenBank: P38011.4]. Los dominios WD se muestran encerrados en cuadros.

A



B

III	GKSTRRFE	<u>DH</u>	TKDVL SVAFS	VDNR--QIVS	GSRDKTIKL	WN
II	GIPQKRLY	<u>GH</u>	SHFISDVVLS	SDGN--YALS	GSWDKTLRL	WD
V	CKLKIDHL	<u>GH</u>	NGYLSNSVSVS	PDGS--LCTS	GGKDCKAFL	WD
IV	-KYTIQED	<u>GH</u>	SDWVSCVRF	PNHSPPIIVS	AGWDRTVKV	WN
I	LQLRGQLV	<u>GH</u>	SGWVTQIATN	PKYP-DMILS	SSRDKTLIV	WK
VII	-ELKPSKA	<u>DP</u>	PQCLS-LAWS	TDGQ--TLYA	GYSNIIIRV	WQ
VI	-GKHLHTL	<u>EH</u>	NEVINLFCFS	PNR---YWLC	VAYGPSIKI	WD

Figura.16- Modelo de AaeRACK1. (A) Se utilizó la secuencia de la proteína AaeRACK1 para construir un modelo en tres dimensiones usando como plantilla la estructura de RACK1 de humano (PDB ID: 2zkq). Cada hoja de la hélice se compone de cuatro cadenas- β antiparalelas y forman un dominio WD, indicado por los números romanos I a VII. (B) La secuencia alineada de los siete dominios WD de AaeRACK1, que empiezan con di-péptidos GH o DH (encerrados en un cuadro de línea punteada) y termina con di-péptidos WD (encerrados en un cuadro de línea continua).

6.11 Efecto del estrés sobre la expresión de la proteína *Aea/RACK1*.

Un anticuerpo policlonal comercial anti-RACK1 detectó adecuadamente la proteína *Aea/RACK1* en el lisado de células C6/36 HT por ensayos de Western blot en una dimensión, y este anticuerpo se usó para determinar la expresión de *Aea/RACK1* en las células C6/36 HT bajo el efecto de la ausencia de suero y de dosis no tóxicas de la PGE₂ (28 µM) y la dexametasona (13 µM). En condición basal se detectó una banda muy débil de 35 kDa; por el contrario, los niveles de *Aea/RACK1* incrementaron significativamente ($p < 0.05$) en respuesta a la ausencia de suero y al tratamiento con la PGE₂ y la dexametasona, en un 70, 48 y 55 % respectivamente (Fig. 17A). Para confirmar la identidad y observar posibles modificaciones postraduccionales (MPT) de la molécula reconocida por el anticuerpo anti-RACK1, se realizó un ensayo de Western blot en E-2D con células C6/36 HT en ausencia de suero usando el mismo anticuerpo (Fig. 17B). Cuando el anticuerpo anti-RACK1 se usó en Western blot E-2D detectó dos puntos de 35 kDa con pI 8.0 y de 36 kDa con pI 6.5. Análisis de LC-MS/MS confirmaron que ambos puntos correspondieron a la proteína RACK1 (Tabla 3).

Tabla 3. Identificación de la proteína *Aea/RACK1* en la línea celular C6/36 HT por E-2D/WB y LC/MS/MS

Num punto	Proteína	NCBI Num Acc	PM/pl Teor ^a	PM/pl Exp ^b	Pept Ident ^c	SC % ^d	Mascot Score
1	Receptor para activar a la proteína cinasa C (RACK1) <i>Aedes aegypti</i>	gi 157168005	34891/7.97	35000/8.0	9	33	385
2	Receptor para activar a la proteína cinasa C (RACK1) <i>Aedes aegypti</i>	gi 157168005	34891/7.97	36000/6.5	6	20	261

Los puntos fueron revelados por E-2D e identificados por LC-MS/MS sobre un Micromass QToF1 (Waters, USA).

^aPeso Molecular Teórico (PM) y punto isoeléctrico (pl) reportado en UniProtKB (www.uniprot.org).

^bPeso Molecular Experimental (PM) y pl.

^cNúmero de péptidos matched por LC-MS/MS para cada identificada por el programa Mascot

^dCovertura de la Secuencia: porcentaje de amino ácidos de péptidos matched en relación para la secuencia completa de proteínas identificadas.

Mascot scores > 60 and $p < 0.05$ investigados en el programa Mascot sobre los datos de MS/MS.

6.12 Expresión diferencial de dos especies de *Aea/RACK1*

Después de observar que *Aea/RACK1* se incrementa significativamente bajo condiciones de estrés y que existen dos especies resueltas por E-2D, resultó interesante estudiar el nivel de expresión de cada molécula en diferentes condiciones. Las células en estado basal tuvieron ambas especies de *Aea/RACK1* en proporciones similares (Fig. 18A y B). En las células en ausencia de suero el punto 1 (35 kDa/pl 8.0) incrementó 5.2 veces y el punto 2 (36 kDa/pl 6.5) incrementó 6.3 veces con respecto a las células sin tratamiento (Fig. 18C y D). Relativamente, después del tratamiento con la PGE₂ el punto 1 incrementó 2.7 veces y el punto 2, 3.7 veces (Fig. 18E y F), mientras que en el tratamiento con la dexametasona el punto 1 incrementó 5.9 veces y el punto 2 incrementó 7.5 veces (Fig. 18G y H). La proporción del punto 2/punto 1 fue 1.21 veces en ausencia de suero, 1.37 con la PGE₂ y 1.27 con la dexametasona (Fig. 18I).

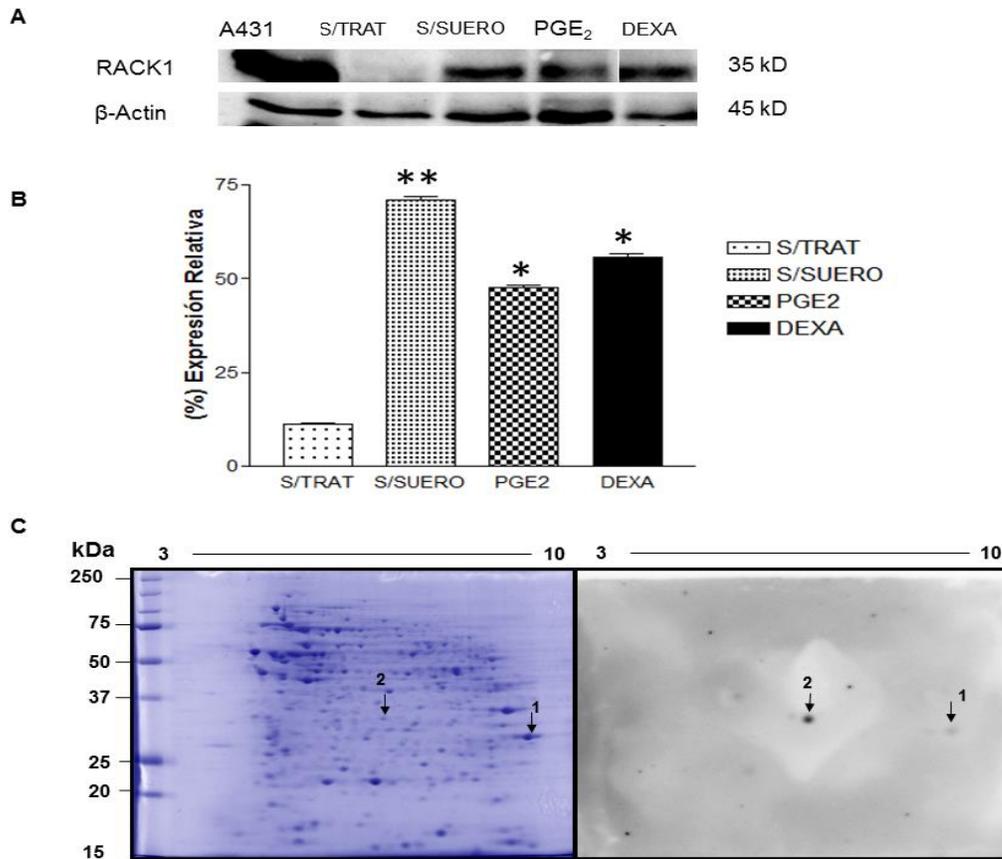


Figura. 17- Expresión de Aea/RACK1 en células C6/36 HT en ausencia de suero, tratadas con la PGE₂ y la dexametasona. Las células C6/36 HT fueron expuestas a la ausencia de suero, a la PGE₂ (28 μM) y a la dexametasona (DEXA, 13 μM). (A) Los lisados celulares se revelaron SDS-PAGE y el western blot se realizó con un anticuerpo policlonal anti-RACK1 (dilución 1:10000) seguido de un anticuerpo anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa (dilución 1:40000). Líneas: A431-Línea celular de carcinoma humano como control positivo; línea S/TRAT-Células C6/36 HT sin tratamiento como control; línea S/SUERO-células incubadas en medio MEM libre suero; línea PGE₂-células tratadas con PGE₂; línea DEXA-células tratadas con dexametasona. La misma membrana se trató con un anticuerpo anti-β-actina como control de carga. (B) La presencia de RACK1 se cuantificó por densitometría de las imágenes no saturadas del Western blot. La expresión relativa se calculó usando el valor correspondiente de β-actina. Los experimentos se realizaron por duplicados (**p*=0.01; ***p*<0.05). (C) Las proteínas totales de las células C6/36 HT bajo la condición de ausencia de suero se resolvieron en la primera dimensión sobre una tira IPG de pH 3-10 y en la segunda dimensión sobre SDS-PAGE al 12 %. El gel se tiñó con Azul de Coomassie Bio-Safe. (D) La identificación de Aea/RACK1 por WB en 2D. Una réplica del gel en 2D fue transferido a una membrana de nitrocelulosa la cual se incubó con un anticuerpo anti-RACK1 (dilución 1:10000) seguido de un anticuerpo policlonar anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa (dilución 1:40000). Dos puntos proteínas (indicados por la flechas) fueron reconocidos por el anticuerpo anti-RACK1 (panel derecho). Ambos puntos se identificaron como RACK1 por MS (Tabla1).

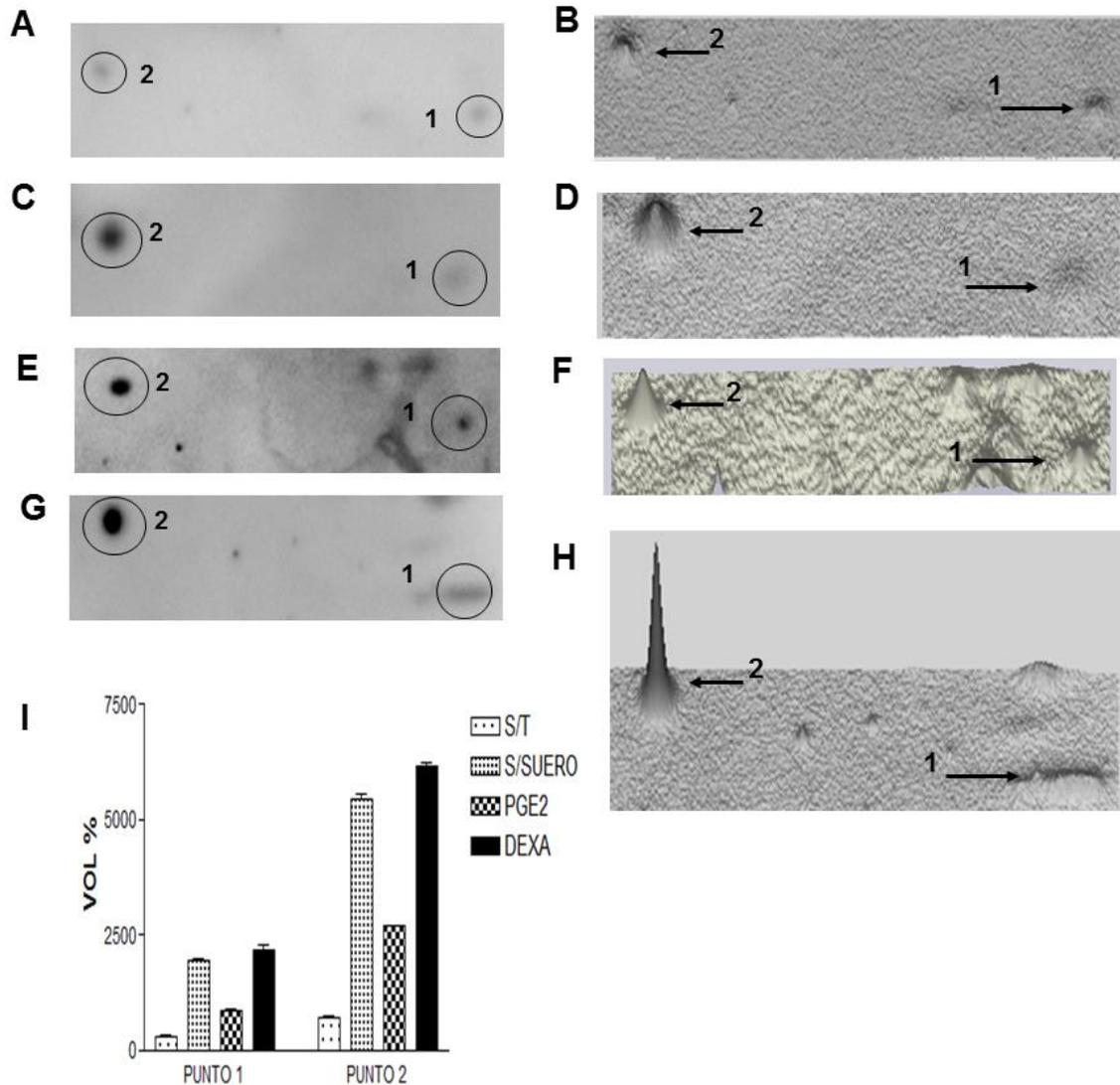


Figura. 18- El aumento de dos especies de proteínas de *Aea/RACK1* en células C6/36HT en ausencia de suero, tratadas con la PGE₂ y la dexametasona. La imagen de las dos especies de proteínas RACK1 detectadas por Western blot en E-2D bajo diferentes tratamientos (A, C, E, G) fueron analizadas usando el software ImageMaster 2D Platinum 7.0 y los gráficos en 3D de la densidad de los puntos fueron generados (B, D, F, G). (A y B) Células sin tratamiento; (C y D) Células en ayuno de suero; (E y F) Células tratadas con la PGE₂ (28 μM); (G y H) Células tratadas con la dexametasona (DEXA, 13 μM). Los círculos y fechas muestran los puntos 1 (35 kDa/pI 8.0) y 2 (36 kDa/pI 6.5). El punto 2 muestra alto peso molecular e intensidad y un bajo pI. (I) Se muestra la cuantificación de los dos puntos (proteínas).

6.13 Interacción funcional de *Aea/RACK1*

RACK1 es una proteína “*scaffold*” con muchas interacciones y funciones conocidas, en este trabajo fue de interés investigar las asociaciones entre *Aea/RACK1* con otras proteínas por ensayos de inmunoprecipitación usando el anticuerpo anti-RACK1. Las células C6/36 HT se incubaron en ausencia de suero, tratadas con la PGE₂ o la dexametasona y se obtuvo el lisado celular de cada condición, todos los lisados se inmunoprecipitaron y los complejos precipitados se analizaron por SDS-PAGE (Fig. 19A). La presencia de *Aea/RACK1* se confirmó tanto en los lisados como en los inmunoprecipitados, por WB usando el anticuerpo anti-RACK1 (Fig. 19B y C). Siete bandas principales de proteínas fueron observadas en ambas condiciones de estrés, de la condición de ayuno de suero fueron cortadas las bandas del gel teñido y se identificaron por MALDI-TOF (Fig. 19A, tabla 4). Las proteínas de *Ae. albopictus* que interactuaron con la proteína *Aea/RACK1* se clasificaron en once categorías de acuerdo a los procesos biológicos en el GO de VectorBase (Fig. 20). El grupo mayoritario correspondió a proteínas involucradas en traducción/estructura ribosomal, las otras categorías correspondieron a proteínas con funciones de señalización, proteínas con repetidos WD, ambas categorías implicadas en una amplia variedad de funciones incluyendo transducción de señal, división celular, cambios en el citoesqueleto, quimiotaxis y procesamiento de RNA, traducción de proteínas entre otras (Stirnimann *et al.*, 2010). Las proteínas de choque térmico se clasificaron como activas en plegamiento y ensamblaje; Las proteínas quinona oxidoreductasa y oxidoreductasa putativa en respuesta a estrés oxidativo; La porina mitocondrial, traslocasa ADP/ATP y ATPasa como transporte transmembrana; cadena pesada de clatrina, región de coatmero asociado a WD como transporte intracelular entre otras (Tabla 5).

Para analizar las interacciones observadas para *Aea/RACK1* con las descritas para RACK1 de otras especies se generó el interactoma de *Aea/RACK1* usando STRING 9.1 que contiene información conocida en otros sistemas y predicciones de interacciones proteína-proteína. El resultado de este análisis fue que

*Aeae*RACK1 AAEL013069 (XP 001663282.1) puede interactuar con la proteína cinasa C (AAEL000810), 40S proteína ribosomal S12 (AAEL 010299), proteína ribosomal S3 (AAEL008192), proteína ribosomal S7 (S7), 40S proteína ribosomal S20 (AAEL009506), 40S proteína ribosomal S10 (AAEL002047), 40S proteína ribosomal S26 (AAEL002832), 40S proteína ribosomal S2 (AAEL010168), 40S proteína ribosomal S9 (40sRpS9) y 40S proteína ribosomal S14 (RpS14) (Fig. 21). Los resultados experimentales obtenidos para la asociación de *Aea*/RACK1 con otras proteínas fueron concordantes con los obtenidos *in silico* en la base de datos STRING 9.1. En donde *Aea*/RACK1 se une mayoritariamente a proteínas ribosomales lo que indica su participación en la traducción de proteínas y en la respuesta a estrés oxidativo.

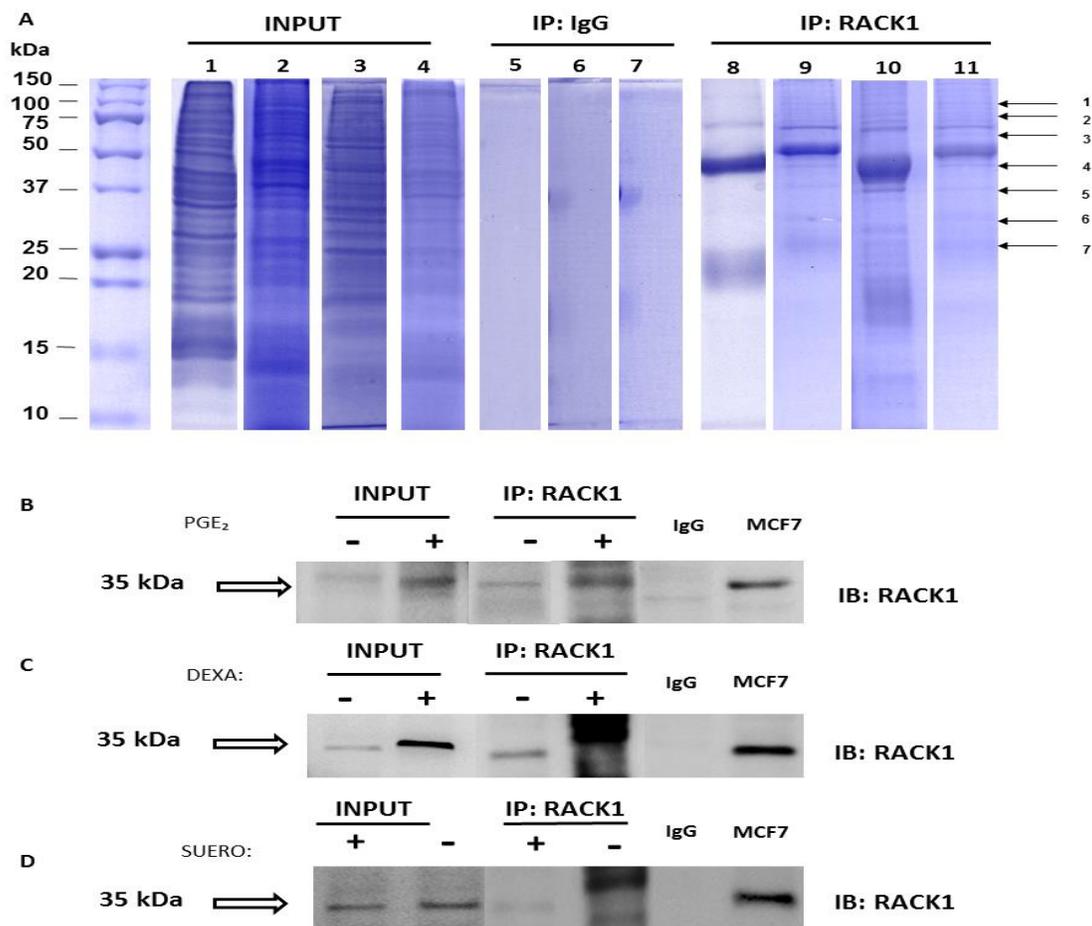


Figura. 19- Proteínas asociadas con AeaRACK1 en ausencia de suero, en tratamiento con la PGE₂ y la dexametasona. Los extractos de proteínas de las células C6/36 HT se inmunoprecipitaron con el anticuerpo anti-RACK1. (A) Proteínas relevadas por SDS-PAGE y teñidas con Azul de Coomassie. Input: Extractos totales; IP: IgG- Reacción con un anticuerpo no relacionado. IP: RACK1, inmunoprecipitación de lisados celulares usando el anticuerpo anti-RACK1. Línea 1 y 8- Extractos de células sin tratamiento; línea 2, 5 y 9- Células en ausencia de suero; línea 3, 6 y 10- Células tratadas con la PGE₂ (28 μM); línea 4, 7 y 11 - Células tratadas con la dexametasona (13 μM). Las principales bandas (proteínas) se cortaron del gel y se identificaron por MS (fechas 1-7). La presencia de RACK1 en los extractos (INPUT) y en los inmunoprecipitados (IP: RACK1) se verificó por inmunoblot (IB). (B) Input e IP: RACK1 en la ausencia (-) o presencia (+) de la PGE₂. (C) Input e IP: RACK1 en la ausencia (-) o presencia (+) de la dexametasona. Panel (D): Input e IP: RACK1 en células sin tratamiento (-) células en ayuno de suero (+). Líneas IgG- inmunoprecipitado control negativo comprobado con un anticuerpo IgG no relacionado. MCF7- Extractos totales de células cancerosas de mama de humano usado como control positivo.

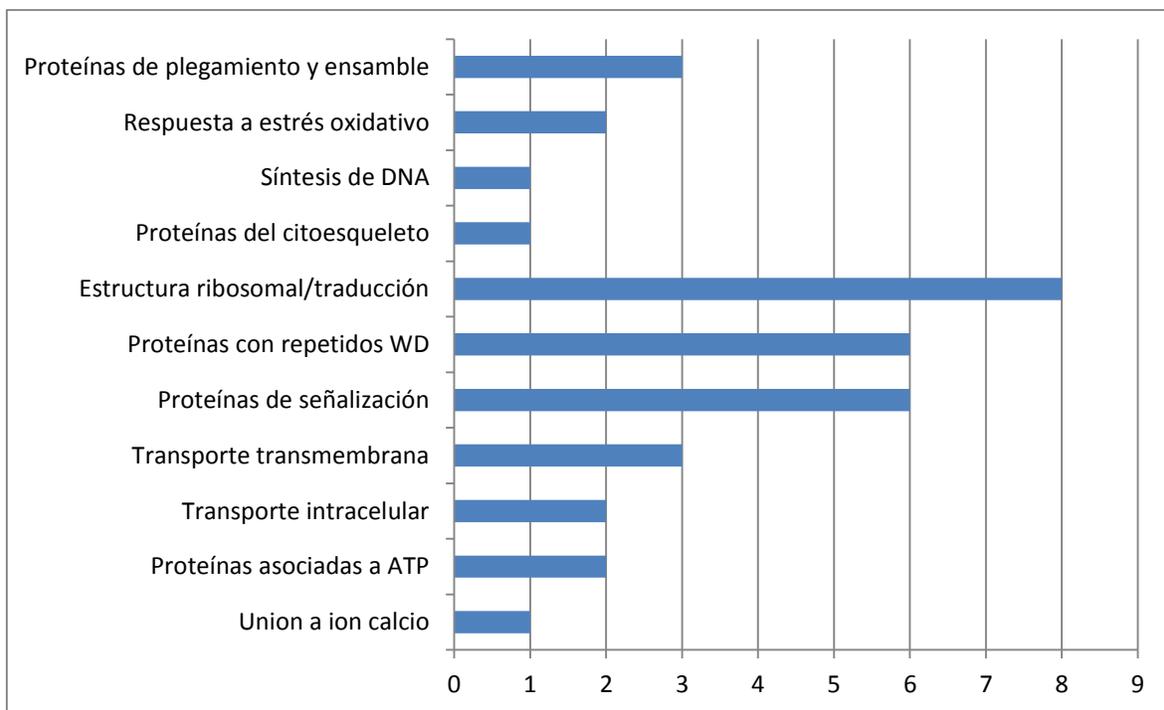


Figura. 20- Clasificación de proteínas identificadas de *Ae. albopictus* en procesos biológicos. Las categorías de los procesos biológicos fueron obtenidas GO (Gen ontology) en VectorBase DB. Los números corresponden a las proteínas identificadas en cada categoría.

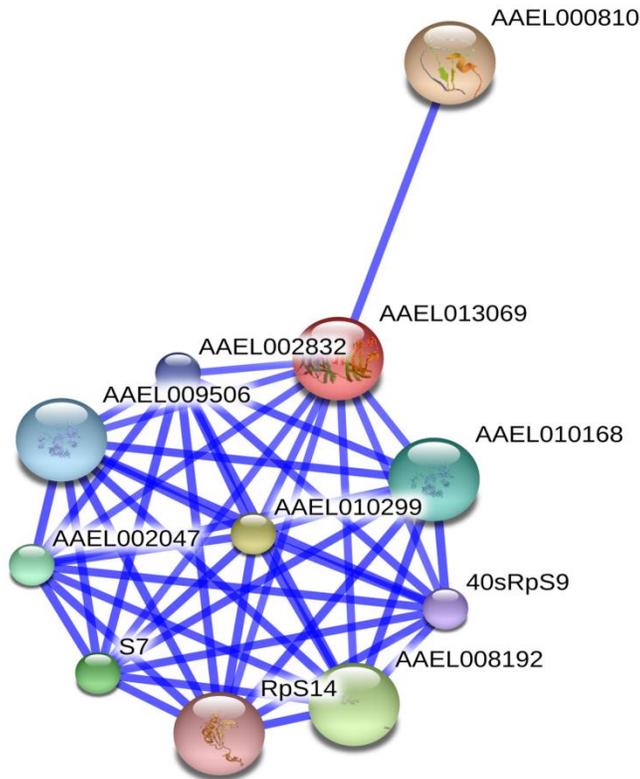


Figura. 21- Interacciones funcionales predichas de *AaeRACK1* (AAEL013069). Las proteínas que pueden interactuar con *AaeRACK1* se investigaron usando STRING database 9.1 (<http://string-db.org/>) in *confidence mode*. Las asociaciones importantes están representadas por líneas gruesas; solo evidencia experimental son mostradas; la confianza mínima fue con score 0.7. Los números representan el número de acceso en la base de datos de VectorBase. *AaeRACK1* (AAEL013069); proteína cinasa C (AAEL000810); 40S proteína ribosomal S12 (AAEL010299); proteína ribosomal S3 (AAEL008192); 40S proteína ribosomal S7 (S7); 40S ribosomal S20 (AAEL009506); 40S proteína ribosomal S10 (AAEL002047); 40S proteína ribosomal S26 (AAEL002832); 959 40S proteína ribosomal S2 (AAEL010168); 40S proteína ribosomal S9 (40sRpS9) y 40S proteína ribosomal S14 (RpS14).

Table 4. Proteínas asociadas a Aea/RACK1 en condición de ayuno de suero en células C6/36 HT identificadas por MALDI TOF/TOF

Num de banda	Id Sec	Nombre de proteína	Función	Num de acceso VectorBase ^a	PM Teor/Exp ^b	pI Teor ^c	Pep Ident ^d	Score	SC % ^e
1	Q16KZ2	Endoplasmína	Proteína plegamiento, respuesta a estrés, unión a ATP	AAEL012827	91/100	4.66	14	882	30
1	Q0IFN2	Factor de elongación de la traducción Eucariótico	Actividad GTPasa, catalysis de elongación de cadena péptido en la biosíntesis de proteínas	AAEL004500	94/100	5.96	11	586	12
1	Q175R3	ATPasa de tipo retículo sarcoplasmic/endoplasmic transportadora de calcio	SERCA es un transportador de ion transmembrana para la regulación de Ca ²⁺ (bomba de calcio)	AAEL006582	112/100	5.27	7	352	10
1	Q16IM0	Cadena pesada de clatrina	Transporte de proteína intracelular, transporte mediada por vesículas	AAEL013614	191/100	5.50	6	407	6
1	Q177S9	Región del Coatmero asociado a WD (Fragmento)	Transporte de proteína intracelular, transporte mediada por vesículas	AAEL006040	106/100	4.95	5	327	9
2	Q16FA5	Proteína de choque térmico 90	Proteína de plegamiento, respuesta a estrés	AAEL010585	81.5/80	4.79	9	492	15
2	Q16SH1	Factor asociado de la espermatogénesis	Familia de las AAA ATPasa	AAEL010585	88.7/80	5.17	8	451	12
3	Q17LF3	Coronina	Proteína con repetidos WD, regulador del citoesqueleto de actina	AAEL001360	61.4/65	6.02	4	183	13
3	J9HSH6	Proteína de choque térmico 70	Proteína ensamblable y plegamiento	AAEL017315	90.3/65	4.91	5	418	10
3	Q175F8	Oxidoreductasa putativa	Proceso de oxidación-reducción	AAEL006684	60.8/65	7.83	4	281	11
4	Q16S95	Quinona oxidoreductasa	Actividad oxidoreductasa	AAEL010668	50.5/45	5.47	7	393	19
4	Q17LW2	Proteína putativa asociada a fosoinositido	Proteína con repetidos WD, participa en señalización	AAEL001212	46.1/45	7.06	6	380	16
4	Q16P63	Actina	Componente del citoesqueleto	AAEL011750	44.7/45	5.88	4	250	16
4	Q17K03	Subunidad del complejo Cop9	Componente del proteosoma 26S	AAEL001874	46.7/45	5.44	4	228	13
4	Q17J37	Proteína de unión a GTP	Proteína en la transducción de señales	AAEL002160	44.7/45	6.62	3	240	11

Num de banda	Id Sec	Nombre de proteína	Función	Num de acceso VectorBase ^a	PM Teor/Exp ^b	pI Teor ^c	Pep Ident ^d	Score	SC % ^e
5	Q1H0K6	Proteína asociada al receptor cinasa Serina-treonina (strap)	Proteína G subunidad β, dominio WD 40. Participa en señalización.	AAEL007382	36/37	5.99	8	560	33
5	Q1HR05	Proteína fosfatasa serina/treonina	Cataliza la defosforilación de residuos pSer y pThr.	AAEL009275	37.3/37	5.89	4	264	17
5	Q17F08	Proteína con dominio CRAL/TRIO	Metabolismo y transporte de lípidos, Tráfico de membranas en TGN, transducción de señales.	AAEL003347	36.8/37	6.62	3	148	12
5	Q16QF1	Anexina	Proteína de unión a fosfolípidos dependiente de calcio.	AAEL011302	35.7/37	4.55	9	525	29
5	Q17MH7	Proteína β3 asociada al nucleótido Guanina (ProteínaGβ3)	Proteína con repelidos WD responsable de transducción de señales	AAEL001041	37/37	5.97	2	121	7.6
6	Q1HQJ2	60S proteína ribosomal L5	Unión al RNA ^r 5S. Componente del ribosoma. Traducción	AAEL004325	34.1/33	10.25	11	623	35
6	Q1HRQ2	Receptor para activar a la proteína cinasa C	Rack1. Proteína con repelidos WD implicada en la transducción de señales y otros.	AAEL013069	34.9/33	7.78	8	432	29
6	Q8MQT0	Proteína ribosomal P0	Biogenesis, componente del ribosoma	AAM97779*	33.8/33	5.33	4	186	17
6	Q1HRU0	Traslucasa ADP/ATP	Transporte transmembrana de la mitocondria	AAEL004855	32.9/33	10.01	4	265	16
6	Q1HQ14	Subunidad 2B alfa del inicio de la transcripción	IF2B, factor del inicio de la transcripción.	AAEL010251	34.1/33	5.28	6	347	25
7	Q16ZR8	40S Proteína ribosomal SA	Componente del ribosoma. Traducción	AAEL008083	31.5/30	4.75	3	165	14
7	Q1HR57	Porina mitocondrial	Transporte. Transmembrana Canal de aniones dependiente de Voltaje anión.	AAEL001872	30.7/30	8.89	13	939	49
7	Q1HRS6	40S proteína ribosomal S4	Traducción, Componente del ribosoma y biogénesis	AAV69397	29.6/30	10.71	7	379	28

Num de banda	Id Sec	Nombre de proteína	Función	Num de acceso VectorBase ^a	PM Teor/Exp ^b	pl Teor ^c	Pep Ident ^d	Score	SC % ^e
7	Q1HRR3	40S proteína ribosomal S3a	Traducción, Componente del ribosoma y biogénesis	AAEL005901	30.1/30	9.89	7	433	26
7	Q4PKD7	Antígeno nuclear de proliferación celular	Replication and reparación del DNA	AAEL012545	29/30	4.47	3	175	21
7	Q1HR32	60S proteína ribosomal L2/L8	Componente del ribosoma. Traducción.	AAEL000987	28.6/30	11.46	5	299	15
7	Q1HR36	Proteína14-3-3 zeta	Proteína Scaffold implicada en la regulación de muchos procesos y especializada en vías de señalización.	AAEL006885	28.2/30	4.63	3	273	18
7	Q1HR13	Prohibitina	Proteína Scaffold que regula muchas vías de señalización, supervivencia de la célula, apoptosis, metabolismo y otros.	AAEL009345	29.9/30	5.23	4	237	26

Las bandas fueron reveladas por SDS-PAGE e identificadas por LC/MS/MS en un QSTAR XL Hybrid System, Applied Biosystems. Analizadas por el programa Mascot v.2.1.

^aSecuencia de *Aedes albopictus* [European Nucleotide Archive (www.ebi.ac.uk)].

^bNumero de acceso VectorBase(www.vectorbase.org).

^cPeso molecular Teorico/Experimental (PM).

^dpl teorico pl reportado en UniProtKB (www.uniprot.org).

^eNumero de peptides matched por LC-MS/MS para cada proteína identificada por el programa Mascot

^fCovertura de la secuencia: porcentaje de amino ácidos de péptidos empalmados en relación a la secuencia completa para cada proteína identificada.

Tabla 5. Clasificación funcional de 33 proteínas identificadas por inmunoprecipitación y espectrometría de masas

Categorías ^a	Proteína
Proteína de plegamiento y ensamble (3)	Endoplasmina Proteína de choque térmico 90 Proteína de choque térmico 70
Respuesta a estrés oxidativo (2)	Oxidoreductasa putativa Quinona oxidoreductasa
Síntesis de DNA (1)	Antígeno nuclear de proliferación celular
Proteínas de citoesqueleto (1)	Actina
Traducción y estructura del ribosoma (8)	60S proteína ribosomal L5 40S proteína ribosomal SA 40S proteína ribosomal S3a 60S proteína ribosomal L2/L6 40S proteína ribosomal S4 Proteína ribosomal P0 Factor de elongación de la traducción Eucariótico Subunidad 2B alfa del inicio de la traducción
Proteínas con repetidos-WD (6)	Receptor para activar a la proteína cinasa C Proteína β3 asociada al nucleótido Guanina (ProteínaGβ3) Región de coatómero asociada a WD (Fragmento) Coronina Proteína putativa asociada a fosfolinosídeo Proteína asociada al receptor cinasa Serina-treonina (strap)
Proteínas de Señalización (6)	Receptor para activar a la proteína cinasa C Proteína β3 asociada al nucleótido Guanina (ProteínaGβ3) Proteína asociada a GTP Proteína con dominio CRAL/TRIO Proteína 14-3-3 zeta Prohibitina
Transporte transmembrana (3)	ATPasa de tipo retículo sarcoplásmico/endoplásmico transportadora de Calcio Translocasa ADP/ATP Porina mitocondrial
Transporte Intracelular (2)	Cadena pesada de clatrina Región del Coatómero asociado a WD (Fragmento)
Proteínas de unión a ATP (2)	Factor asociado de la espermatogénesis ATPasa de tipo retículo sarcoplásmico/endoplásmico transportadora de Calcio
Asociadas al Ion Calcio (1)	Anexina

^aCategorías fueron tomadas de las anotaciones Gene Ontology de los procesos biológicos en VectorBase DB.

6.14 Expresión del gen *Aea/RACK1*

Para confirmar la expresión del RNAm de *Aea/RACK1* en las células C6/36 HT en respuesta a la ausencia de suero, el tratamiento con la PGE₂ y la dexametasona se realizó el ensayo de RT-PCR. En las células sin tratamiento la expresión del RNAm fue escasa, en células en medio de cultivo sin suero incrementó 5.2 veces, en células tratadas con PGE₂ 2.4 veces, y con dexametasona incrementó 5 veces (Fig. 22). Este patrón corresponde con el comportamiento observado en la proteína

6.15 Efecto del estrés sobre la expresión del gen de *Aea/RACK1*

La expresión del RNAm de *Aea/RACK1* en las células C6/36 HT se investigó en ausencia de suero y tratamiento con la dexametasona por qRT-PCR. El nivel de transcripción del gen *Aea/RACK1* incrementó 2 veces en células en ayuno por 2 y 4 h y 1.5 veces en células tratadas con la dexametasona por 2 h, en comparación con las células sin tratamiento (control) (Fig. 23).

6.16 Localización de la proteína *Aea/RACK1*

En vista de que en diferentes sistemas RACK1 cambia de posición dentro de la célula por respuesta a estímulos ambientales (Chang *et al.*, 2001), se estudió la localización de la proteína *Aea/RACK1* en las células C6/36 HT, en ausencia de suero, en tratamiento con la PGE₂ y la dexametasona. En células sin tratamiento la proteína *Aea/RACK1* fue escasa y se localizó en pequeños puntos dispersos en el citoplasma. En células sin suero se observó un incremento en la señal de *Aea/RACK1* y la molécula se localizó principalmente cerca de la membrana plasmática y en una pequeña proporción de puntos en el citoplasma. En células tratadas con la PGE₂ la señal se observó polarizada cerca del núcleo y con la dexametasona la señal de *Aea/RACK1* fue más intensa y uniformemente distribuida en numerosos puntos en el citoplasma (Fig. 24).

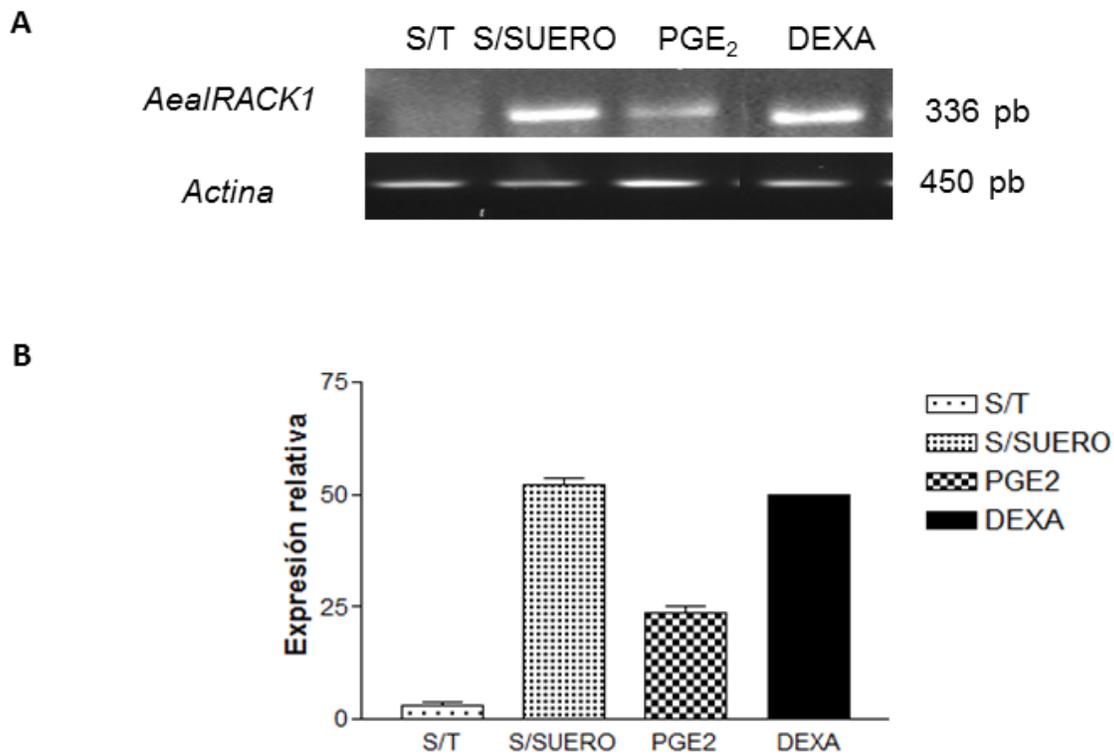


Figura. 22 – Expresión de *Aea/RACK1* en células C6/36 HT en ausencia de suero, tratadas con la PGE₂ y la dexametasona. (A) RNAm *Aea/RACK1* se estimó por RT-PCR en células C6/36 HT en ausencia de suero (S/SUERO), tratadas con la PGE₂ y la dexametasona (DEXA), y en células sin tratamiento(S/T). β -actina se usó como control interno. (B) La expresión de RNAm de *Aea/RACK1* se obtuvo por cuantificación densitométrica de las imágenes no saturadas de la RT-PCR. La expresión relativa se calculó usando el valor de la β -actina. Los experimentos se realizaron por triplicado, * $p = 0.01$ (Media \pm DS).

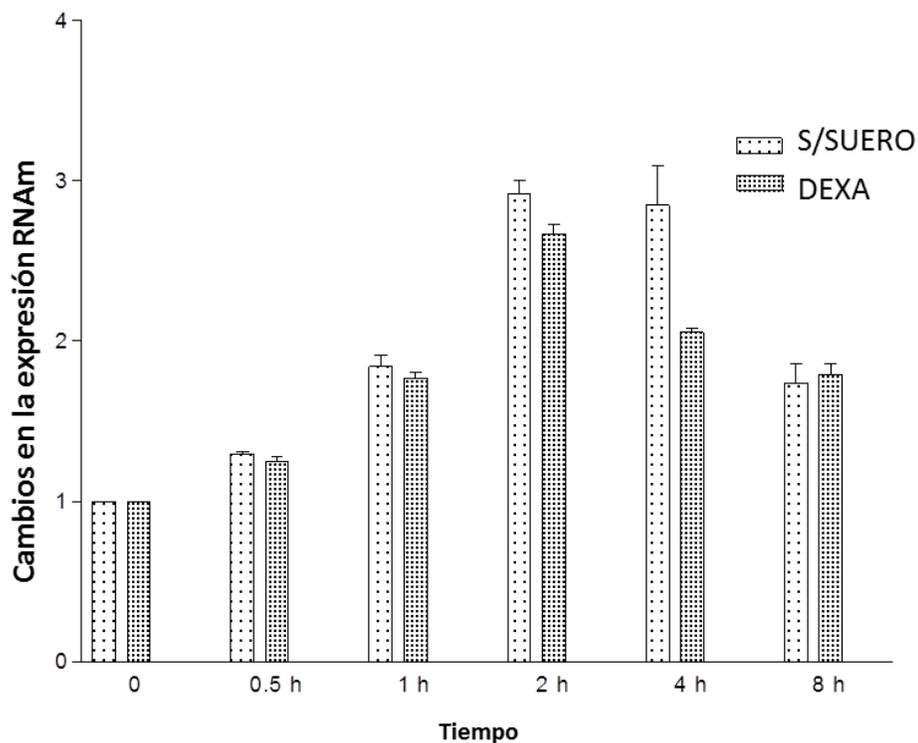


Figura. 23- Expresión del gen *Aea/RACK1* en células C6/36 HT en ausencia de suero y tratadas con la dexametasona. El curso temporal de la expresión de *Aea/RACK1* en células en ausencia de suero y tratadas con la dexametasona (13 μ M), se determinó por qRT-PCR, usando el método comparativo $2^{-\Delta\Delta CT}$, se comparó con la expresión del control de las células y normalizadas con RNAm S7 como control interno. Los resultados se representan como la media \pm DE (N=3).

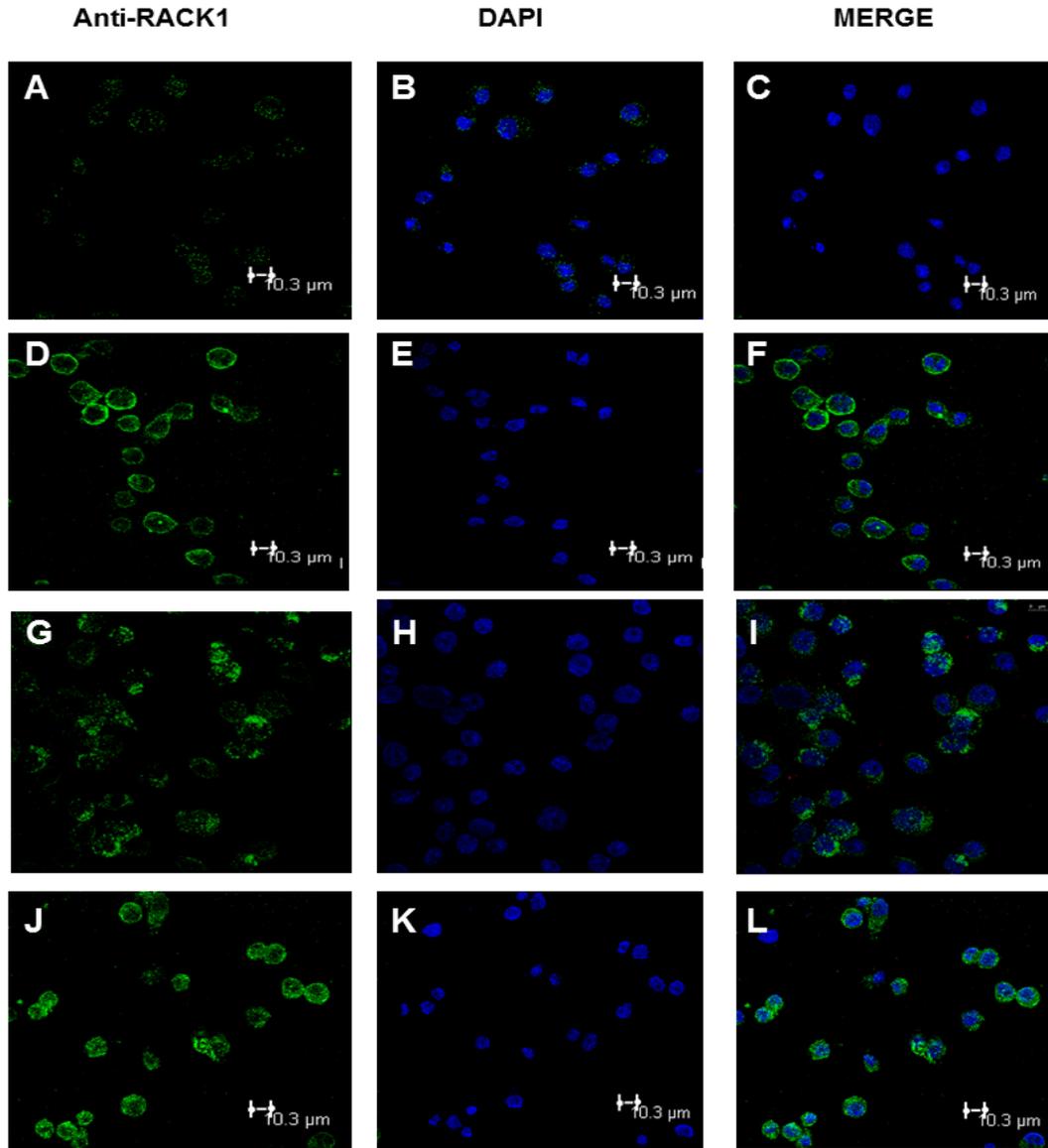


Figura. 24- Localización por microscopia confocal de *Aea/RACK1* en células C6/36 HT en ausencia de suero, tratamiento con la PGE_2 , y la dexametasona. Células sin tratamiento (A-C); Ayuno de suero (D-F); tratamiento con la PGE_2 (28 μM) (G-I); tratamiento con la dexametasona (13 μM) (J-L), se fijaron con paraformaldehído al 1 % y se permeabilizaron con acetona fría. La proteína *Aea/RACK1* se localizó usando un anticuerpo policlonal anti-RACK1 (dilución 1:50) y con un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con Alexa Fluor 488 (color verde, dilución 1:400) (A, D, G y J). El núcleo se tiñó con DAPI (color azul) (B, E, H y K). Colocalización de Imágenes (Merge) (C, F, I y L).

7. DISCUSIÓN.

Las respuestas celulares descritas en los insectos ante distintas condiciones ambientales incluyen: la activación de vías relacionadas a la respuesta inmune, respuesta a estrés térmico y oxidativo entre otras. La coordinación de estas respuestas implica, a nivel celular, vías de señalización, donde la fosforilación de proteínas es fundamental y, a nivel organismo, mecanismos hormonales y nerviosos. Las hormonas más estudiadas en los insectos incluyen la Hormona juvenil (HJ, la hormona del “*status quo*”) (Truman *et al.*, 2007; Hartfelder 2000) y la ecdisona. La HJ regula funciones de mantenimiento de estructuras, reproducción y el proceso de vitelogenesis (Hartfelder 2000). La ecdisona, hormona esteroide se activa en condiciones de cambio, por ejemplo antes de cada muda o, en los mosquitos, después de una alimentación con sangre, causando modificaciones: la hormona activa acelera la muda y la metamorfosis, modifica las conductas de búsqueda de alimento y ovoposición entre otras muchas (Evans y Wood, 2014; Belles y Piulachs, 2015). Otras hormonas que participan en la coordinación de las respuestas de los insectos a los cambios del ambiente son las PGEs, derivados del ácido araquidónico que aunque en mamíferos se ha demostrado que realizan una gran cantidad de tareas, en los insectos sus funciones aún están en estudio. En trabajos previos de nuestro grupo de investigación se demostró que la PGE₂ indujo la expresión del RNAm de péptidos antimicrobianos en (García Gil de Muñoz *et al.*, 2008) y modificó la abundancia de proteínas que participan en el sistema inmune y del citoesqueleto (Ocho Franco *et al.*, 2013) en mosquitos *An. albimanus* y también puede modificar la abundancia de proteínas como la HSP de 60 kDa, transferrina, actina y citocromo C en estómagos aislados de *Ae. aegypti* (Borbolla, 2010). Dado que los mosquitos son muy eficientes en la adaptación al medio, lo que les permite colonizar nuevos ambientes y en su interrelación con los microorganismos que los colonizan e infectan, se puede anticipar que las PGEs coordinan respuestas en estas relaciones con el medio y con los demás seres vivos y dada la importancia de conocer los mecanismos que las PGEs puedan tener en la coordinación de las respuestas de las células de insecto a las condiciones ambientales en este trabajo se propuso como objetivo general:

Analizar las proteínas fosforiladas en células C6/36 derivadas de *Ae. albopictus* bajo tratamiento con PGE₂ y condiciones de estrés, para identificar y caracterizar alguna(s) que participe en vías de señalización.

7.1 Identificación de proteínas fosforiladas por LC-MS/MS y GO

En este trabajo se usó como modelo la línea celular C6/36 HT derivada de *Ae. albopictus* y se identificaron 26 puntos en geles E-2D, que correspondieron a proteínas que cambiaron sus niveles de fosforilación en tratamiento con la PGE₂ y la dexametasona y en ausencia de suero en el medio de cultivo. De estos puntos 11 aumentaron su fosforilación en el tratamiento con la PGE₂, 6 puntos en el tratamiento con la dexametasona y 14 puntos por la ausencia de suero. El suero fetal bovino provee factores de crecimiento, albumina, globulinas, glucosa, proteínas detoxificadoras, antioxidantes y hormonas entre otros (Mucci *et al.*, 2006). El suero en los medios de cultivos tiene efecto sobre el crecimiento celular, cuando el suero es retirado del medio de cultivo las células ya no son capaces de crecer pero pueden permanecer viables (Drugmand *et al.*, 2012).

Estas proteínas de acuerdo a su función, se investigaron en el GO y se encontró que corresponden a moléculas involucradas en plegamiento y ensamblaje de proteínas, estrés oxidativo, síntesis de DNA, citoesqueleto, transporte intracelular, transporte transmembrana y señalización.

Tres proteínas incrementaron su fosforilación bajo el efecto de la PGE₂ y en la ausencia de suero y éstas se identificaron como proteínas de plegamiento y ensamblaje, proteínas de choque térmico (HSP90) (punto 1 y 13), endoplasmína (punto 12) y chaperonina (punto 2), pero bajo tratamiento con la dexametasona todas disminuyeron su fosforilación. La activación de este grupo de proteínas sugiere que la PGE₂ pudiera provocar una respuesta a estrés, ya que estas proteínas responden a diversas señales de estrés. Las células en medio de cultivo sin suero también pueden sufrir estrés por la falta de nutrientes contenidas en el suero. Así la familia de las HSPs se expresan en respuesta a varios estímulos como: estrés por calor, drogas, abióticos, bióticos, inmunidad etc. (Santoro *et al.*,

2010; Benoit *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2011; Zhao y Jones, 2011). Este tipo de respuesta se describió originalmente en respuesta a choque térmico, sin embargo actualmente es considerada como un conjunto de mecanismos de defensa celular contra los efectos dañinos del estrés fisiológico y ambiental, incluyendo la exposición a diferentes drogas, que causan daño celular debido al mal plegamiento, degradación y agregación insoluble de proteínas y alteraciones en el medio intracelular en los procesos óxido-reducción entre otros (Santoro *et al.*, 2010). La señal de estrés, la cual es usualmente provocada por un flujo de proteínas no nativas, resulta en: 1) la activación de factores de transcripción de choque térmico (HSF); 2) en la síntesis de las HSP, 3) funcionan como chaperonas de las proteínas para dirigir que se conformen correctamente durante su síntesis, ensamble y desensamble, translocación y degradación (Santoro *et al.*, 2010). Nuestros resultados fueron concordantes con lo observado en la línea celular A549 derivado de tejido de pulmón canceroso de humano, donde la adición de la PGE₂ incrementó la expresión de genes inducidos por choque térmico, como el gen *HSP72* (Shah *et al.*, 2010). Y con los resultados obtenidos en la línea celular BCIRL- HzAm-1 derivada de las pupas de *Helicoverpa zea* que al ser tratadas con PGE₁ y PGA₁ por 12 h, indujo el incremento en la expresión de la proteína HSP70 (Stanley *et al.*, 2008). En estómagos de *Ae. aegypti* tratados con PGE₂ se indujo la expresión de la HSP60 (Borbolla, 2010).

En este estudio se identificaron fosfoproteínas que participan en los procesos celulares de óxido-reducción como tioredoxina (punto 2), chaperonina (punto 2), peroxiredoxinas (Prxs) (puntos 8, 14) que fueron fosforiladas en Ser y Thr en células en ausencia de suero y en el tratamiento con la PGE₂, y disminuyó la fosforilación en el tratamiento con la dexametasona (Fig.12). Las Prxs son una familia de enzimas evolutivamente conservadas que catalizan la transferencia de electrones desde residuos sulfhídricos a peróxidos (Chen *et al.*, 2011), y se localizan en el citosol. Las Prx 1 y 2 están vinculadas a las redes de fosforilación y sus actividades son reguladas por fosforilación (Park *et al.*, 2014). Las Prxs tienen diversas funciones en las vías de señalización de la defensa celular (Radyuk *et al.*, 2010, Chen *et al.*, 2011), de estas funciones podemos mencionar que tienen un

papel protector antioxidante en las células, reduciendo y detoxificando el peróxido de hidrógeno, el peróxido de nitrito y un amplio rango de hidroperóxidos orgánicos a través de su actividad peroxidasa (David *et al.*, 2007). En macrófagos derivados de la médula ósea de ratones C57BL/6 tratados con PGD₂ y PGE₂ en diferentes dosis y tiempo se observó un aumento significativo en la expresión del RNAm y la proteína Prx 6 (Erttmann *et al.*, 2011). En un estudio con mosquitos *Ae. aegypti*, inoculando bacterias al estómago, se demostró que el peróxido de hidrógeno controla la proliferación bacteriana por lo que la activación de la producción de peróxidos y su control son importantes en la inmunidad del insecto (Oliveira *et al.*, 2011).

Cuatro de las proteínas identificadas en presencia de la PGE₂, la dexametasona y en ausencia de suero fueron de señalización: Calcifosina, Rab7, prohibitina y RACK1. Calcifosina y Rab7 (punto 9) incrementaron su fosforilación en Thr en presencia de la PGE₂ y en ausencia de suero. Calcifosina es una clase de proteína que participa en las vías de señalización mediadas por AMPc y IP₃/Ca²⁺ y es fosforilada por PKA (proteína cinasa dependiente de AMPc), participa en proceso de diferenciación y proliferación celular, se encontró originalmente en la tiroides de perro, en humano se ha encontrado en mayor abundancia en colon, testículos, glándulas salivales, pulmones, placenta y cerebro (Wang *et al.*, 2002). Se ha documentado que un gran número de factores que provocan estrés fisiológico inducen autofagia en líneas celulares cultivadas, estos factores son: supresión de aminoácidos, hipoxia, supresión de glucosa y supresión de suero (Sharifi *et al.*, 2015). En células C6/36 HT en ausencia de suero podemos hipotetizar que se indujo autofagia por la fosforilación de Rab 7. La autofagia es un proceso altamente conservado de degradación intracelular dependiente de lisosomas, en el que los sustratos autofágicos están encerrados por una estructura vesicular de doble membrana y son degradados por un proceso de tráfico de vesículas continuo (Ao *et al.*, 2014). El proceso autofágico se divide en tres pasos: 1) formación del autofagosoma; 2) maduración del autofagosoma y 3) degradación. Numerosas proteínas Rab han sido mostradas por participar en los pasos de la autofagia (Ao *et al.*, 2014). Rab7 es un GTPasa de la familia Rab

asociada con ambos endosomas tempranos y tardíos, para facilitar la formación y maduración del autofagosoma, el transporte del endosoma tardío al lisosoma y el posicionamiento del endosoma y el lisosoma a través de la regulación de su movimiento a lo largo del citoesqueleto. Rab7 participa en la regulación de múltiples procesos de tráfico vesicular incluyendo la biogénesis de los lisosomas, los fagosomas, los autofagosomas y otros organelos relacionados con los lisosomas (Wang *et al.*, 2011; Ao *et al.*, 2014). Y la fosforilación de Rab 7 en células bajo tratamiento con la PGE₂, se pueden estar activando cinasas que regulan la autofagia vía PI3K, río arriba de la vía Tor, la cual está asociada al estado nutricional para el metabolismo y crecimiento celular (Zirin *et al.*, 2015). Por lo que se sugieren futuros estudios para entender los mecanismos que regula la PGE₂ en los insectos.

Prohibitina (PH) (punto 11) incrementó su fosforilación en Thr tanto en el tratamiento con la PGE₂ como en la ausencia de suero. La fosforilación de PH ha sido reportada en la proliferación celular, apoptosis, diferenciación y señalización, en la PHB se identificaron diferentes residuos como Tyr, Ser y Thr, como responsables de las posibles modificaciones postraduccionales que provocan la translocación del núcleo a la mitocondria para proteger a la célula del estrés oxidativo (Mishra *et al.*, 2010). Recientemente se describió que ayuda a la supervivencia celular a través de la vía Ras-Raf-MEK-Erk (Chowdhury *et al.*, 2014).

En los experimentos realizados, RACK1 (punto 25) tuvo cambios notables en su comportamiento ya que se desfosforiló significativamente bajo el efecto de la PGE₂ y se fosforiló en tratamiento con la dexametasona y en ausencia de suero. Dado el efecto decidimos continuar su estudio con más detalle (Fig. 14).

7.2 Análisis bioinformático de RACK1

Las proteínas RACK1 están conservadas en todos los eucariontes y tienen múltiples funciones fisiológicas como proteínas adaptadoras, regulando eventos celulares incluyendo traducción y señalización. Se identificó la secuencia de la proteína RACK1 en el genoma de *Ae. aegypti* (Nene *et al.*, 2007) y se confirmó su presencia con un anticuerpo anti-RACK1 de humano en la línea celular C6/36 HT de *Ae. albopictus*. El gen *AeaeRACK1* codifica para una proteína idéntica a la RACK1 de los mosquitos *Cx. quinquefasciatus* y *An. gambiae* y presenta alta homología con RACK1 de *B. mori* y *D. melanogaster*, *H. sapiens*, *C. elegans* y *S. cerevisiae*, confirmando que RACK1 es una proteína evolutivamente conservada (Fig. 15).

En cuanto al modelo tridimensional de la proteína *AeaeRACK1* generado por Swiss-model ésta tiene una estructura β -Hélice con siete hojas, cada una formada por un dominio WD, arregladas radialmente alrededor de un eje central (Fig. 16A), similar a la de humano (Adams *et al.*, 2011; Ruiz-Carrillo *et al.*, 2012) y a la de *Arabidopsis thaliana* (Ullah *et al.*, 2008) sugiriendo que de manera similar a la molécula de otros organismos *AeaeRACK1* puede interactuar con otras proteínas, formando complejos regulatorios (Liu *et al.*, 2007; Ruiz-Carrillo *et al.*, 2012; Parent *et al.*, 2008; Adams *et al.*, 2011). En trabajos previos se demostró que RACK1 es una proteína *scaffold* que interactúa con diferentes isoformas de $G\beta\gamma$ (Chen *et al.*, 2005). RACK1 puede estar en forma de monómeros y dímeros (Yatime *et al.*, 2011; Ullah *et al.*, 2008; Omosigbo *et al.*, 2014) y en la proteína de humano se definió que la ser-146 en el repetido-WD IV es necesaria para la dimerización de RACK1 (Yatime *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2007). Notablemente la secuencia de *AeaeRACK1* obtenida para este trabajo no contiene la Ser-146, pero contiene otros residuos Ser/Thr en esta región los cuales podrían constituir un blanco para la fosforilación y consecuente dimerización de *AeaeRACK1*, como ocurre en *S. cerevisiae* y *Dictyostelium discoideum* (Chen *et al.*, 2005; Yatime *et al.*, 2011). En nuestros experimentos se comprobó con anticuerpos anti aminoácidos fosforilados que *AeaeRACK1* se fosforila en los aminoácidos de Tyr, Ser y Thr, por lo que es

posible la fosforilación tanto en Ser-157 como en Thr-173 (Fig. 25). Aunado a lo anterior, en *S. cerevisiae* se reportó que el sitio de dimerización de RACK1 posee una His-147 en el dominio WD-IV, la cual estabiliza la unión entre ambos monómeros de RACK1 (Yatime *et al.*, 2011). La secuencia de *Aeae*RACK1 presenta el residuo de His-147 similar al de *S. cerevisiae* (Fig. 25).

7.3 Comportamiento de *Aea/RACK1* en las células C6/36 HT

La detección de *Aea/RACK1* mediante WB en las células C6/36 HT mostró que en células no tratadas hubo bajo nivel de expresión de la proteína. En estudios previos en invertebrados como el camarón (*Penaeus monodon*), la ostra (*Pinctada martensii*) y la plaga de los pinos (*Choristoneura fumiferana*) se ha documentado que los niveles de expresión de RACK1 varían en los tejidos de acuerdo a las condiciones del ambiente, metabólicas y de desarrollo (Saelee *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2014), otros estudios también demostraron que la expresión de RACK1 en larvas L3 de *Drosophila* fue mínimo (Kadrmaz *et al.*, 2007). Estos resultados nos sugieren que los niveles bajos del RNAm y de la proteína *Aea/RACK1* observada en células C6/36 HT no tratadas reflejen su origen larvario. En nuestro estudio observamos que tanto la ausencia de suero como como los tratamientos con la PGE₂ y la dexametasona inducen en las células C6/36 HT un incremento en la proteína *Aea/RACK1*, posiblemente por inducir un tipo de estrés. Un hecho interesante fue que se observaron dos especies de la proteína *Aea/RACK1* identificadas por E-2D los cuales fueron confirmados por LC-MS/MS. La primera especie corresponde al peso molecular y pI (34.89/7.97) calculados directamente para la proteína *Aea/RACK1* a partir de la secuencia presente en la base de datos (AAEL013069). La segunda especie fue más pesada y presentó un pI más ácido (36/6.5) (AAEL013069), y estas características pueden ser explicadas por modificaciones postraduccionales (MPT) como glucosilación. En estudio previos, en diferentes células de mamíferos durante estrés celular se indujo glucosilación y ésta puede causar un pequeño incremento en el peso molecular de RACK1 (Zachara *et al.*, 2004; Ohn *et al.*, 2008; Taylor *et al.*, 2008); y la fosforilación que agrega cargas negativas como ocurre en las especies de RACK1 de humano (Liu *et al.*, 2007) que modifican su pI. La fosforilación de RACK1 es requerida para varias funciones como las interacciones con Src (pTyr 228/246) en el repetido WD-VI (Chang *et al.*, 2001), la unión de PP2A y la β 1 integrina (Tyr-302 en WD-VII) y de FAK (Tyr-52) (Kiely *et al.*, 2008) entre otras. La proporción en la intensidad detectada entre las dos especies de *Aea/RACK1* sugiere que en las células sin tratamiento hay

cantidades similares de la proteína. En comparación en las condiciones de estrés la cantidad de proteína y la proporción entre estos cambios (glucosilación y fosforilación) es mayor, sugiriendo que la proteína *Aea/RACK1* incrementa en condiciones de estrés y la proporción de las especies es alta, la cual es consistente con una activación de RACK1 en otros sistemas.

El incremento de RACK1 también se ha observado bajo diferentes condiciones de estrés en modelos biológicos, en el cuerpo graso de lavas de *Drosophila* donde se indujo autofagia por carencia de nutrientes, RACK1 se expresó en bajos niveles en estado basal y aumentó su abundancia durante la autofagia (Erdi *et al.*, 2012); en *P. monodon* la abundancia de RACK1 aumentó cuando los animales fueron tratados con peróxido de hidrógeno y RACK1 fue propuesto como un antioxidante no enzimático de la respuesta antioxidante (Saelee *et al.*, 2011); y en *A. thaliana* RACK1 también aumentó en abundancia por estrés salino (Shi *et al.*, 2011). El aumento en la expresión del RNAm y en la abundancia de la proteína de *Aea/RACK1* en células C6/36 HT en ausencia de suero y en tratamiento con la PGE₂ y la dexametasona muestra condiciones de estrés, una por carencia de nutrientes y las otras por la inducción de las drogas.

7.4 Expresión del RNAm *Aea/RACK1*

El RNAm *Aea/RACK1* incrementó su expresión por la supresión de suero al medio de cultivo y por el tratamiento con la dexametasona. Dada que la expresión de RACK1 se ha visto incrementada por el efecto de químicos, fármacos y la supresión de nutrientes en diversos organismos, suponemos que la carencia de suero y dexametasona indujeron un tipo de estrés a las células C6/36 HT por el incremento de la expresión del RNAm de *RACK1*. Aunque en este momento no es posible explicar las diferencias de *Aea/RACK1* bajo el efecto de la dexametasona, esto deberá ser estudiado en un futuro de como la dexametasona regula la expresión del gen de *Aea/RACK1*.

Dexametasona, una droga con diversos efectos sobre las células y considerado un xenobiótico (Inayat-Hussain *et al.*, 2009; Audet *et al.*, 2009), induce un incremento

en la expresión de *Aea/RACK1* lo cual parece resultar en resistencia a apoptosis (Mourtada-Maarabouni *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2010; Al-Reefy *et al.*, 2010). Aunque estos datos son controversiales porque hay reportes donde la expresión de RACK1 correlaciona con apoptosis en células tumorales (Nuñez *et al.*, 2009). En nuestro ensayo de apoptosis se observó que en las células tratadas con 51 μM de dexametasona la apoptosis se incrementó tres veces y 1.5 veces en la dosis de 13 μM comparada con las células sin tratamiento. Por esta razón se seleccionó esta concentración y el efecto observado en todos los ensayos se debió al fármaco y no a la muerte de las células.

7.5 Asociación de *Aea/RACK1* con proteínas

Las proteínas que interactúan con *Aea/RACK1* en las células carentes de suero, tratamiento con la PGE₂ y la dexametasona fueron inmunoprecipitadas. Los complejos inmunes formados bajo la ausencia de suero se recuperaron y las proteínas presentes se identificaron por espectrometría de masas. En esta condición *Aea/RACK1* se asoció con 33 proteínas, las cuales se agruparon en once categorías funcionales (Fig. 20, Tabla 5). Muchas de estas proteínas han sido reportadas independientemente por interactuar con RACK1 en diferentes sistemas, en nuestros resultados se identificaron estas proteínas simultáneamente. Además, se encontró asociación con la proteína HSP 90, endoplasmina (una variante de HSP 90) y HSP 70, sobre las cuales no encontramos reportes de asociación directa con RACK1.

Otras proteínas identificadas en este trabajo como asociadas a *Aea/RACK1* fueron dos oxidoreductasas. Las oxidoreductasas son enzimas que contiene un par de cisteínas catalíticas las cuales participan en la oxidación del sustrato por intercambio de reacciones tiol-disulfuros para la formación de los enlaces disulfuros. La formación de las estructuras de los enlaces disulfuros por la maquinaria oxidativa se lleva a cabo durante el plegamiento de proteínas en varios compartimentos de las células como el retículo endoplasmico y el espacio intermembranal de la mitocondria (Kojer *et al.*, 2014), así como otras proteínas participan en la síntesis de proteínas (24%) como parte de o independientemente

de la estructura ribosomal, lo cual es consistente con lo reportado en otros sistemas donde RACK1 puede localizarse en el ribosoma para regular la traducción (Ruan *et al.*, 2012; Rachfall *et al.*, 2013).

Asociadas a *Aea/RACK1* también se identificaron proteínas de señalización incluyendo proteínas con repetidos WD (30%) al igual que ocurre en otros sistemas, las interacciones se explican por la afinidad de estos repetidos que funcionan formando puntos de contacto entre proteínas para formar complejos (Adams *et al.*, 2011; Neasta *et al.*, 2012). Usando el servidor STRING 9.05 se recurrió a las interacciones conocidas de las proteínas RACK1 de todos los sistemas biológicos para predecir las que pudiera establecer *AeaeRACK1* y comparar con las que se encontraron (Inayat-Hussain *et al.*, 2009; Gibson 2012). Se apreció que las principales asociaciones ocurren con proteínas ribosomales (Fig. 21). Estos datos tomados en conjunto indican que en las células de mosquito *AeaeRACK1* también forma parte, al menos temporalmente, del ribosoma y puede estar participando en la regulación de la traducción de proteínas (Ruan *et al.*, 2012; Rachfall *et al.*, 2013; Ceci *et al.*, 2012; Sharma *et al.*, 2013; Sengupta *et al.*, 2004), por lo que podemos sugerir que *Aea/RACK1* es un componente integral de la subunidad 40S del ribosoma y adaptador para proteínas en respuesta a múltiples estímulos, tales como estrés y tratamientos con drogas (Kundu *et al.*, 2013).

7.6 Localización de *Aea/RACK1* en células C6/36 HT

En los ensayos anteriores se demostró *que Aea/RACK1* modifica su localización en las células dependiendo de la presencia de hormonas y de alimentación, aumentando su abundancia en condiciones de estrés. En diferentes condiciones fisiológicas, RACK1 se transloca a varios compartimentos celulares (citósol, retículo endoplásmico y núcleo), dependiendo de las asociaciones con otras proteínas (Kundu *et al.*, 2013), lo cual puede corresponder al tipo de respuesta que esté realizando. En células crecidas en medio completo y en acuerdo a lo observado al analizar la proteína por medio de WB, se encontró poca señal de la presencia de la proteína. Al cambiar las condiciones, tanto en presencia de la

dexametasona como en la ausencia de suero, la presencia de *Aea/RACK1* aumentó notablemente y lo que fue muy interesante es que la localización se modificó en función de la condición de incubación de las células. En la condición de ayuno la localización de *Aea/RACK1* fue cerca de la membrana plasmática, posiblemente asociada al citoesqueleto de actina (actin cortex), lo cual es semejante al patrón descrito para neuronas, donde bajo el efecto de dioxina RACK1 se asocia con PKC β II formando un complejo y migrando a la membrana (Lee *et al.*, 2007). En fibroblastos NIH 3T3 tratados con PMA, RACK1 se translocó desde la región perinuclear a la membrana plasmática, donde se asoció con Src (Chang *et al.*, 2001). También se ha reportado la translocación de RACK1 desde el citosol a la membrana plasmática como parte de un mecanismo para la regulación de la proteína de transducción de señal G β γ (Chen *et al.*, 2004). En la condición con PGE₂ *Aea/RACK1* se localizó en forma polarizada cerca del núcleo, sugiriendo asociaciones con el retículo endoplásmico (RE), esta hipótesis concuerda con lo demostrado por Parent *et al* (2008) en donde células HEK293 transfectadas con el receptor β de tromboxano A₂ asociado a la proteína verde fluorescente (TP β -GFP) mostraron una localización entre RACK1 y el TP β en el RE. En el caso de las células tratadas con la dexametasona *Aea/RACK1* se observó formando puntos en todo el citoplasma, similar a lo observado cuando RACK1 se incorpora dentro de los gránulos de estrés después de la exposición a hipoxia, a arsenito de sodio y a choque térmico; todo lo anterior impide la activación de la vía de señalización MAPK en respuesta a estrés, lo cual a su vez conduce a la supervivencia en lugar de la apoptosis de las células (Mourtada-Maarabouni *et al.*, 2005; Arimoto *et al.*, 2008). En relación a este trabajo, a la fecha se desconoce si los numerosos puntos observados en el citoplasma de las células C6/36 HT por el tratamiento con la dexametasona equivalen a un secuestro de *Aea/RACK1* en los gránulos del estrés a través de su unión con la subunidad 40s del ribosoma (Arimoto *et al.*, 2008). Las asociaciones posibles de *Aea/RACK1* a otras moléculas en estos sitios y los efectos resultantes serán investigados (Fig.24).

7.7 Análisis bioinformático del promotor del gen *AeaeRACK1*.

La expresión de RACK1 debe responder a diferentes condiciones ambientales para lograr la adaptación de las células. Para ello la regulación de esta expresión debe poseer elementos que le permitan una expresión diferencial regulada. En un reporte previo, la región río arriba del gen *GNB2L1* que codifica a RACK1 en el humano fue analizada, y se encontraron varios elementos reguladores de la transcripción conocidos y conservados evolutivamente y su actividad fue confirmada por ensayos de delección (Delvecchio *et al.*, 2009, Buoso *et al.*, 2011). En este trabajo gracias al uso de la base de datos TRANSFAC® 7.0 Public 2005 se analizó la región río arriba del gen *AeaeRACK1* y se detectaron varios sitios de unión a factores de transcripción, varios de ellas similares a los encontrados en la región reguladora del gen del humano (Fig. 26), incluyendo una secuencia consenso para activar a la proteína 1 (AP-1) (posición-109), el cual es un elemento activador general. Otros elementos interesantes de unión a factores de transcripción activados por estrés también están presentes, tal es el caso de la proteína de unión a enhancer/CCAT(C/EBP) (-116) el cual es un mediador de la vía de señalización a estrés en el retículo endoplásmico, relacionada con la formación de gránulos de estrés; un elemento de respuesta a glucocorticoides (GRE) en la posición -303 el cual participa en la respuesta a la dexametasona y al receptor α activador de la proliferación de peroxisomas (PPAR α) (-819), este elemento responde a hormonas incluyendo las prostaglandinas, además de la dexametasona. Es importante mencionar que en la región promotora de diversos genes presentan diversos sitios de unión a múltiples factores de transcripción en respuesta a los glucocorticoides, pero solo hay pocas secuencias que se une a GRE, un buen ejemplo es el gen *PEPCK*, el cual solo tiene dos sitios de unión a GR, el complejo receptor-glucocorticoide se une a los sitios contenidos en el promotor del gen para regular su expresión (Hayashi *et al.*, 2004; Ratman *et al.*, 2013). Otros elementos en la región de *Ae. aegypti* incluyeron dos secuencias consenso para la proteína 1 específica (Sp1)(-349 y -369); una proteína de unión a elemento de respuesta a cAMP (CREB) (-496), segundo mensajero sintetizado por estrés; el elemento de respuesta a la hormona Ecdicsona de insecto (EcRE), la

cual ya se mencionó se sintetiza en situaciones de cambio como la metamorfosis y la muda (-636); y una familia veintiséis-E (c-Ets-1) (-904) (Kalet *et al.*, 2013) también estuvieron presentes. Ets-1 pertenece a la familia de factores de transcripción Ets la cual tiene varias funciones biológicas como proliferación celular, diferenciación, hematopoyesis, apoptosis angiogénesis y transformación celular. En estudios previos han demostrado que los miembros de la familia Ets, incluyendo a Ets-, constituyen un sustrato importante de las MAPKs, las cinasas PI3 y de las vías de señalización específicas de Ca^{2+} , (Zhang *et al.*, 2014). La conformación de esta serie de elementos permite proponer una explicación para las respuestas diferenciadas de RACK1 bajo las condiciones usadas en este trabajo. Este análisis apoya la transcripción del gen *AeaeRACK1* en ausencia de suero, en presencia de la PGE_2 y de la dexametasona, las condiciones de estrés, tanto nutricional como por xenobióticos y posibles diferencias en el comportamiento puede ser debido a la acción de otros genes que podrían compartir elementos que responden al ayuno sin suero o a las drogas y a una inactivación conducida por receptores a glucocorticoides (transrepresión) (Ratman *et al.*, 2013). Investigaciones futuras deberán investigar el comportamiento de RACK1 en otras condiciones fisiológicas como desarrollo embrionario y metamorfosis, así como con otros inductores de estrés como xenobióticos, incluyendo insecticidas.

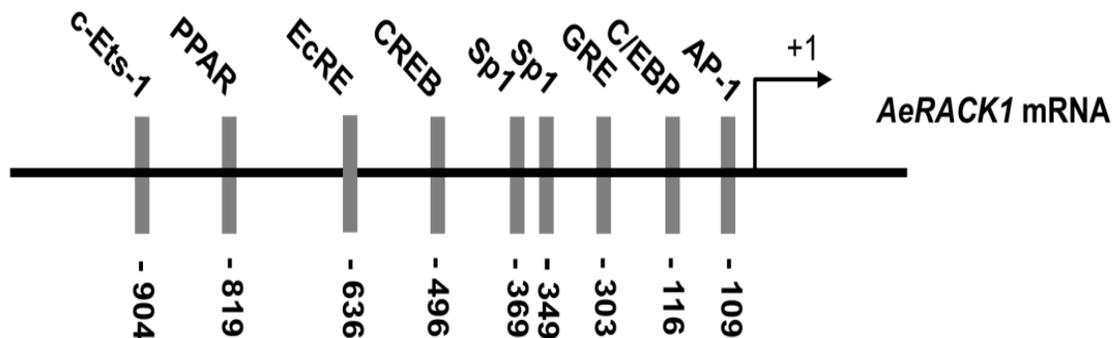


Figura. 26- Sitios de unión a factores de transcripción putativos rio arriba del gen *AeaeRACK1*. La región rio arriba de 1000 pares de bases del gen *AeaeRACK1* fue obtenida de la base de datos disponible en VectorBase, se analizaron los sitios de unión a factores de transcripción con el programa TESS (<http://www.cbil.upenn.edu/tess/>), se usaron la base de datos TRANSFAC 7.0. En la figura solo están anotadas las secuencias reportadas a elementos de unión a factores de transcripción. (AP-1; activating protein-1) Proteína-1 ; (C/EBP; CCAT/enhancer binding protein) Proteína de unión a CCAT/enhancer; (GRE; glucocorticoid response element) Elemento de respuesta a glucocorticoides; (Sp1; Specificity protein 1) Proteína 1 específica; (CREB; cAMP Response Element Binding protein) Proteína de unión a elemento de respuesta a cAMP; (EcRE; Ecdysone response element) Elemento de respuesta a Ecdicsona; (PPAR α ; peroxisome proliferator-activated receptor alpha) Receptor alfa activador del proliferador de peroxisomas; (c- Ets-1; E-twenty six family) Familia 26-E. (+1) Indica la probabilidad del sitio de inicio de la transcripción.

8. CONCLUSIONES

En este trabajo, mediante estrategia proteómica, se identificaron en las células c6/36 HT derivadas de embriones de *Ae. albopictus* como modelo de células de un mosquito vector de enfermedades virales y parasitarias, proteínas que respondieron a la presencia de la hormona PGE₂ su inhibidor la dexametasona y al ayuno de suero, modificando su fosforilación. Estas proteínas incluyeron proteínas de plegamiento y ensamble (endoplasmina, HSP90, chaperonina), de respuesta a estrés oxidativo (óxido reductasa putativa, tioredoxina reductasa, Prx 1,2,3, Prx6), proteínas de citoesqueleto (actina, septina, factor de depolimerización de actina, tubulina), proteínas de procesos metabólicos (fructosa bifosfato aldolasa, piruvato deshidrogenasa, gliceraldehido-3-fosfato-dehidrogenasa), transporte de membrana (canal selectivo de anión dependiente de voltaje), asociadas a calcio (calcifosina), y proteínas de señalización (RACK1, Rab7, prohibitina). Sugiriendo que cada tratamiento aplicado a las células C6/36 activa vías de señalización, PGE₂ activó la fosforilación de las proteínas de choque térmico (HSP90, endoplasmina, peroxiredoxinas) sugiriendo que PGE₂ es un inductor del estrés oxidativo. En la condición de ayuno y dexametasona se encontró la fosforilación de RACK1, proteína que participa en varios procesos biológicos, sugiriendo que estas condiciones son inductores de estrés.

Aea/RACK1 se caracterizó por su posible papel en la regulación de la homeostasis celular. Los resultados confirman que esta proteína es altamente conservada. *Aea/RACK1* en ayuno de suero, en tratamiento con la PGE₂ y la dexametasona, a nivel de la expresión del mRNA se observó un incremento en su expresión y a nivel de abundancia la proteína también incrementó y se detectó dos especies de la proteína (diferente peso molecular y diferente pI) posiblemente por modificaciones postraduccionales, como fosforilación o glucosilación. La localización subcelular de la proteína también fue diferente dependiendo del estímulo, sugiriendo una respuesta adaptativa a estas condiciones de estrés. Estas observaciones indican una respuesta diferencial dependiendo del tipo de estrés y dirigiendo una respuesta específica y eficaz para la supervivencia.

Aea/RACK1 es una proteína *scaffold* y en este trabajo se realizó una descripción de las proteínas que se encuentran asociadas a ella. A nivel de asociación se encontró que *Aea/RACK1* se unió de manera importante a proteínas ribosomales y de señalización, sugiriendo que *Aea/RACK1* como en otros sistemas es un componente dinámico del ribosoma que cuando se asocia a él probablemente modula la traducción pero puede disociarse regulando otras funciones.

REFERENCIAS

Adams DR, Ron D, Kiely PA (2011). RACK1, A multifaceted scaffolding protein: Structure and function. *Cell Commun Signal* **9**(1): 22.

Al-Reefy S, Osman H, Jiang W, Mokbel K (2010). Evidence for a pro-apoptotic function of RACK1 in human breast cancer. *Oncogene* **29**(41): 5651-5651.

Ao X, Zou L, Wu Y (2014). Regulation of autophagy by the Rab GTPase network. *Cell Death & Differentiation* **21**(3): 348-358.

Arimoto K, Fukuda H, Imajoh-Ohmi S, Saito H, Takekawa M (2008). Formation of stress granules inhibits apoptosis by suppressing stress-responsive MAPK pathways. *Nature Cell Biology* **10**(11): 1324-1332.

Audet-Walsh É, Anderson A (2009). Dexamethasone induction of murine CYP2B genes requires the glucocorticoid receptor. *Drug Metabolism and Disposition* **37**(3): 580-588.

Belles X, Piulachs M-D (2015). Ecdysone signalling and ovarian development in insects: from stem cells to ovarian follicle formation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms* **1849**(2): 181-186.

Benoit JB, Lopez-Martinez G, Patrick KR, Phillips ZP, Krause TB, Denlinger DL (2011). Drinking a hot blood meal elicits a protective heat shock response in mosquitoes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*: 201105195.

Borbolla-Vazquez J (2010). Análisis proteómico de los estómagos del mosquito *Aedes aegypti* vector del dengue, bajo un tratamiento con PGE₂. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Iztacala. México D.F.

Buchon N, Silverman N, Cherry S (2014). Immunity in *Drosophila melanogaster*--from microbial recognition to whole-organism physiology. *Nature reviews. Immunology* **14**(12): 796-810.

Buoso E, Lanni C, Molteni E, Rousset F, Corsini E, Racchi M (2011). Opposing effects of cortisol and dehydroepiandrosterone on the expression of the receptor for Activated C Kinase 1: Implications in immunosenescence. *Experimental Gerontology* **46**(11): 877-883.

Burlandy FM, Ferreira DF, Rebello MA (2004). Inhibition of vesicular stomatitis virus replication by prostaglandin A1 in *Aedes albopictus* cells. *Zeitschrift fur Naturforschung. C, Journal of Biosciences* **59**(1-2): 127-131.

Buyukguzel E, HyrsI P, Buyukguzel K (2010). Eicosanoids mediate hemolymph oxidative and antioxidative response in larvae of *Galleria mellonella* L. *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology* **156**(2): 176-183.

Ceci M, Welshhans K, Ciotti MT, Brandi R, Parisi C, Paoletti F, *et al.* (2012). RACK1 is a ribosome scaffold protein for β -actin mRNA/ZBP1 complex. *PloS One* **7**(4): e35034.

Clark AR (2007). Anti-inflammatory functions of glucocorticoid-induced genes. *Molecular and Cellular Endocrinology* **275**(1): 79-97.

Cornelussen RN, Gupta S, Knowlton AA (2001). Regulation of prostaglandin A1-induced heat shock protein expression in isolated cardiomyocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **33**(8): 1447-1454.

Chang BY, Chiang M, Cartwright CA (2001). The interaction of Src and RACK1 is enhanced by activation of protein kinase C and tyrosine phosphorylation of RACK1. *Journal of Biological Chemistry* **276**(23): 20346-20356.

Chang TS, Jeong W, Choi SY, Yu S, Kang SW, Rhee SG (2002). Regulation of peroxiredoxin I activity by Cdc2-mediated phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry* **277**(28): 25370-25376.

Chen-Chih Wu R, Shaio MF, Cho WL (2007). A p38 MAP kinase regulates the expression of the *Aedes aegypti* defensin gene in mosquito cells. *Insect Molecular Biology* **16**(4): 389-399.

Chen J, Liu J, Xiao S, Yu Z (2011). Molecular cloning, characterization and expression analysis of receptor for activated C kinase 1 (RACK1) from pearl oyster (*Pinctada martensii*) challenged with bacteria and exposed to cadmium. *Fish & Shellfish Immunology* **31**(6): 781-787.

Chen S, Dell EJ, Lin F, Sai J, Hamm HE (2004). RACK1 regulates specific functions of G β γ . *Journal of Biological Chemistry* **279**(17): 17861-17868.

Chen S, Lin F, Hamm HE (2005). RACK1 binds to a signal transfer region of G β γ and inhibits phospholipase C β 2 activation. *Journal of Biological Chemistry* **280**(39): 33445-33452.

Chowdhury I, Thompson WE, Thomas K (2014). Prohibitins Role in Cellular Survival Through Ras-Raf-MEK-ERK Pathway. *Journal of Cellular Physiology* **229**(8): 998-1004.

David E, Tanguy A, Moraga D (2007). Peroxiredoxin 6 gene: a new physiological and genetic indicator of multiple environmental stress response in Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Aquatic Toxicology* **84**(3): 389-398.

Dean P, Gadsden JC, Richards EH, Edwards JP, Charnley AK, Reynolds SE (2002). Modulation by eicosanoid biosynthesis inhibitors of immune responses by the insect *Manduca sexta* to the pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology* **79**(2): 93-101.

Del Vecchio I, Zuccotti A, Pisano F, Canneva F, Lenzken SC, Rousset F, *et al.* (2009). Functional mapping of the promoter region of the GNB2L1 human gene coding for RACK1 scaffold protein. *Gene* **430**(1): 17-29.

Deribe YL, Pawson T, Dikic I (2010). Post-translational modifications in signal integration. *Nature Structural & Molecular Biology* **17**(6): 666-672.

Dey I, Lejeune M, Chadee K (2006). Prostaglandin E2 receptor distribution and function in the gastrointestinal tract. *British Journal of Pharmacology* **149**(6): 611-623.

Drugmand J-C, Schneider Y-J, Agathos SN (2012). Insect cells as factories for biomanufacturing. *Biotechnology Advances* **30**(5): 1140-1157.

Érdi B, Nagy P, Zvara Á, Varga Á, Pircs K, Ménesi D, *et al.* (2012). Loss of the starvation-induced gene Rack1 leads to glycogen deficiency and impaired autophagic responses in *Drosophila*. *Autophagy* **8**(7): 1124-1135.

Erttmann SF, Bast A, Seidel J, Breitbach K, Walther R, Steinmetz I (2011). PGD2 and PGE2 regulate gene expression of Prx 6 in primary macrophages via Nrf2. *Free Radical Biology & Medicine* **51**(3): 626-640.

Evans IR, Wood W (2014). *Drosophila* blood cell chemotaxis. *Current Opinion in Cell Biology* **30**: 1-8.

Franco AdPO, Hernández FdICH, de Muñoz FLG-G, Rodríguez MH, Raga FEC (2013). Efecto de Prostaglandina E2 en la expresión de proteínas en los estómagos de mosquitos hembras de *Anopheles albimanus*. *Investigación Universitaria Multidisciplinaria: Revista de Investigación de la Universidad Simón Bolívar*(12): 103-111.

Garcia Gil de Munoz FL, Martinez-Barnetche J, Lanz-Mendoza H, Rodriguez MH, Hernandez-Hernandez FC (2008). Prostaglandin E2 modulates the expression of antimicrobial peptides in the fat body and midgut of *Anopheles albimanus*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **68**(1): 14-25.

Gibson TJ (2012). RACK1 research—ships passing in the night? *FEBS Letters* **586**(17): 2787-2789.

González-Santoyo I, Córdoba-Aguilar A (2012). Phenoloxidase: a key component of the insect immune system. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **142**(1): 1-16.

Görg A, Weiss W, Dunn MJ (2004). Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* **4**(12): 3665-3685.

Guerrero JA, Vicente V, Corral J (2011). Dexamethasone induction of a heat stress response. *Methods in Enzymology* **490**: 121-135.

Hartfelder K (2000). Insect juvenile hormone: from "status quo" to high society. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **33**(2): 157-177.

Hayashi R, Wada H, Ito K, Adcock IM (2004). Effects of glucocorticoids on gene transcription. *European Journal of Pharmacology* **500**(1): 51-62.

Huang SJ, Wu RC, Shaio MF, Wang PS, Cho WL (2003). An immune signalling kinase AaMEK3 from mosquitoes: cDNA cloning and characterization. *Insect Molecular Biology* **12**(6): 595-603.

Igarashi A (1978). Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* cell clone sensitive to dengue and chikungunya viruses. *Journal of General Virology* **40**(3): 531-544.

Inayat-Hussain S, Wong L, Chan K, Rajab N, Din L, Harun R, *et al.* (2009). RACK-1 overexpression protects against goniothalamine-induced cell death. *Toxicology Letters* **191**(2): 118-122.

Kadmas JL, Smith MA, Pronovost SM, Beckerle MC (2007). Characterization of RACK1 function in *Drosophila* development. *Developmental Dynamics* **236**(8): 2207-2215.

Kalet BT, Anglin SR, Handschy A, O'Donoghue LE, Halsey C, Chubb L, *et al.* (2013). Transcription factor Ets1 cooperates with estrogen receptor α to stimulate estradiol-dependent growth in breast cancer cells and tumors. *PLoS One* **8**(7): e68815.

Kaul G, Thippeswamy H (2011). Role of heat shock proteins in diseases and their therapeutic potential. *Indian Journal of Microbiology* **51**(2): 124-131.

Kiely PA, Baillie GS, Lynch MJ, Houslay MD, O'Connor R (2008). Tyrosine 302 in RACK1 is essential for insulin-like growth factor-I-mediated competitive binding of PP2A and β 1 integrin and for tumor cell proliferation and migration. *Journal of Biological Chemistry* **283**(34): 22952-22961.

Kim T, Kim Y (2005). Overview of innate immunity in *Drosophila*. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* **38**(2): 121.

Kingsolver MB, Huang Z, Hardy RW (2013). Insect antiviral innate immunity: pathways, effectors, and connections. *Journal of Molecular Biology* **425**(24): 4921-4936.

Kojer K, Riemer J (2014). Balancing oxidative protein folding: the influences of reducing pathways on disulfide bond formation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics* **1844**(8): 1383-1390.

Kozawa O, Otsuka T, Hatakeyama D, Niwa M, Matsuno H, Ito H, *et al.* (2001). Mechanism of prostaglandin D₂-stimulated heat shock protein 27 induction in osteoblasts. *Cellular Signalling* **13**(8): 535-541.

Krautz R, Arefin B, Theopold U (2014). Damage signals in the insect immune response. *Frontiers in Plant Science* **5**: 342.

Kundu N, Dozier U, Deslandes L, Somssich IE, Ullah H (2013). Arabidopsis scaffold protein RACK1A interacts with diverse environmental stress and photosynthesis related proteins. *Plant Signaling & Behavior* **8**(5).

Kuno G, Oliver A (1989). Maintaining mosquito cell lines at high temperatures: Effects on the replication of flaviviruses. *In vitro Cellular & Developmental Biology* **25**(2): 193-196.

Le Goff G, Bousses P, Julienne S, Brengues C, Rahola N, Rocamora G, *et al.* (2012). The mosquitoes (Diptera: Culidae) of Seychelles: taxonomy, ecology, vectorial importance, and identification keys. *Parasites & Vectors* **5**: 207.

Lee H-G, Kim S-Y, Choi E-J, Park K-Y, Yang J-H (2007). Translocation of PKC- β II is mediated via RACK-1 in the neuronal cells following dioxin exposure. *Neurotoxicology* **28**(2): 408-414.

Liu YV, Hubbi ME, Pan F, McDonald KR, Mansharamani M, Cole RN, *et al.* (2007). Calcineurin promotes hypoxia-inducible factor 1 α expression by dephosphorylating RACK1 and blocking RACK1 dimerization. *Journal of Biological Chemistry* **282**(51): 37064-37073.

Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* **25**(4): 402-408.

Marmaras VJ, Lampropoulou M (2009). Regulators and signalling in insect haemocyte immunity. *Cellular Signalling* **21**(2): 186-195.

Meirer K, Steinhilber D, Proschak E (2014). Inhibitors of the arachidonic acid cascade: interfering with multiple pathways. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* **114**(1): 83-91.

Mihaly J, Kockel L, Gaengel K, Weber U, Bohmann D, Mlodzik M (2001). The role of the Drosophila TAK homologue dTAK during development. *Mechanisms of Development* **102**(1-2): 67-79.

Miller JS (2005). Eicosanoids influence in vitro elongation of plasmatocytes from the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **59**(1): 42-51.

Mishra S, Ande SR, Nyomba B (2010). The role of prohibitin in cell signaling. *FEBS Journal* **277**(19): 3937-3946.

Mizutani T, Kobayashi M, Eshita Y, Inanami O, Yamamori T, Goto A, *et al.* (2003). Characterization of JNK-like protein derived from a mosquito cell line, C6/36. *Insect Molecular Biology* **12**(1): 61-66.

Montero-Solis C, Gonzalez-Ceron L, Rodriguez M, Cirerol B, Zamudio F, Possanni L, *et al.* (2004). Identification and characterization of gp65, a salivary-gland-specific molecule expressed in the malaria vector *Anopheles albimanus*. *Insect Molecular Biology* **13**(2): 155-164.

Mosso C, Galván-Mendoza IJ, Ludert JE, del Angel RM (2008). Endocytic pathway followed by dengue virus to infect the mosquito cell line C6/36 HT. *Virology* **378**(1): 193-199.

Mourtada-Maarabouni M, Kirkham L, Farzaneh F, Williams GT (2005). Functional expression cloning reveals a central role for the receptor for activated protein kinase C 1 (RACK1) in T cell apoptosis. *Journal of Leukocyte Biology* **78**(2): 503-514.

Mucci N, Aller J, Kaiser G, Hozbor F, Alberio R (2006). Producción in vitro de embriones bovinos: suplementación de los medios de cultivo con suero. *Archivos de Medicina Veterinaria* **38**(2): 97-104.

Myllymaki H, Valanne S, Ramet M (2014). The *Drosophila* imd signaling pathway. *J Immunol* **192**(8): 3455-3462.

Neasta J, Kiely PA, He D-Y, Adams DR, O'Connor R, Ron D (2012). Direct interaction between scaffolding proteins RACK1 and 14-3-3 ζ regulates brain-derived neurotrophic factor (BDNF) transcription. *Journal of Biological Chemistry* **287**(1): 322-336.

Nene V, Wortman JR, Lawson D, Haas B, Kodira C, Tu ZJ, *et al.* (2007). Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector. *Science* **316**(5832): 1718-1723.

Núñez A, Franco A, Madrid M, Soto T, Vicente J, Gacto M, *et al.* (2009). Role for RACK1 orthologue Cpc2 in the modulation of stress response in fission yeast. *Molecular Biology of the Cell* **20**(18): 3996-4009.

O'Farrell PH (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *Journal of Biological Chemistry* **250**(10): 4007-4021.

Ohn T, Kedersha N, Hickman T, Tisdale S, Anderson P (2008). A functional RNAi screen links O-GlcNAc modification of ribosomal proteins to stress granule and processing body assembly. *Nature Cell Biology* **10**(10): 1224-1231.

Oliveira JH, Goncalves RL, Lara FA, Dias FA, Gandara AC, Menna-Barreto RF, *et al.* (2011). Blood meal-derived heme decreases ROS levels in the midgut of *Aedes aegypti* and allows proliferation of intestinal microbiota. *PLoS Pathogens* **7**(3): e1001320.

Omosigho NN, Swaminathan K, Plomann M, Müller-Taubenberger A, Noegel AA, Riyahi TY The *Dictyostelium discoideum* RACK1 orthologue has roles in growth and development, Universitäts-und Stadtbibliothek Köln, 2014.

Parent A, Laroche G, Hamelin É, Parent JL (2008). RACK1 Regulates the Cell Surface Expression of the G Protein-Coupled Receptor for Thromboxane A₂. *Traffic* **9**(3): 394-407.

Park J, Kim Y (2014a). PROSTAGLANDIN MEDIATES DOWN-REGULATION OF PHENOLOXIDASE ACTIVATION OF *Spodoptera exigua* VIA PLASMATOCYTE-SPREADING PEPTIDE-BINDING PROTEIN. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **85**(4): 234-247.

Park J, Lee S, Kang SW (2014b). 2-cys peroxiredoxins: emerging hubs determining redox dependency of Mammalian signaling networks. *International Journal of Cell Biology* **2014**: 715867.

Rachfall N, Schmitt K, Bandau S, Smolinski N, Ehrenreich A, Valerius O, *et al.* (2013). RACK1/Asc1p, a ribosomal node in cellular signaling. *Molecular & Cellular Proteomics* **12**(1): 87-105.

Radyuk SN, Michalak K, Klichko VI, Benes J, Orr WC (2010). Peroxiredoxin 5 modulates immune response in Drosophila. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* **1800**(11): 1153-1163.

Rani V, Mishra S, Yadav T, Yadav UCS, Kohli S (2015). Hydrogen Peroxide Sensing and Signaling. In: (ed)[^](eds). *Free Radicals in Human Health and Disease*, edn: Springer. p[^]pp 105-116.

Ratman D, Berghe WV, Dejager L, Libert C, Tavernier J, Beck IM, *et al.* (2013). How glucocorticoid receptors modulate the activity of other transcription factors: a scope beyond tethering. *Molecular and Cellular Endocrinology* **380**(1): 41-54.

Reader J, Holt D, Fulton A (2011). Prostaglandin E2 EP receptors as therapeutic targets in breast cancer. *Cancer Metastasis Reviews* **30**(3-4): 449-463.

Ruan Y, Sun L, Hao Y, Wang L, Xu J, Zhang W, *et al.* (2012). Ribosomal RACK1 promotes chemoresistance and growth in human hepatocellular carcinoma. *The Journal of Clinical Investigation* **122**(7): 2554.

Ruiz Carrillo D, Chandrasekaran R, Nilsson M, Cornvik T, Liew CW, Tan SM, *et al.* (2012). Structure of human Rack1 protein at a resolution of 2.45 Å. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications* **68**(8): 867-872.

Saelee N, Tonganunt-Srithaworn M, Wanna W, Phongdara A (2011). Receptor for Activated C Kinase-1 protein from *Penaeus monodon* (Pm-RACK1) participates in the shrimp antioxidant response. *International Journal of Biological Macromolecules* **49**(1): 32-36.

Santoro MG, Amici C, Rossi A (2010). Role of heat shock proteins in viral infection. In: (ed)^(eds). *Prokaryotic and Eukaryotic Heat Shock Proteins in Infectious Disease*, edn: Springer. p^pp 51-84.

Satyavathi VV, Minz A, Nagaraju J (2014). Nodulation: an unexplored cellular defense mechanism in insects. *Cellular Signalling* **26**(8): 1753-1763.

Scott TW, Takken W (2012). Feeding strategies of anthropophilic mosquitoes result in increased risk of pathogen transmission. *Trends in Parasitology* **28**(3): 114-121.

Sengupta J, Nilsson J, Gursky R, Spahn CM, Nissen P, Frank J (2004). Identification of the versatile scaffold protein RACK1 on the eukaryotic ribosome by cryo-EM. *Nature Structural & Molecular Biology* **11**(10): 957-962.

Shah NG, Tulapurkar ME, Singh IS, Shelhamer JH, Cowan MJ, Hasday JD (2010). Prostaglandin E2 potentiates heat shock-induced heat shock protein 72 expression in A549 cells. *Prostaglandins & other Lipid Mediators* **93**(1): 1-7.

Sharifi MN, Mowers EE, Drake LE, Macleod KF (2015). Measuring Autophagy in Stressed Cells. *Stress Responses: Methods and Protocols*: 129-150.

Sharma G, Pallesen J, Das S, Grassucci R, Langlois R, Hampton CM, *et al.* (2013). Affinity grid-based cryo-EM of PKC binding to RACK1 on the ribosome. *Journal of Structural Biology* **181**(2): 190-194.

Shi S, Chen W, Sun W (2011). Comparative proteomic analysis of the Arabidopsis cbl1 mutant in response to salt stress. *Proteomics* **11**(24): 4712-4725.

Srikanth K, Park J, Stanley DW, Kim Y (2011). Plasmacyte-spreading peptide influences hemocyte behavior via eicosanoids. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **78**(3): 145-160.

Stanley D, Kim Y (2011). Prostaglandins and their receptors in insect biology. *Frontiers in Endocrinology* **2**: 105.

Stanley DW, Goodman C, An S, McIntosh A, Song Q (2008). Prostaglandins A1 and E1 influence gene expression in an established insect cell line (BCIRL-HzAM1 cells). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **38**(3): 275-284.

Stirnemann CU, Petsalaki E, Russell RB, Müller CW (2010). WD40 proteins propel cellular networks. *Trends in Biochemical Sciences* **35**(10): 565-574.

Strand MR (2008). The insect cellular immune response. *Insect Science* **15**(1): 1-14.

Taylor RP, Parker GJ, Hazel MW, Soesanto Y, Fuller W, Yazzie MJ, *et al.* (2008). Glucose deprivation stimulates O-GlcNAc modification of proteins through up-regulation of O-linked N-acetylglucosaminyltransferase. *Journal of Biological Chemistry* **283**(10): 6050-6057.

Togo S, Chen H, Takahashi T, Kubota T, Matsuo K, Morioka D, *et al.* (2008). Prostaglandin E1 improves survival rate after 95% hepatectomy in rats. *The Journal of Surgical Research* **146**(1): 66-72.

Trautwein MD, Wiegmann BM, Beutel R, Kjer KM, Yeates DK (2012). Advances in insect phylogeny at the dawn of the postgenomic era. *Annual Review of Entomology* **57**: 449-468.

Truman JW, Riddiford LM (2007). The morphostatic actions of juvenile hormone. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **37**(8): 761-770.

Tunaz H (2006). Eicosanoid biosynthesis inhibitors influence mortality of *Pieris brassicae* larvae co-injected with fungal conidia. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **63**(3): 93-100.

Ullah H, Scappini EL, Moon AF, Williams LV, Armstrong DL, Pedersen LC (2008). Structure of a signal transduction regulator, RACK1, from *Arabidopsis thaliana*. *Protein Science* **17**(10): 1771-1780.

Urano D, Czarnecki O, Wang X, Jones A, Chen J-G (2014). Arabidopsis RACK1 Phosphorylation by WNK8 Kinase. *Plant Physiology*: pp. 114.247460.

Wang S, Beerntsen B (2015). Functional implications of the peptidoglycan recognition proteins in the immunity of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Molecular Biology*.

Wang S, Chen J-z, Zhang Z, Huang Q, Gu S, Ying K, *et al.* (2002). Cloning, Characterization, and Expression of Calcyphosine 2, a Novel Human Gene Encoding an EF-Hand Ca²⁺-Binding Protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **291**(2): 414-420.

Wang T, Ming Z, Xiaochun W, Hong W (2011). Rab7: role of its protein interaction cascades in endo-lysosomal traffic. *Cellular Signalling* **23**(3): 516-521.

Wang Y, Zhang J, Xu W, Huang FS (2013). Ability of TEP1 in intestinal flora to modulate natural resistance of *Anopheles dirus*. *Experimental Parasitology* **134**(4): 460-465.

Wu Y, Wang Y, Sun Y, Zhang L, Wang D, Ren F, *et al.* (2010). RACK1 promotes Bax oligomerization and dissociates the interaction of Bax and Bcl-XL. *Cellular Signalling* **22**(10): 1495-1501.

Yang B, Pu F, Qin J, You W, Ke C (2014). Characterization of receptor of activated C kinase 1 (RACK1) and functional analysis during larval metamorphosis of the oyster *Crassostrea angulata*. *Gene* **537**(2): 294-301.

Yatime L, Hein KL, Nilsson J, Nissen P (2011). Structure of the RACK1 dimer from *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Molecular Biology* **411**(2): 486-498.

Zachara NE, O'Donnell N, Cheung WD, Mercer JJ, Marth JD, Hart GW (2004). Dynamic O-GlcNAc modification of nucleocytoplasmic proteins in response to stress A survival response of mammalian cells. *Journal of Biological Chemistry* **279**(29): 30133-30142.

Zhang X-F, Zhu Y, Liang W-B, Zhang J-J (2014). Transcription factor Ets-1 inhibits glucose-stimulated insulin secretion of pancreatic β -cells partly through up-regulation of COX-2 gene expression. *Endocrine* **46**(3): 470-476.

Zhao L, Jones W (2012). Expression of heat shock protein genes in insect stress responses. *Invertebrate Surviv. J* **9**: 93-101.

Zhuang ZH, Sun L, Kong L, Hu JH, Yu MC, Reinach P, *et al.* (2006). *Drosophila* TAB2 is required for the immune activation of JNK and NF-kappaB. *Cellular Signalling* **18**(7): 964-970.

Zirin J, Nieuwenhuis J, Samsonova A, Tao R, Perrimon N, Baehrecke E (2015). Regulators of Autophagosome Formation in *Drosophila* Muscles. *PLoS Genet* **11**(2): e1005006.