



**Centro de Investigación y de Estudios  
Avanzados del Instituto Politécnico Nacional**

Unidad Zacatenco

Departamento de  
Infectómica y Patogénesis Molecular

**Caracterización de la respuesta inmune de las células  
pericárdicas del mosquito *Anopheles albimanus***

**Tesis**

Que presenta

**M. en C. Victor Manuel Jonathan Cardoso Jaime**

Para obtener el grado de  
**Doctor en Ciencias**

En la especialidad de  
**Infectómica y Patogénesis Molecular**

Directores de tesis

**Dr. Víctor Katsutoshi Tsutsumi Fujiyoshi**  
**Dr. Salvador Hernández Martínez**

Ciudad de México

Diciembre, 2020

Este trabajo fue desarrollado bajo la **codirección** y en los laboratorios de investigación del **Dr. Salvador Hernández Martínez**, en el Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas del Instituto Nacional de Salud Pública (**CISEI-INSP**), y del **Dr. Víctor K. Tsutsumi Fujiyoshi** del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular (**DIPM**) del **CINVESTAV-IPN**. El proyecto fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACyT**), mediante los fondos de los proyectos 258239 y A1-S-27705; y la beca 298398.

El trabajo contó con la asesoría del **Dr. Humberto Lanz Mendoza** del CISEI-INSP; **Dr. Fidel de la Cruz Hernández Hernández**, **Dr. José Luis Rosales Encinas**, y **Dra. Bibiana Chávez Munguía**, todos ellos del DIPM del CINVESTAV-IPN; **Dr. José Efraín Garrido Guerrero** del Departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV-IPN.

## **Agradecimientos**

Este trabajo no hubiera sido posible sin el apoyo de las siguientes personas, quienes de alguna manera me han brindado su ayuda. Primero que nada quiero agradecer al **Dr. Salvador Hernández** y, por aceptarme desde la licenciatura en su laboratorio, ha sido un gran mentor y amigo, que siempre me ha entusiasmado a llegar cada vez más lejos. Al **Dr. Víctor Tsutsumi** por aceptarme en su laboratorio y apoyarme incondicionalmente en todo momento, gracias por enseñarme a aprender de todo. También quiero agradecer al **Dr. Humberto Lanz**, por abrirme las puertas de su laboratorio y siempre tratarme como uno más de sus estudiantes. Al **Dr. Fidel Hernández**, gracias por permitirme trabajar en su laboratorio y asesorar este trabajo. Gracias a asesores, el **Dr. José Luis Rosales**, la **Dra. Bibiana Chávez**, y el **Dr. Efraín Garrido** por criticar y aportar ideas a mi trabajo.

Quiero agradecer a todos mis compañeros del laboratorio 2 del **Dr. Tsutsumi**. A **Karla Gil** y **Silvia Galindo**, muchas gracias por su ayuda, pero también por su amistad. A **Karlita**, **Suilma**, **Dany**, y **Luz**, por su amistad y momentos de risas. Siempre llevare muy buenos recuerdos de ustedes.

Gracias a los Integrantes del laboratorio del **Dr. Fidel**. A **Antonio Celestino** (Tino), por enseñarme la técnica de RNA FISH. A **Lety Cortez** gracias por su apoyo técnico y platicas interesantes. A **Ángel Rubio** por su amistad, y al **Sr. Juan** y a **Juan Manuel** gracias por siempre recibirme bien su laboratorio. A la **Dra. Febe** por siempre entusiasmarme a pesar de la adversidad. También quiero agradecer el apoyo técnico de **Carlos Vázquez**, que aunque no pertenece a este laboratorio, pero lo conocí ahí.

Adicionalmente quiero agradecer al **Dr. Fanis Missirlis**, quien recientemente conocí pero cuya colaboración ha sido muy fructífera, y he aprendido mucho de él.

Muchas gracias a la **Dra. Lorena Gutiérrez**, nunca he conocido a una persona que se preocupe tanto por los estudiantes como ella. A las secretarias, **Marcela Guzmán**, **Martha Dueñas**, **Jessica Márquez** y **Clara Castelan**, muchas gracias por su apoyo administrativo. Y Un agradecimiento especial a **Martha Aguilar** porque siempre ha estado al pendiente de todos mis trámites.

A mis compañeros del INSP, **Renaud Conde, Guillermo Perales, Alex Alvarado, Ángel Tello y Gerardo Hurtado**, quienes cuando lo necesité me apoyaron, y con quien pasé momentos gratos. A **Toño**, por sus asistencia en la esterilización del material. Y un agradecimiento especial a **Dolores (Lolita)**, por su apoyo en las compras y por su amistad; y a **Luz Deane**, por su apoyo en el insectario y su amistad. También quiero agradecer, al **Dr. Víctor Bermúdez, Dr. Alfredo Lagunas, y Ms. Margarita Bahena**, por el préstamo de equipos de su laboratorio. Gracias a mis compañeros del laboratorio 4, que apoyaron en el insectario y con quienes alguna vez pase buenos momentos, **Zita Becerra, Laura Salgado, Karen Gutiérrez, Andrea Mendoza, Grecia Díaz, Daniel Luna**. Al personal del bioterio, **Julio Zaragoza, Fabián Téllez, Ismael Reyes, Felipe Reyes, Irma Espinoza, y Gudelia Jiménez**.

Quiero agradecer a mis compañeros y amigos quienes conocí en la maestría. **Raúl Cadena, Alberto Gómez, Víctor Rosales**; Gracias por su amistad y apoyo. Y quiero agradecer especialmente a **Alicia Reveles (Alice)**, por su amistad y por enseñarme a trabajar el laboratorio, sin duda la mejor maestra que conozco.

A mis amigos de toda la vida **Miguel y Yara, Jessica, Yuliana, y Víctor**, por estar en las buenas y en la malas conmigo. A **Liz y Juan**, muchas gracias por su amistad y porque siempre nos abrieron las puertas de su casa. A **Wendy y Enrique**, porque son un ejemplo de vida, por su apoyo incondicional y por los buenos momentos que hemos pasado juntos. Muchas gracias a **Paulina y Ferrán** (Ferrán quien a pesar de su corta edad, es la persona más brillante en biología que conozco), agradezco todo su apoyo y muy buenos momento.

Tuve la fortuna de pertenecer a dos grandes instituciones, el **CINVESTAV** y el **INSP**. Gracias a estas dos instituciones, sin duda fue una experiencia maravillosa y muy fructífera trabajar en ambos lugares.

## **Dedicatoria**

Esta es la parte más fácil y al mismo tiempo la más difícil. Fácil porque son las personas que siempre han estado para mí y siempre las tengo presentes. Difícil, porque algunos ya no están.

A mi esposa **Krystal**, porque has sido mi amiga, colega, y mi apoyo indispensable durante toda mi carrera y mi vida, siempre juntos.

A mis padres **Vicky** y **Víctor**, no encuentro palabras, solo puedo decir gracias por todo. A mis hermanos **Vidal** y **Venus**, quienes han sido mis cómplices y un apoyo incondicional.

A mi tía **Emma**, donde quiera que estés gracias por todo, siempre estarás en mi corazón, eres mi segunda madre. A **Luz**, que más que mi prima eres mi hermana, gracias por tanto. A mi tío **Waldo**, quien siempre ha cuidado de mí, y también es como un padre. Y a mi tía **María**, que por exagerado que sea, también has sido como una madre para mí.

A mis abuelos **Claudia** y **Pulciano**, siempre los llevaré en mi corazón, gracias por su cariño y apoyo, me faltó tiempo para aprender más de ustedes.

Y toda mi familia quienes siempre me han recibido en su casa, dándome afecto, su tiempo, su apoyo. A **Mine** y **Daniel**, a **Claudia**, **Carmina** y Socorro (chucha) a mis tíos **Juan** y **Enriqueta**. A mis primos y sobrinos, **Daniel**, **Omar**, **Ari**, **Juan**. Juntos hacemos y siempre salimos adelante, gracias por todo.

Y por último pero no menos importante, a mi nueva familia, mis suegros **Antonia** y **Gumecindo**, gracias por aceptarme en su familia y apoyar nuestros sueños.

## Resumen

A pesar de la eficiencia en la transmisión de enfermedades, los mosquitos poseen un sistema inmune capaz de contener las infecciones y en muchos casos eliminarla. Recientemente, el corazón de los mosquitos ha sido reconocido como un órgano importante en la respuesta inmunitaria, ya que por su función se convierte en un sitio de paso obligatorio de hemocitos y microorganismos que viajan a través del flujo de hemolinfa, lo que sugiere que el corazón es un órgano inmunoprivilegiado. En adición, en *An. gambiae* se ha observado una acumulación de microorganismos (incluyendo esporozoítos de *Plasmodium*) en las vecindades de las ostias (válvulas que regulan el flujo de hemolinfa en el corazón), los cuales son eliminados por fagocitosis. Algunos microorganismos como los esporozoítos de *Plasmodium* o levaduras no pueden ser fagocitados, sin embargo, ellos son eliminados posiblemente por factores humorales. Curiosamente, las ostias se encuentran flanqueadas por las células pericárdicas (CPs), también conocidas como nefrocitos por su excelente capacidad filtradora. No obstante, algunos reportes sugieren que las CPs podrían expresar genes relacionados a inmunidad. En adición, se ha demostrado que las CPs de *An. albimanus* presentan propiedades antimicrobianas, y un transcriptoma de corazones de mosquitos retados con zimosan indica la presencia de un gran número de genes de inmunidad, lo que sugiere que la CPs podrían participar en la respuesta inmune del mosquito. El presente trabajo, contiene evidencias que demuestran que las CPs expresan *lisozima c-1*, *cecropina 1*, y *attacina*. En adición, estos genes fueron sobre-expresados en las CPs después de un reto inmune, además fue observado un incremento en una proteína con características de lisozima, lo que indica fuertemente que las CPs podrían ser un tipo células inmunocompetente. En conclusión, estas evidencias sugieren un nuevo nivel de cooperación entre los sistemas circulatorio e inmunitario en donde las CPs podrían estar participando directamente en la eliminación de patógenos, mediante la expresión de factores humorales como péptidos antimicrobianos y lisozima.

## Summary

Despite the efficiency in the transmission of diseases, mosquitoes have an immune system capable of suppressing infections and in many cases eliminating them. Recently, the mosquito heart has been described as an important organ for the immune response, since, due to its function, it becomes an obligatory passage site for hemocytes and microorganisms that travel through the hemolymph flow, which suggests that the heart is an immuneprivileged organ. In addition, in *An. gambiae* a microorganism accumulation (including *Plasmodium* sporozoites) has been observed in the ostia vicinity (valves that regulate the hemolymph flow in the heart), which are eliminated by phagocytosing. Some microorganisms as *Plasmodium* sporozoites or yeast cannot be phagocytized, however, they are eliminated probably by humoral factors. Curiously, the ostias are flanked by pericardial cells (PCs), also known as nephrocytes due to their excellent filtered capacities. Nevertheless, some reports suggest that PCs could express immune-related genes. In addition, it has been reported that *An. albimanus* PCs present antimicrobial properties, also a transcriptome of mosquito hearts challenged with zymosan indicates the presence of a large number of immunity genes, which suggests that PCs could participate in mosquito immune response. The present work contains evidences that show PCs express *lysozyme c-1*, *cecropin 1*, and *attacin*. In addition, these genes were over-expressed in PCs after immune challenge, also an increment of a protein with lysozyme characteristics was observed, suggesting that PCs could be an immunocompetent cell type. In conclusion, these evidences suggest a new level of cooperation between circulatory and immune systems, where PCs could participate directly in pathogens elimination, through humoral factor expression as antimicrobial peptides and lysozyme.

# Índice

1. Introducción.....	1
1.1. Los insectos.....	1
1.2. Malaria.....	1
1.3. Biología del parásito.....	2
1.4. El vector.....	4
1.4.1. Ciclo de vida.....	5
1.5. El sistema inmunológico de los insectos.....	6
1.5.1. Respuesta Humoral.....	7
1.5.2. Respuesta inmune celular.....	10
1.6. El sistema circulatorio de los mosquitos.....	12
1.6.1. Estructura del vaso dorsal.....	14
1.6.2. Mecanismos del vaso dorsal para el transporte de hemolinfa.....	14
1.6.3. Sistema circulatorio, homeostasis y células pericárdicas.....	15
2. Antecedentes.....	16
3. Justificación.....	23
4. Hipótesis.....	24
5. Objetivo.....	25
6. Objetivos particulares.....	25
7. Estrategia Experimental.....	26
8. Metodología.....	27
8.1. Material Biológico.....	27
8.1.1. Mosquitos.....	27
8.1.2. Microorganismos.....	27
8.1.3. Reto inmune.....	28
8.1.4. Obtención del corazón.....	29
8.2. Extracción de RNA, Síntesis de cDNA, RT-PCR y qRT-PCR.....	29
8.2.1. Extracción de RNA.....	29
8.2.2. Síntesis de cDNA.....	30
8.2.3. PCR punto final.....	30
8.2.4. qRT-PCR (PCR Tiempo-Real).....	31

8.3. Detección de RNA por Hibridación In Situ Fluorescente (RNA-FISH) .....	31
8.3.1. Fijación de tejido.....	31
8.3.2. Deshidratación y permeabilización del tejido .....	31
8.3.3. Hibridación.....	32
8.4. Detección de RNA por RNA FISH STICs .....	32
8.4.1. Hibridación primaria .....	33
8.4.2. Hibridación secundaria.....	33
8.4.3. Hibridación terciaria.....	33
8.5. SDS-PAGE y Western blot.....	33
8.5.1. Obtención de la muestra.....	33
8.5.2. SDS-PAGE y electro transferencia .....	34
8.5.3. Incubación con anticuerpos y revelado .....	34
8.6. Ensayos de inmunofluorescencia.....	35
8.7. Marcaje de hemocitos con CM-Dil.....	36
8.8. Detección de actividad lítica.....	36
8.8.1. Obtención de microorganismos marcados con azul brillante de remazol.....	36
8.8.2. Obtención de las muestras para los zimogramas.....	37
8.8.3. Zimogramas.....	37
8.9. Análisis Bioinformáticos .....	37
8.10. Análisis estadístico .....	38
9. Resultados.....	39
9.1. Caracterización del perfil transcripcional del corazón de <i>An. albimanus</i> .....	39
9.2. Análisis de las secuencias de los genes de lisozima y cecropina de <i>An. albimanus</i> ..	43
9.2.1. Lisozimas tipo c de <i>An. albimanus</i> .....	43
9.2.2. Las cecropinas de <i>An. albimanus</i> .....	49
9.3. El corazón de <i>An. albimanus</i> responde ante un reto inmune .....	55
9.3.1. Una proteína de 14kDa (peso esperado de albLys c-1) con actividad lítica incrementa su abundancia en extractos de corazones de mosquitos retados con <i>M.</i> <i>luteus</i> .....	60
9.4. Las CPs son responsables de la expresión de genes relacionados a inmunidad en el corazón de <i>An. albimanus</i> .....	63

9.4.1 Las CPs expresan <i>albLys c-1</i> .....	63
9.4.2. Las CPs expresan <i>Cec1</i> .....	68
9.5. Las CPs expresan un gen rico en cisteínas con dominio del Factor de Von Willebran tipo C.....	76
10. Discusión .....	91
11. Conclusiones.....	103
12. Perspectivas .....	105
13. Apéndices .....	106
13.1. PBS (1X).....	106
13.2. Acrilamida lineal .....	106
13.3. Secuencias de los oligonucleótidos usados para los ensayos de PCR (Punto final y qRT-PCR).....	107
13.4. Load buffer 6X (Dual color).....	107
13.5. Buffer TAE .....	108
13.6. Secuencias de las sondas usadas para el RNA-FISH de <i>albLys c-1</i> .....	108
13.7. Soluciones para RNA FISH.....	109
13.7.1. Buffer de fijación .....	109
13.7.2. PBST .....	109
13.7.3. Buffer de lavado .....	109
13.7.4. Buffer de hibridación .....	109
13.8. Secuencias de las sondas para el RNA FISH-STICs de <i>Cec1</i> .....	110
13.9. Soluciones para SDS-PAGE y Western Blot.....	110
13.9.1. RIPA (Bolen RIPA modificado).....	110
13.9.2. Laemmli Load Buffer 4X.....	111
13.9.3. Gel de poliacrilamida al 13% .....	111
13.9.3.1. RGB 4X.....	111
13.9.3.2. SGB 4X .....	111
13.9.3.3. Solución de acrilamida:bis-acrilamida (29:1) .....	112
13.9.3.4. Gel separador (5 mL) .....	112
13.9.3.5. Gel empaquetador (2 mL) .....	112
13.9.4. Buffer Laemmli de corrida.....	113

13.9.5. Buffer de transferencia .....	113
13.10. Gel de Zimograma .....	113
13.10.1. Gel separador (5 mL) .....	113
13.11. Buffer de reacción de lisozima.....	114
13.12. IDs de las secuencias usadas para la construcción del árbol filogenético de las lisozimas.....	114
13.13. IDs de las secuencias usadas para la construcción del árbol filogenético y el alineamiento de las cecropinas .....	115
13.14. IDs de VectorBase de las secuencias de los genes ortólogos del gen AALB006666 usadas para el alineamiento de las secuencias .....	116
13.15. IDs de los genes de inmunidad encontrados en el transcriptoma de los corazones de mosquito.....	117
13.16. Genes homólogos de AALB006666 y sus funciones (Datos obtenidos del análisis en I-TASSER).....	118
14. Bibliografía.....	119

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Ciclo de vida de <i>Plasmodium</i> .....	4
<b>Figura 2.</b> Componentes estructurales del sistema circulatorio de los mosquitos .....	13
<b>Figura 3.</b> Micrografías electrónicas de CPs interactuando con diferentes patógenos .....	20
<b>Figura 4.</b> Disección del mosquito.....	28
<b>Figura 5.</b> Heatmap de genes relacionados a inmunidad identificados en el transcriptoma del corazón de <i>An. albimanus</i> después de un reto inmune con zimosan.....	40
<b>Figura 6.</b> El corazón de <i>An. albimanus</i> expresa genes que participan en inmunidad.....	42
<b>Figura 7.</b> Organización genómica de las lisozimas tipo c en <i>An. albimanus</i> .....	44
<b>Figura 8.</b> Análisis filogenético de las lisozimas de <i>An. albimanus</i> .....	45
<b>Figura 9.</b> Análisis de los dominios de las lisozimas de <i>An. albimanus</i> .....	47
<b>Figura 10.</b> Análisis de la secuencia de AALB004517.....	48

<b>Figura 11.</b> El gen con ID <sub>VB</sub> AALB006949 codifica la cecropina 3 de <i>An. albimanus</i> .....	51
<b>Figura 12.</b> Organización genómica de tres cecropinas de <i>An. albimanus</i> .....	52
<b>Figura 13.</b> Análisis filogenético de las cecropinas de <i>An. albimanus</i> .....	53
<b>Figura 14.</b> Análisis de la secuencia de <i>Cec1</i> de <i>An. albimanus</i> .....	54
<b>Figura 15.</b> El corazón de <i>An. albimanus</i> sobre-expresa <i>albLys c-1</i> y <i>Cec1</i> después de un reto inmune .....	56
<b>Figura 16.</b> Los hemocitos se acumulan en el corazón de <i>An. albimanus</i> después de un reto inmune .....	57
<b>Figura 17.</b> Los corazones aislados contienen pocos hemocitos .....	59
<b>Figura 18.</b> La actividad de lisozima incrementa en el corazón de los mosquitos después de un reto inmune con <i>M. luteus</i> .....	61
<b>Figura 19.</b> La actividad de muramidasa de <i>albLys c-1</i> es específica contra <i>M. luteus</i> .....	62
<b>Figura 20.</b> Inmunoreactividad de un anticuerpo anti-lisozima de clara de huevo de gallina en abdómenes de mosquito.....	64
<b>Figura 21.</b> El anticuerpo anti-lisozima de clara de huevo de gallina reconoce una proteína de 90kDa de <i>An. albimanus</i> .....	65
<b>Figura 22.</b> Localización <i>in situ</i> del mRNA de <i>albLys c-1</i> en el corazón de <i>An. albimanus</i>	67
<b>Figura 23.</b> Esquema de RNA FISH-STICs .....	69
<b>Figura 24.</b> Hibridación <i>in vitro</i> de las sondas para RNA FISH-STICs .....	71
<b>Figura 25.</b> Interacción <i>in vitro</i> de las sondas secundaria y sonda terciaria para RNA FISH-STICs .....	72
<b>Figura 26.</b> Detección de mRNA de <i>Cec1</i> por RNA FISH-STICs .....	73
<b>Figura 27.</b> Las CPs de <i>An. albimanus</i> expresan <i>Cec1</i> .....	74
<b>Figura 28.</b> Las CPs sobre-expresan <i>Cec1</i> después de un reto inmune .....	75
<b>Figura 29.</b> Alineamiento de la secuencia de los ortólogos de la proteína del gen con ID <sub>VB</sub> AALB006666 .....	77

<b>Figura 30.</b> Análisis <i>in silico</i> de la secuencia de la proteína del gen ID <sub>VB</sub> AALB006666 ...	79
<b>Figura 31.</b> Estructura terciaria de la proteína AALB006666 .....	80
<b>Figura 32.</b> Inmunoreactividad de un suero de conejo inmunizado contra un péptido con la secuencia de la región del carboxilo terminal de la proteína AALB006666.....	81
<b>Figura 33.</b> El gen con ID <sub>VB</sub> AALB006666 se expresa durante todo el ciclo de vida de <i>An. albimanus</i> .....	82
<b>Figura 34.</b> El gen AALB006666 se expresa fuertemente en CPs y hemocitos .....	85
<b>Figura 35.</b> Evaluación de la expresión del gen AALB006666 durante un reto inmune con zimosan.....	86
<b>Figura 36.</b> La proteína AALB006666 se encuentra en altas concentraciones en la hemolinfa .....	87
<b>Figura 37.</b> La proteína AALB006666 es acumulada en las CPs después de un reto inmune con zimosan .....	88
<b>Figura 38.</b> Análisis de la expresión transcripcional del gen AALB006666 en mosquitos retados con diferentes microorganismos .....	89
<b>Figura 39.</b> Análisis de la expresión de la proteína AALB006666 en mosquitos retados con diferentes microorganismos.....	90
<b>Figura 40.</b> Modelo propuesto de la respuesta inmune mediada por la interacción entre los sistemas circulatorio e inmune .....	104

# **1. Introducción**

## **1.1. Los insectos**

Los artrópodos son el grupo más numeroso del reino animal, comprenden aproximadamente el 70% de las especies animales descritas, se estiman más de 1.8 millones de especies, de las cuales el 60% son insectos (1). Los insectos aparecieron aproximadamente hace poco más de 400 millones de años, según los registros fósiles (2); desde entonces se han diversificado y ocupando casi todos los nichos de la tierra con excepción del fondo del mar. Su éxito evolutivo se debe a su capacidad reproductiva y tiempo de vida, es decir, una descendencia numerosa y un tiempo de vida corto, lo que tiene como consecuencia: primero, una rápida adaptación a los cambios del medio ambiente; segundo, una rápida consecución de la incompatibilidad genética, esto diverge en poblaciones genéticamente aisladas, las cuales originan nuevas especies (3).

Las funciones ecológicas que los insectos desempeñan en un ecosistema comprenden desde la descomposición de materia orgánica, hasta como alimento para otras especies de animales. Se pueden encontrar insectos herbívoros, saprófagos, predadores, parásitos, polinizadores etc. Los cuales tienen un impacto ecológico y económico en las actividades humanas (4). Tan solo el 35% de la producción mundial de cultivos, depende de insectos polinizadores (5). Por otro lado, los insectos también son parte de la dieta humana. Sin embargo, los efectos de los insectos en las actividades humanas no siempre son positivos, debido a la actividad hematófaga de algunos insectos, estos son capaces de transmitir enfermedades como la malaria, fiebre dengue, tripanosomiasis africana, enfermedad de Chagas, leishmaniasis, filarías linfática, etc. (6). Estas enfermedades constituyen el 17% de todas las enfermedades infecciosas; y cada año se registran aproximadamente 1000 millones de casos y más de un millón de muertes, de las cuales cerca de la mitad son provocadas por la malaria, siendo esta la enfermedad transmitida por vector más importante (7).

## **1.2. Malaria**

La malaria es una enfermedad causada por protozoarios parásitos del género *Plasmodium*, y es transmitida por mosquitos del género *Anopheles*. Se estima, que en 2015 el número de casos de malaria fue de 214 millones, de los cuales 438 mil tuvieron un desenlace fatal, y de

estos aproximadamente 306 mil fueron niños menores de 5 años (8). Existen 97 países endémicos, y cerca de 3,400 millones de personas viven en zonas de riesgo (9).

Existen más de 170 especies de *Plasmodium* capaces de infectar aves, reptiles y mamíferos. Hasta hace poco se conocían 4 especies capaces de infectar a humanos: *P. malariae*, *P. ovale*, *P. vivax*, *P. falciparum* (10), sin embargo, se ha reportado un incremento de casos de infección por *P. knowlesi* en humanos; especie que típicamente infecta a los macacos de cola larga y de cola de cerdo. Por lo que *P. knowlesi* ya es considerada la quinta especie de *Plasmodium* causante de malaria en humanos (11).

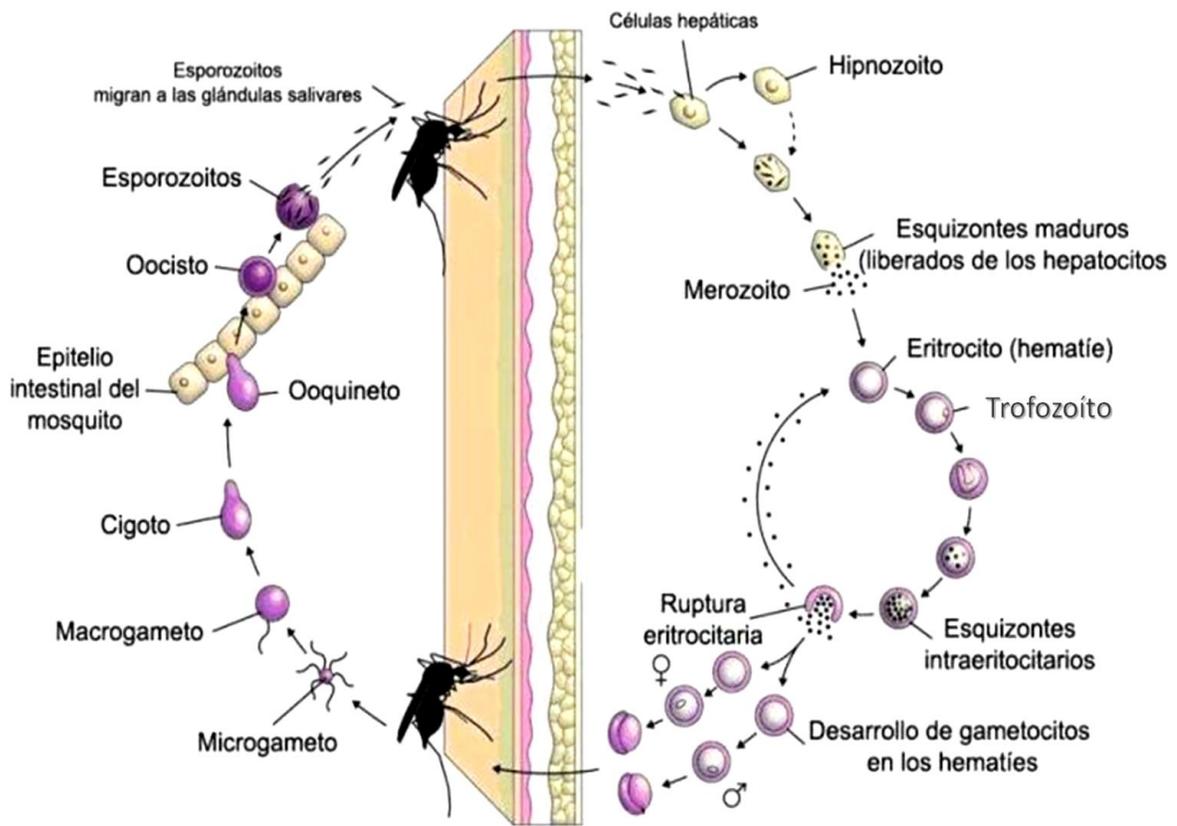
### **1.3. Biología del parásito**

Los parásitos protistas del género *Plasmodium*, pertenecen al filo Apicomplexa. En general los parásitos pertenecientes a este filo, tienen un ciclo de vida complejo, pudiendo parasitar a varios hospederos para desarrollar sus diferentes estadios y etapas de reproducción: sexual y asexual (12). *Plasmodium*, habita dos hospederos, uno vertebrado (mamífero, ave, reptil) y un invertebrado (mosquito). Las especies de *Plasmodium* que causan malaria en humano, son transmitidas únicamente por mosquitos hembras del género *Anopheles*, ya que solo estas requieren la ingesta de sangre, la cual es necesaria para el desarrollo de la progenie (13).

*Plasmodium falciparum* es la especie más estudiada de estos parásitos. La fase asexual se lleva a cabo en el humano, comienza con la picadura de un mosquito infectado que lleva en la saliva, parásitos en la fase de esporozoíto. Durante la picadura, aproximadamente de 10 a 100 esporozoítos son inyectados en la piel del humano, en la cual pueden permanecer desde horas hasta días (14). Posteriormente, alcanzan los vasos capilares del sistema linfático, entran a la sangre y son transportados hasta el hígado, en donde infectan hepatocitos, y en ellos maduran para generar un esquizonte (13). El esquizonte contiene en su interior merozoítos, una etapa del parásito que puede durar hasta un par de semanas, tiempo en el cual el parásito incrementa su número hasta 40,000 veces (14). Aunado a lo anterior, se sabe que *P. vivax*, *P. ovale* y posiblemente *P. knowlesi*, presentan una etapa adicional en su ciclo de vida llamada hipnozoíto, en la cual el parásito puede permanecer dentro de los hepatocitos durante mucho tiempo, incluso años; generando un estado de latencia y recaída de la enfermedad (15). Seguido de la ruptura del esquizonte, los parásitos son liberados en

vesículas llamadas merozomas, las cuales liberan lentamente a los merozoítos entre 48-72 horas. Los merozoítos liberados al torrente sanguíneo comienzan ciclos de invasión a eritrocitos, que duran aproximadamente 48 horas. En cada ciclo los merozoítos se replican, lisan a los eritrocitos y liberan más merozoítos, repitiendo el ciclo de reproducción asexual o eritrocítico (13,14). No todos los merozoítos se replican, algunos migran a médula ósea y ahí diferencian a gametocitos hembras y machos, que son la forma sexual del parásito. Esta forma del parásito ocurre en 5 etapas; durante la primera etapa y hasta la cuarta los gametocitos permanecen en médula ósea y bazo, mientras que durante la quinta etapa se encuentra en sangre periférica, en donde puede ser ingerido por el mosquito (13) **(Figura 1)**.

En el mosquito ocurre la fase sexual del parásito. Cuando el mosquito se alimenta de un humano infectado, absorbe gametocitos del parásito, los cuales necesariamente deben tener 2 días en circulación en sangre periférica (13), 15 minutos después de la ingesta de sangre, los gametocitos son liberados de los eritrocitos dentro del intestino del mosquito. Los gametocitos masculinos sufren un cambio denominado exflagelación, formando así a un microgameto, el cual comienza la búsqueda de gameto femenino para comenzar la fecundación. Cientos de gametocitos son ingeridos durante la alimentación del mosquito, sin embargo, de 50 a 100 desarrollan oocinetos (16). Los gametocitos que sobreviven inician la fecundación, para dar origen a un cigoto que posteriormente se hace móvil; esta nueva etapa es conocida como oocineto, de la cual más de la mitad muere por apoptosis (13). Los oocinetos migran hacia la matriz peritrófica del intestino y la penetran para invadir el epitelio intestinal hasta alcanzar la lámina basal de éste, en donde maduran en aproximadamente 24 horas para dar origen a un ooquiste (17). Los ooquistes inician varias divisiones nucleares, y simultáneamente incrementan su tamaño. Este cambio va acompañado de la transformación de una forma sólida del parásito a una vacuolar, conocida como esporoblasto (17). La maduración del ooquiste dura aproximadamente dos semanas, tiempo en el cual los esporozoítos terminan su formación y se separan del esporoblasto (13). Una vez terminado este proceso (esporogonia), el ooquiste libera a los esporozoítos en la hemolinfa en donde son transportados de manera pasiva por el flujo de la hemolinfa a las glándulas salivares. Una vez allí, los esporozoítos terminan su proceso de maduración y pueden ser liberados al torrente sanguíneo del humano durante la próxima alimentación sanguínea del mosquito (18) **(Figura 1)**.



**Figura 1. Ciclo de vida de *Plasmodium*.** *Plasmodium* tiene dos fases en su ciclo de vida, la asexual y la sexual. La primera ocurre en el huésped vertebrado, cuando el mosquito durante la alimentación sanguínea deposita esporozoitos del parásito en la piel del humano, y posteriormente migran por los vasos capilares hasta el hígado, en donde forma un esquizonte hepático. Después, el parásito entra en ciclos eritrocíticos que forman esquizontes, merozoitos, trofozoitos y gametocitos. Posteriormente un mosquito sano ingiere gametocitos, los cuales maduran y posteriormente fecundarán para formar un cigoto que se diferenciará a un oocineto capaz de invadir el epitelio intestinal, y ahí diferenciarse a un ooquiste, que dará origen a miles de esporozoitos. Estos últimos son la fase infecciosa del humano transmitida por el vector, por lo que inicia nuevamente el ciclo (19).

#### 1.4. El vector

Existen aproximadamente 3,500 especies de mosquitos agrupados en 41 géneros. Los vectores de malaria en humanos son únicamente mosquitos del género *Anopheles* que contiene más de 400 especies, pero solo alrededor de 40 son capaces de transmitir la enfermedad. Los anofelinos habitan en todo el mundo con excepción de la Antártida (20), en América Latina y el Caribe se han reportado 90 especies de anofelinos, de las cuales solo 9 son consideradas vectores de malaria (21). En México habitan 3 especies de mosquitos con

capacidad vectorial: *Anopheles albimanus*, *Anopheles pseudopunctipennis* y *Anopheles vestitipennis* (22). El mosquito *Anopheles albimanus* es considerado uno de los vectores más importante de malaria en México, Centro América y el Caribe; puede habitar regiones menores a 500 msnm, sin embargo, los cambios climáticos han provocado que el mosquito se desarrolle en otras regiones, aumentando el número de personas en riesgo de contraer malaria (21).

#### **1.4.1. Ciclo de vida**

Los mosquitos en general, incluyendo a los anofelinos, pasan por 4 etapas en su ciclo de vida: huevo, larva, pupa y adulto. Un adulto puede poner de 50 a 200 huevos en una puesta. Los huevos son colocados de manera individual directamente sobre el agua (en la que permanecen flotando) y emergen en 2-3 días (no soportan la desecación). Del huevo eclosiona una larva que pasa por 4 estadios larvales antes de llegar a la etapa de pupa. Tras cada estadio, la larva muda su exoesqueleto para dar lugar a su crecimiento. Las larvas presentan una cabeza, un tórax grande y un abdomen largo y segmentado; desarrollan cepillos bucales, con lo cuales se pueden alimentar de algas, bacterias y otros microorganismos. Después de terminar la fase larval comienza la fase de pupa, donde la cabeza y tórax se funden en un cefalotórax y el abdomen se dobla adoptando una forma de “coma” cuando se mira de perfil. Durante la etapa de pupa no se alimentan. Al igual que en la etapa de larva, las pupas deben salir a la superficie para respirar a través de sifones torácicos. Después de unos días, y una metamorfosis completa, la superficie dorsal del cefalotórax se abre (ecdysis) y emerge el mosquito adulto. Ahora el cuerpo se torna alargado con tres segmentos: cabeza, tórax y abdomen. La cabeza está especializada en la adquisición de información sensorial y en la alimentación, el tórax está especializado en la locomoción y el abdomen en la digestión del alimento y desarrollo de huevos. Durante esta etapa las hembras y machos se alimentan de néctares, sin embargo, las hembras necesitan ingerir sangre para obtener los nutrientes necesarios para el desarrollo de huevos (20).

## 1.5. El sistema inmunológico de los insectos

El sistema inmunitario de los insectos al igual que el de los vertebrados posee mecanismos celulares y humorales que actúan en contra de agentes extraños o no propios. En ambos, la respuesta inmunitaria comienza cuando el organismo reconoce algo no propio. Este reconocimiento en vertebrados es casi ilimitado debido a la generación de diversidad de los anticuerpos, los cuales son capaces de reconocer específicamente millones de estructuras (23). Sin embargo, los invertebrados poseen un mecanismo reconocimiento limitado mediado únicamente por receptores de reconocimiento de patrones (PRRs por sus siglas en inglés) que solo puede identificar estructuras conservadas entre patógenos, conocidas como Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPs por sus siglas en inglés). Algunos de las familias más comunes de estos PRRs en insectos son las lectinas tipo C, receptores con repetidos ricos en leucinas, receptores Toll, etc, los cuales pueden encontrarse en la membrana plasmática de las células o pueden ser secretados a la hemolinfa (24). Por otro lado, estos receptores pueden jugar diferentes funciones, tales como los son opsonizar microorganismos para su posterior fagocitosis (25), activación de la cascada de la fenoloxidasa mediada por Lectinas tipo C y TEP (26), o activación de vías de señalización que desencadenan la expresión de genes de péptidos antimicrobianos u otros genes efectores de la respuesta inmune (27). Una vez que se ha llevado a cabo el reconocimiento, la activación y regulación de la respuesta inmune esta mediada por tres principales vías de señalización, TOLL, IMD y JAK/STAT, las cuales modulan los mecanismos efectores de la inmunidad como fagocitosis, expresión de péptidos antimicrobianos y vías de RNA interferente, etc., (28) que en conjunto limitan o eliminan la infección por bacterias, hongos y virus en los insectos.

Los invertebrados, incluyendo a los insectos, carecen de una respuesta inmune adaptativa clásica mediada por anticuerpos, por lo que se han propuesto diversas hipótesis en un intento de argumentar la ausencia de este tipo de respuesta (29). No obstante se ha evidenciado la existencia de un tipo de memoria inmunitaria en invertebrados denominada priming inmunológico (30), el cual protege al insecto de una segunda infección con un mismo patógeno (31). No obstante, se ha demostrado que la especificidad de la protección es limitada (32,33) y los mecanismos moleculares que median esta memoria son aún

desconocidos (34,35). Por otro lado, la ausencia de una inmunidad adaptativa como la de los vertebrados, en invertebrados no es una limitante para su desarrollo y sobrevivencia, ya que su respuesta inmune innata es lo suficientemente eficiente, para protegerlos contra una amplia gama de patógenos (36). Dada la gran diversidad de invertebrados, ellos pueden habitar una amplia variedad de nichos, alimentarse de múltiples fuentes, presentar distinta longevidad, e inevitablemente exponerse a diferentes patógenos. Esta gran diversidad de características únicas para cada invertebrado, ha conferido a través de millones de años diferentes estrategias para la defensa contra patógenos, las cuales se ven reflejadas en las variaciones de sus sistema inmune (37).

### **1.5.1. Respuesta Humoral**

La respuesta inmune de los insectos, esta media por procesos celulares y humorales, los cuales son montados por diferentes tipos celulares. Las barreras epiteliales y el exoesqueleto son las primeras líneas de defensa contra patógenos, las cuales ayudan a prevenir infecciones sistémicas. En primer lugar, funcionan como barrera física, limitando la entrada de microorganismos al cuerpo. Por esta razón, las barreras epiteliales son altamente expuestas al contacto con microorganismos, por lo cual, no es difícil imaginar que expresen ciertos factores humorales que actúan durante posibles infecciones. La epidermis, el intestino, las tráqueas, etc., son algunos de los órganos un poco más estudiados, cuyos epitelios expresan péptidos antimicrobianos (constitutivos o inducibles), especies reactivas de oxígeno, y factores de regulación de la respuesta inmune. Esto sugiere que las barreras epiteliales disminuyen la probabilidad de infección mediante la prevención, y también pueden montar respuestas contra infecciones (38).

Las heridas son frecuentes en insectos, y debido a su sistema circulatorio abierto, la pérdida rápida de hemolinfa es un factor de riesgo muy alto para la vida del insecto. Sin embargo, los procesos de coagulación en todos los invertebrados, son muy rápidos y eficientes, en comparación con los de los vertebrados (39). Por otro lado, no solo se evita la pérdida de hemolinfa; la coagulación, también inmoviliza a los microorganismos en el área de la herida, por lo que, el riesgo de adquirir una infección sistémica es menor (40). En algunos artrópodos no insectos, se ha demostrado que distintos procesos de coagulación pueden ser inducidos bajo la presencia de LPS o  $\beta$ -1,3 glucano, sugiriendo la captura de microorganismos por la

coagulación no es un efecto secundario, es un mecanismo inducible de la respuesta inmune de artrópodos (39). Por otro lado, en larvas de *Drosophila melanogaster*, se ha demostrado que la coagulación atrapa a los microorganismos, pero por sí misma no los mata. En dicho reporte, se demuestra, que la maduración de la hemolinfa a un coagulo sólido, no se lleva a cabo sin la presencia de la profenoloxidasas (PPO), la cual también juega un papel en la eliminación de los microorganismos. Sin embargo, la ausencia de la PPO no restringe la eliminación de los microorganismos, por lo que se sugiere, que péptidos antimicrobianos, fagocitosis y otros efectores de respuesta inmune, pueden estar cooperando con la coagulación, en la eliminación de microorganismos (41).

El epitelio del tracto digestivo es la barrera epitelial más expuesta a los microorganismos, debido a que la microbiota intestinal está compuesta por varias especies de microorganismos, que juegan un papel fundamental en la digestión de alimentos y en la protección ante patógenos. Sin embargo, el insecto debe mantener la homeostasis de la microbiota, ya que un exceso de ella puede tener efectos negativos. Para mantener este equilibrio, los insectos se valen de la expresión de péptidos antimicrobianos, pero sobre todo de las especies reactivas de Oxígeno (ROS) (38).

El óxido nítrico (NO), está presente en vertebrados e invertebrados, y su participación en procesos fisiológicos es fundamental, debido a que funciona como una molécula de señalización, por lo que su papel en el sistema nervioso es esencial. Por otro lado, se ha observado que limita el desarrollo de parásitos como *Plasmodium*, tanto en el huésped vertebrado como en el invertebrado (42). La producción de NO, se encuentra regulada por la enzima óxido nítrico sintetasa, que se ha reportado, tiene una alta similitud entre especies de anofelinos, y otros insectos. Aunado a lo anterior, se ha demostrado en diferentes especies, que la expresión de NO sintetasa, puede ser inducida de manera específica ante retos con diferentes microorganismos, lo que sugiere la existencia de un sistema de reconocimiento que pueden activar este mecanismo de defensa (43). El anión superóxido ( $O_2^-$ ), es otra especie reactiva de oxígeno, que se ha descrito en la eliminación de parásitos de malaria en *An. albimanus* (44), y en *An. gambiae* (45). Sin embargo, un exceso en la producción de  $O_2^-$ , puede ser nocivo para el huésped, por lo que es importante mantener los niveles fisiológicos permisibles, para tener un efecto específico sobre el parásito (44). Aunado a lo anterior, se

ha sugerido que las células pericárdicas (CPs), están implicadas en la homeostasis de ROS, y se ha atribuido que la regulación de la concentración de estas, es crítica para la eliminación de parásitos en una cepa resistente de *An. gambiae* (45). El peróxido de hidrógeno H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se ha visto involucrado, no solo en la eliminación de patógenos, sino que junto con el NO pueden regular la expresión de péptidos antimicrobianos, en *An. albimanus*. Esta regulación puede ocurrir de manera local (intestino), o sistémica, sugiriendo que existe un mecanismo más allá de las vías de señalización típicas, involucradas en la regulación de la respuesta inmune (46).

Los péptidos antimicrobianos (AMPs, por sus siglas en inglés) son los principales efectores de la respuesta inmune humoral insectos. Su diversidad es tan amplia como la diversidad de especies de metazoarios. Dado que los insectos son el grupo más grande dentro del reino animal, y algunas de las familias de los AMPs son conservadas, sin embargo, existe una gran diversidad de ellos, según la especie de insecto de donde provengan (47). Son sintetizados por algunos epitelios, hemocitos, y principalmente por el cuerpo graso de los insectos (48). Este último, funcionalmente podría ser el análogo del hígado en mamíferos. La parte visceral posterior, está involucrada en la síntesis y secreción de proteínas y AMPs; la parte periférica torácica, está involucrada en el almacenamiento de glucógeno (49).

Los péptidos antimicrobianos en insectos se han clasificado en 5 familias: Cecropinas, attacinas, lisozimas, defensinas, y dipterocinas (50). En mosquitos se han identificado tres principales familias de AMPs: cecropinas, defensinas, gambicinas (48,51); por otro lado, en un análisis del genoma de *An. gambiae* se lograron identificar 8 genes, que codifican lisozimas tipo-c (52). Las **cecropinas**, son AMPs catiónicos, con tamaño aproximado de 31-39 residuos de aminoácidos. Las cuales son sintetizadas como proteínas de secreción, y maduran o se activan después del corte del péptido señal. Las cecropinas pueden actuar contra bacterias Gram negativas, Gram positivas, y hongos. Además, la actividad antimicrobiana de las cecropinas y sus derivados pueden actuar contra parásitos como *Plasmodium* y *Trypanosoma* (53). La **gambicina** parece ser un AMP exclusivo de mosquitos, es un péptido secretado, y su expresión ha sido reportada en la parte anterior del intestino y en el cuerpo graso. Su actividad antimicrobiana ha sido probada contra bacterias Gram negativas, Gram positivas y parásitos de *Plasmodium* (51). Las **defensinas** son AMPs catiónicos, con residuos

de cisteínas conservados, que forman 3 puentes disulfuro, las cuales han sido encontradas prácticamente en todos los organismos vivos. La actividad de las defensinas ha sido descrita principalmente contra bacterias Gram positivas y en menor grado contra Gram negativa (50,51). Las **attacinas**, son AMPs que contienen isoformas que pueden ser ácidas o básicas. Estas isoformas son altamente homologas, y son codificadas por diferentes genes. Estos péptidos tienen una alta afinidad contra bacterias Gram negativas. El efecto en este tipo de bacterias, está dado por el aumento en la permeabilidad de la membrana, y fortalecido por la inhibición en la síntesis de proteínas de esta (53). Las **lisozimas**, son más bien proteínas antimicrobianas, que se encuentran altamente conservadas en el reino animal. Las lisozimas han sido clasificadas en tres tipos: tipo-c, tipo-g, tipo-i. Las lisozimas hidrolizan las uniones beta 1,4 entre los residuos de ácido N-acetilmurámico y N-acetil-D-glucosamina de los péptidoglicanos de la pared celular de las bacterias, lo que provoca su lisis (50). Principalmente actúan contra bacterias Gram positivas, aunque también se ha reportado que, la lisozima c-1 de *An. gambiae*, tiene actividad contra *Plasmodium* (52).

### **1.5.2. Respuesta inmune celular**

La respuesta inmune humoral esta mediada por diferentes tipos celulares y principalmente por cuerpo graso y hemocitos, sin embargo, estos últimos son los únicos capaces de montar una respuesta inmune celular. Esta respuesta, comprende procesos como: la fagocitosis, encapsulación y nodulación (54). No obstante, no todos los hemocitos son capaces de montar todos los mecanismos de inmunidad celular; existen, diferentes poblaciones de hemocitos, que se clasifican según sus características morfológicas, citoquímicas, enzimáticas, y funcionales, así como también su localización espacial (25,54).

En los insectos, las poblaciones más comunes de hemocitos son: prohemocitos, granulocitos, plasmotocitos, esferulocitos y oenocitoides (54). En mosquitos, se han descrito tres subpoblaciones de hemocitos, las cuales varían según la especie (55–58). En *An. gambiae* y *Ae. aegypti*, fueron descritos prohemocitos, granulocitos, y oenocitoides, siendo los granulocitos los más abundantes (aproximadamente un 85% del total de las células circulantes) y cuya principal función es fagocitar. La población oenocitoide, contiene aproximadamente 5-10% del total de hemocitos, y su función está limitada a la producción constitutiva e inducible de componentes de la vía de la fenoloxidasa (PO). Los prohemocitos

son la población menos abundante en estas dos especies de mosquitos, y son consideradas como células troncales de hemocitos, capaces de diferenciarse a otras poblaciones de hemocitos (58). En *An. albimanus*, también se han descrito tres subpoblaciones distintas: prohemocitos, granulocitos y plasmacitos. Sin embargo, los granulocitos identificados en esta especie difieren de las características funcionales descritas en *An. gambiae* y *Ae. aegypti*, ya que en *An. albimanus*, es la única subpoblación con actividad de PO. Por otro lado, los plasmacitos, son la subpoblación más abundante con aproximadamente el 74% del total de los hemocitos; cuya función principal es la fagocitosis. Por último, los prohemocitos, que comprenden aproximadamente un 9% de la población total, y al igual que en todos los insectos se consideran como células troncales de hemocito (57).

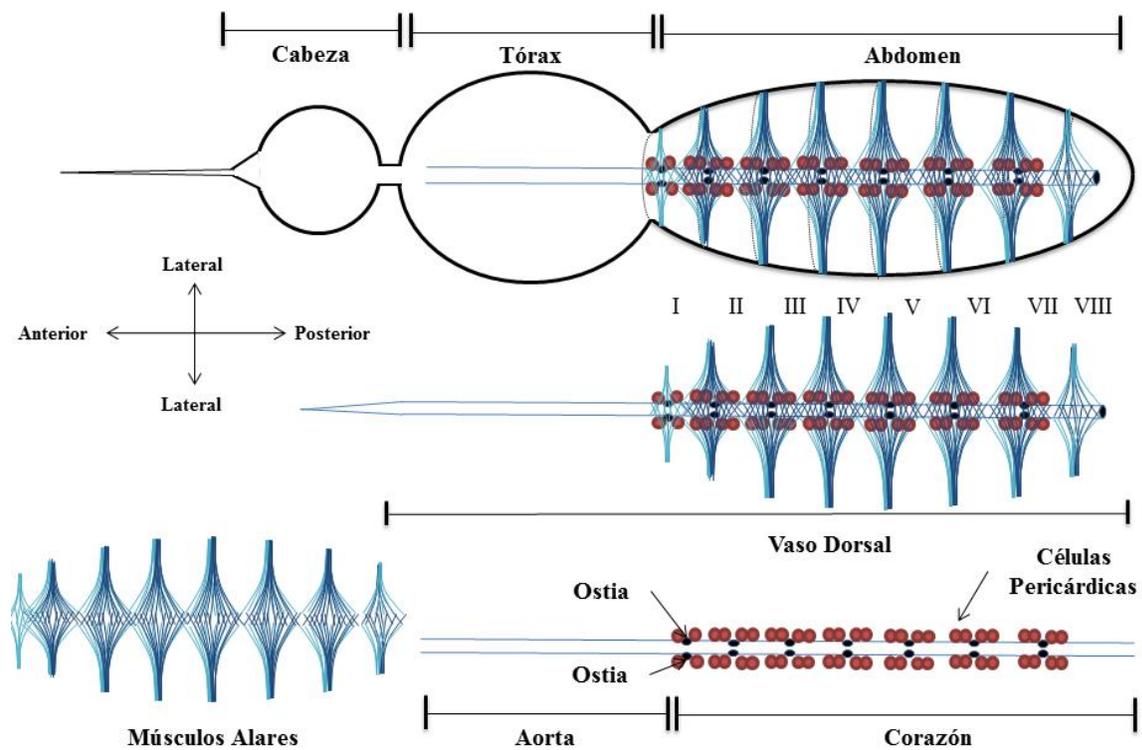
La fagocitosis, es un proceso altamente conservado en la naturaleza; consiste en el reconocimiento, internalización y destrucción intracelular de patógenos y células muertas por células especializadas en fagocitosis (59). En insectos, las células especializadas de dicho proceso son los hemocitos. La fagocitosis se activa cuando hay reconocimiento de una partícula extraña por los Receptores de Reconocimiento de Patógenos (PRRs), que pueden estar anclados a la membrana del hemocito, o solubles, estos últimos opsonizan a las partículas, facilitando su reconocimiento por el hemocito (60). En mosquitos, se han identificados diversos PRRs que promueven la fagocitosis, como las proteínas de la familia TEPs (TEP1, TEP3, TEP4) que opsonizan a los patógenos; proteínas con repetidos ricos en leucina (LRRs, LRM1); proteínas relacionadas a fibrogeninas (FG8), y las DSCAM, pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas que contienen más de 31,000 variantes. Por otro lado, también se ha descrito que la melanización puede funcionar como un procesos de opsonización (55). Tras el reconocimiento se activan cascadas de señalización que promueven la reorganización del citoesqueleto, tráfico vesicular intracelular y la formación del fagosoma (25,60). Tras la internalización de la partícula, el fagosoma se fusiona con lisosomas, que contienen enzimas digestivas que destruirán al patógeno (61). No todos los patógenos pueden ser fagocitados, en *An. aegypti* y en *An. albimanus*, se ha descrito que la fagocitosis está dirigida a bacterias Gram-, pero no a Gram+ (56,59). Por otro lado, cuando los patógenos son muy grandes, los hemocitos no pueden fagocitarlos y recurren a otros mecanismos como la encapsulación celular (61).

La melanización es un proceso mediado por el sistema de la profenoloxidasas, es uno de los mecanismos principales de la respuesta inmune humoral en artrópodos, y está relacionada fuertemente en la respuesta inmune de tipo celular (62). La melanización consta de 4 etapas: reconocimiento, reclutamiento de hemocitos, melanogénesis, y encapsulación (63). El reconocimiento es mediado por PRRs como proteínas de unión a  $\beta$ -1,3 Glucano ( $\beta$ GBP), lectinas tipo C, proteína de unión a péptidoglicano (PGBP) (25,61); las cuales se unen a productos microbianos o PAMPs como lipopolisacárido (LPS), péptidoglicanos, y  $\beta$ -1,3 glucanos (25,62). Tras el reconocimiento, los hemocitos son atraídos hacia el patógeno, lo rodean y comienzan a liberar en la superficie del mismo los componentes necesarios para la formación de melanina, lo que terminara en la formación de una capsula melanótica alrededor del patógeno (63). En algunos insectos, cuando los patógenos son muy grandes y la encapsulación melanótica por sí misma no es suficiente para detener al patógeno, se da lugar al reclutamiento de hemocitos y adhesión de ellos alrededor del patógeno, lo que conlleva a la formación de una cápsula celular (61). En esta cápsula, los hemocitos comienzan a liberar factores tóxicos, como quinonas o hidroquinonas productos secundarios del sistema de la PPO, ROS, y péptidos antimicrobianos; los cuales crean un ambiente hostil y terminan por matar el patógeno (54,61). Por otro lado, según la especie de insecto, la encapsulación celular puede, o no, utilizar el sistemas de la PPO (54), y puede involucrar una o varias poblaciones de hemocitos (25,55,56,60,61). Otro proceso celular es la nodulación, que consiste en un gran número de patógenos aglomerados, rodeados por agregados de hemocitos (61), este proceso al igual que la encapsulación puede utilizar, o no, el sistema de la PPO, y una o distintas poblaciones de hemocitos (54). Los mecanismos por los cuales algunos patógenos son melanizados, encapsulados o agregados en nódulos, son desconocidos, y hacen falta más investigaciones para esclarecer las determinantes de estos procesos celulares (54,61).

## **1.6. El sistema circulatorio de los mosquitos**

El sistema circulatorio de los insectos es altamente conservado entre especies. Es un sistema abierto, constituido básicamente por, un órgano pulsátil llamado vaso dorsal, músculos alares, órganos pulsátiles accesorios. El vaso dorsal es el órgano central del sistema circulatorio, presenta una autonomía miogénica, pero las contracciones pueden ser reguladas secundariamente de manera neuronal. Este órgano se encuentra localizado en la parte dorsal

del insecto, desde el abdomen hasta la cabeza; la parte del vaso que se encuentra en el tórax se llama aorta, que carece de actividad contráctil, su función es distribuir el flujo de la hemolinfa hacia los órganos accesorios pulsátiles que distribuyen la hemolinfa en la cabeza, alas, patas etc. El corazón es la porción del órgano posicionada en el abdomen, es contráctil, y en él se encuentran un par de válvulas de manera lateral llamadas ostias, las cuales permiten la entrada de hemolinfa en el vaso. Cada ostia, se encuentra asociada con unas estructuras fibrilares que en conjunto son llamadas músculos alares, las cuales son encargadas de la tensión de las ostias, para la entrada de hemolinfa. En la región periostial del corazón, se encuentran asociadas CPs, que se ha descrito juegan un papel importante en la desintoxicación de la hemolinfa (64,65).



**Figura 2. Componentes estructurales del sistema circulatorio de los mosquitos.** Como se muestra en la imagen, el sistema circulatorio está compuesto por un órgano principal llamado vaso dorsal. Lo componen diferentes estructuras: aorta (parte torácica lisa, no contráctil), el corazón (parte abdominal, contráctil). Este último contiene unas estructuras llamadas ostias que permiten la entrada de alto flujo hemolinfa, cada ostia se encuentra rodeada por 2 pares de CPs (nefrocitos), y por fibras musculares llamadas músculos alares.

### 1.6.1. Estructura del vaso dorsal

Los mosquitos conservan características generales del sistema circulatorio de insectos. En adultos de *An. quadrimaculatus*, (66) el vaso dorsal es considerado el órgano central del sistema circulatorio, y comprende dos secciones: la parte torácica no contráctil (aorta), y la parte abdominal contráctil (corazón), éste último con ocho pares de músculos alares asociados a las ostias y a 28 pares de CPs, a lo largo del corazón (66). Estudios recientes reportan algunas características similares en *An gambiae* (67). Sin embargo, en *An. gambiae* se observó la presencia de 6 pares de ostias localizadas del segmento 2 al 7 (por las que entra hemolinfa), y un par de ostias más en el segmento 1 (por las que el flujo de hemolinfa es mínimo) (67). Los músculos alares se encuentran presentes desde el segmento 2 al 7, flanquean a las ostias localizadas en estos segmentos, y un par de músculos alares incompleto se localiza entre la unión torácico-abdominal y otro entre el segmento 7 y 8. El vaso dorsal de adultos de *Ae. aegypti* comparte las mismas características que en las especies mencionadas (68), por lo que, se puede especular que el sistema circulatorio de los mosquitos es altamente conservado. En la **Figura 2** se muestran las partes que componen al vaso dorsal en mosquitos.

### 1.6.2. Mecanismos del vaso dorsal para el transporte de hemolinfa

En insectos, incluyendo mosquitos, el flujo de hemolinfa en el hemocele esta mediado por el corazón (65). El flujo puede ser unidireccional o bidireccional según el orden o la especie (64). En adultos de *An. gambiae* el flujo es bidireccional, es decir puede ir en dirección anterógrada (desde la parte posterior hasta la anterior), o en dirección retrograda (de la parte anterior a la posterior). Durante las contracciones el movimiento del corazón es peristáltico, este movimiento determina la dirección del flujo de la hemolinfa. Durante la contracción con el flujo en dirección anterógrada, la hemolinfa entra a través de las ostias y la parte abierta posterior del corazón, y el movimiento peristáltico va de la parte posterior a la anterior, transportando así la hemolinfa del abdomen al tórax y cabeza. Durante la contracción en dirección retrograda las ostias se cierran y la hemolinfa entra por la parte excurrente anterior del corazón y sale por la parte posterior (67). Las contracciones en esta dirección son menos frecuentes que en dirección anterógrada, por lo que, se crea un cambio diferencial de presión entre tórax y abdomen, esta presión es equilibrada por contracciones abdominales ventrales,

las cuales hacen fluir la hemolinfa en dirección retrograda de manera extra-cardiaca (69). En estadios pre-adultos de *An. gambiae*, las ostias no son capaces de introducir hemolinfa en el lumen del corazón, por lo que únicamente hay un flujo excurrente en la parte abierta posterior del corazón, esto es posiblemente debido a la inmadurez de los músculos alares, los cuales crean un estado de tensión que especulativamente mantienen abiertas las ostias (70). Esta inmadurez en los músculos alares también es observada en *An. quadrimaculatus* (66) y *Ae. aegypti* (68). Aunado a lo anterior, el flujo de la hemolinfa en el corazón en estados pre-adulto es únicamente anterógrada, y el flujo retrograda se lleva a cabo en el hemocele (70).

### **1.6.3. Sistema circulatorio, homeostasis y células pericárdicas**

La hemolinfa en todos los insectos sirve como medio para el intercambio de sustancias entre células. En ella se transportan nutrientes, desechos celulares, mensajeros químicos como hormonas, componentes celulares y humorales del sistema inmune, ventilación traqueal, etc. (65). Sin embargo, para el funcionamiento fisiológico correcto, es necesario un control de la presión del flujo de la hemolinfa, el cual es importante para mantener la temperatura corporal y una distribución uniforme del oxígeno; Por otro lado, también es necesario el control en la homeostasis de los componentes de la hemolinfa, para mantener la presión osmótica, desintoxicación, etc. El flujo de la hemolinfa, es dependiente de las contracciones del corazón, el cual presenta una autonomía miogénica (64), sin embargo, puede ser controlado de manera secundaria por neurotransmisores y neuropéptidos (71–74). Por otro lado, la homeostasis de los componentes de la hemolinfa esta mediada en gran medida por las CPs, también conocidas como nefrocitos por su capacidad de tomar sustancias de la hemolinfa (75–77).

Las CPs de los insectos, son relativamente grandes en comparación con otros tipos celulares, su tamaño es de 50-180µm, generalmente son binucleadas pero pueden tener múltiples núcleos (76). Están rodeadas por una membrana basal, el citoplasma tiene una alta densidad de vacuolas, el retículo endoplásmico y aparato de Golgi son muy grandes, además presentan unos sistemas de membranas y tubos laberínticos (78). Se ha sugerido que en estos canales laberínticos entra hemolinfa y es filtrada por un sistema de membranas. Recientemente se ha demostrado que las CPs pueden tomar sustancias de la hemolinfa por macro y micropinocitosis (79), corroborando que pueden filtrar las sustancias por exclusión de

tamaño. En el citoplasma presentan diferentes poblaciones de vacuolas según su densidad electrondensa. Se presume que almacenan diferentes sustancias en grandes cantidades, ya que el tamaño del retículo endoplásmico y del aparato de Golgi indica que son altamente anabólicas (80). De la morfología que presentan estas células se deduce su capacidad de síntesis y secreción de proteínas, cuyo perfil electroforético es similar al obtenido de cuerpo grasso. Sin embargo, cantidades elevadas de proteínas propias de las CPs son sintetizadas bajo ciertas condiciones (76). Dada la similitud de los perfiles electroforéticos de las CPs y el cuerpo grasso, así como también de la elevada cantidad de proteínas sintetizadas por las CPs, es muy posible que estas células jueguen otras funciones más allá de mantener la homeostasis en la hemolinfa (80,81), sin embargo, hace falta más investigación al respecto para esclarecer estas dudas.

## 2. Antecedentes

En *D. melanogaster*, se ha descrito que las CPs y los hemocitos tienen el mismo origen embrionario. Es decir, son originadas a partir de una célula progenitora en común (82,83). Aunado a lo anterior, en larvas de este mismo modelo, se ha demostrado que las CPs, glándula linfóide, y hemocitos circulantes no fagocíticos expresan un genotipo similar (84). El promotor del gen *Dorothy*, es uno de los marcadores genotípicos utilizados para distinguir poblaciones de hemocitos embrionarios, pero también presenta actividad en las CPs (84). Este gen codifica la enzima UDP-glicosiltransferasa, la cual ha estado implicada en la remoción de componentes endógenos y exógenos, actividad que ha sido atribuida a CPs y a hemocitos (85). En mamíferos los análogos de estas células son las células endoteliales sinusoides del hígado y macrófagos, respectivamente; ambas células juegan un papel importante en la homeostasis e inmunidad. Además, se ha demostrado que en mamíferos como en invertebrados, estas células receptores scavenger, PRRs, y TLRs (81). En insectos, incluyendo a los mosquitos, los hemocitos son uno de los mediadores de la respuesta humoral, y los únicos de la respuesta inmune celular (48). Sin embargo, el papel de las CPs en la respuesta inmune no ha sido completamente esclarecido, y son consideradas únicamente como células scavenger. Por otro lado, se han reportado varias evidencias de la posible participación de estas células en la respuesta inmune de *D. melanogaster* y mosquitos vectores de malaria (**Tabla 1**).

**Tabla 1. Marcadores de respuesta inmune expresados en células pericárdicas de dípteros**

Marcador	Larva	Pupa	Adulto	Modelo	Referencia
STAT	+	+	++	<i>Anopheles gambiae</i>	Barillas-Mury, 1999.
Sp22D y Defensina	+	+	++	<i>Anopheles gambiae</i>	Danielli, 2000
Serpina 10	+	+	++	<i>Anopheles gambiae</i>	Danielli, 2003
Promotor Serp10 <i>An. gambiae</i>	++	++	++	<i>Anopheles stephensi</i>	Gareth, 2004
TEP-I	+	+	++	<i>Anopheles stephensi</i>	E. Levashina, 2001
Promotor Dorothy	++	++	++	<i>Drosophila melanogaster</i>	D. Kimbrell, 2002 V. Honti, 2010

† Expresión sin localización conocida    †† Expresión en células pericárdicas

Las CPs son conocidas por su capacidad de tomar sustancias de la hemolinfa, y mantener la homeostasis de esta (86). Dentro de las moléculas que se encuentran en la hemolinfa, están los efectores y reguladores de la respuesta inmune. El gen *necrotic*, codifica un inhibidor de proteasas de la familia de las serpinas. La función de *necrotic*, es regular la activación de la vía Toll. En *D. melanogaster*, se reportó que las CPs toman a *necrotic* de la hemolinfa, y de esta manera controlan la activación de la vía. En dicho trabajo, se sugiere, que *necrotic* es captado por LpR1, un receptor de la familia de los LDLR (Low density Lipoprotein Receptor), el cual es expresado en CPs (87). Sin embargo, no fue demostrada una interacción física LpR1-*necrotic*, y las moléculas no colocalizaron en un gran porcentaje en las micrografías. En adición, no fue demostrada la procedencia de la proteína, ya que la detección fue realizada en proteína total (87). Por otro lado, en *An. gambiae*, se reportó la expresión de 4 isoformas de *serpina10*, en intestino, hemocitos y CPs. Interesantemente, *serpina10* carece de péptido señal, sugiriendo que la presencia de esta proteína en las CPs no es porque fue tomada de la hemolinfa (88). Aunado a lo anterior, también se observó que 2 isoformas

(KRAL y RCM) incrementan su expresión cuando oocinetos de *Plasmodium* invaden el intestino, no siendo así en retos con diferentes bacterias; sugiriendo una respuesta específica contra el parásito (88). Lo anterior coincide con lo reportado por Lycett et al, 2004 (89); en donde se utiliza la región promotora de la serpina10 de *An. gambiae*, para generar un sistema de expresión condicional específico para *Plasmodium*. La actividad del promotor fue visualizada por la actividad del gen reportero *LacZ*. El sistema de expresión fue utilizado en el mosquito *An. stephensi*, y el gen reportero se expresó en intestino, hemocitos y CPs, únicamente en presencia de *Plasmodium*. Estos resultados fueron consistentes con lo reportado por Danielli et al, 2003 (88), lo que refuerza la idea de que las CPs no toman la serpina10 de la hemolinfa. Por otro lado, demuestran que el mecanismo de regulación es conservado entre especies de anofelinos (88,89).

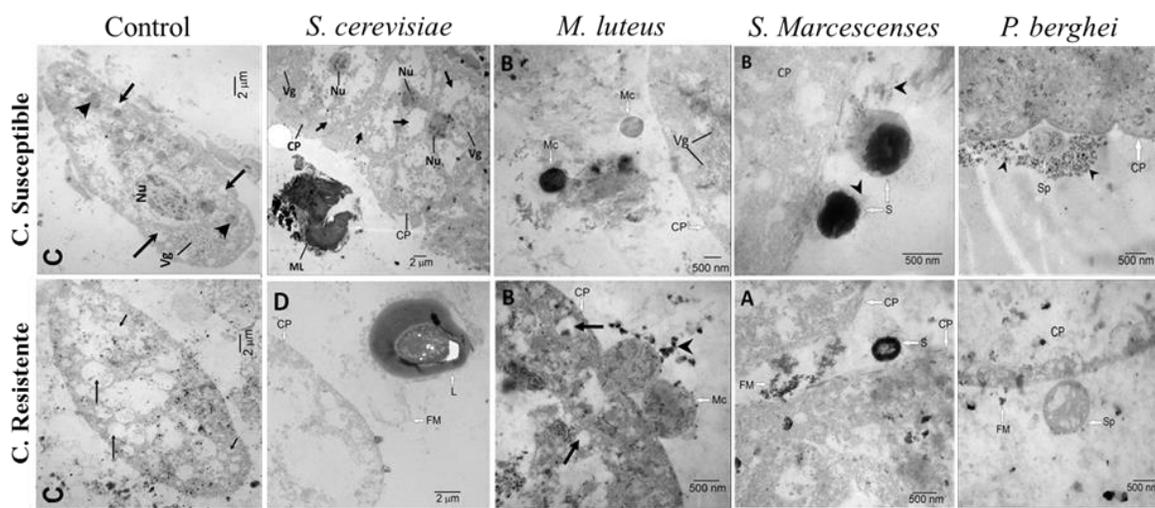
Las proteasas tipo serina juegan un papel muy importante en múltiples procesos celulares. En *An. gambiae*, se identificó una proteasa tipo serina acompañada de dominios de unión a quitina, LDLR, y SRCR (scavenger receptor cysteine-rich). El gen que codifica a esta proteína es *Sp22D*; su homólogo en mamíferos, participa en procesos de respuesta inmune. Esta proteína, se encontró expresada en un pequeño porcentaje de hemocitos, y en las CPs (90). El patrón de expresión fue tejido específico, sin embargo, se expresan diferentes isoformas según el estadio de vida en que se encuentre. Por otro lado, se observa que durante un reto inmune con bacterias, los niveles de expresión de *Sp22D* incrementan minoritariamente en CPs, y además no se une a bacterias como su homólogo en humanos. De manera inesperada y utilizando defensina como control del reto inmune, se encontró una acumulación elevada de esta en CPs (90). Los autores concluyen, que el papel de *Sp22D* está más ligado a la remoción de desechos de la remodelación en la metamorfosis y detección de daño, sin embargo, hacen notar la importancia de esclarecer si *Sp22D* y defensina son endógenos de las CPs o tomado de la hemolinfa. Lo anterior debido a que la *Sp22D* es expresada en un porcentaje bajo de hemocitos, por lo que sería insuficiente para lograr concentraciones tóxicas en la hemolinfa, y por consiguiente activar la función scavenger de las CPs (90).

La vía de JAK/STAT juega un papel muy importante en la regulación de la respuesta inmune de insectos (91). En *An. gambiae*, se ha reportado la presencia de esta vía de señalización. STAT es expresado, principalmente en el citoplasma de las células de cuerpo graso,

hemocitos, y CPs. Sin embargo, tras un reto inmune STAT es translocado en el núcleo, lo que evidencia la capacidad de respuesta inmunológica de las CPs. Los autores hacen referencia a que la presencia de STAT en las CPs se debe a que lo toman de la hemolinfa (92). Sin embargo, la translocación en el núcleo después de un reto inmune, habla de una respuesta al tratamiento con bacterias; por otro lado, sí STAT fuera tomado de la hemolinfa en lugar de translocarse al núcleo, se degradaría. De manera interesante en *D. melanogaster*, la activación de JAK por un reto inmune, resulta en la expresión de la proteína TEP-1, la cual es análoga a la proteína C3 de la vía del complemento de mamíferos (93). Este resultado correlaciona con el hecho de que las CPs y hemocitos de *An. gambiae*, expresan a TEP-1, y este incrementa su expresión tras un reto inmune con bacterias Gram negativas (94). Sugiriendo que la expresión de TEP1 es regulada por la vía JAK/STAT, y que esté es un mecanismo conservado en diferentes especies. Por otro lado, esta proteína contiene una secuencia de péptido señal, por lo que se cree que puede ser secretada en la hemolinfa, lugar en donde puede opsonizar a las bacterias para facilitar la fagocitosis. Debido a la presencia de TEP-1 en la hemolinfa, fue sugerido que las CPs la podrían captar. Así mismo, la producción de TEP-1 por hemocitos ocurre solo en hemocitos que expresan Sp22D (94). Debido a que los hemocitos que expresan Sp22D representan un porcentaje bajo, es difícil asumir que la concentración de TEP-1 en hemolinfa pudiera ser suficiente para que las CPs se activen y la remuevan de la hemolinfa.

Durante la infección de *Plasmodium* en *An. gambiae*, únicamente el 19% de los esporozoítos llega a infectar a las glándulas salivales. Durante las primeras 8 horas, los esporozoítos deben infectar las glándulas salivales, ya que pasando este tiempo los mosquitos eliminan eficientemente a los parásitos. Por otro lado, el corazón facilita la llegada de los esporozoítos a las glándulas salivales, ya que aprovechan el flujo de la hemolinfa como transporte pasivo. Los mecanismos de eliminación de esporozoítos son desconocidos, ya que únicamente el 2% de los hemocitos fagocitan parásitos. Interesantemente, los esporozoítos se acumulan en las zonas de alto flujo de hemolinfa, lugar en donde se encuentran las CPs (95). Esta acumulación de parásitos en las regiones periostiales, correlaciona con la acumulación de hemocitos en esta zona. Sin embargo, los esporozoítos de *Plasmodium* raramente son fagocitados, por lo que se ha sugerido que los hemocitos cercanos a las CPs, liberan factores humorales que pueden lisar o melanizar a los parásitos (96). La acumulación de hemocitos

sésiles periostiales se ha observado en mosquitos retados con diferentes bacterias, en donde ocurre fagocitosis y melanización mediada por hemocitos (97). Sin embargo, los agregados de hemocitos se comienzan a formar hasta las 24 hrs, lo que no correlaciona con el tiempo crítico de infección de las glándulas salivales por esporozoítos de *Plasmodium*, el cual ocurre durante las primeras 8hrs (95), sugiriendo una escasa participación de los hemocitos. Por otro lado, la función de las CPs no es exclusivamente de scavenger, también pueden secretar sustancias, en la hemolinfa (98). En adición, como se mencionó anteriormente, es muy posible que las CPs expresen efectores de la respuesta inmune humoral del mosquito.



**Figura 3. Micrografías electrónicas de CPs interactuando con diferentes patógenos.** En las imágenes se muestra como las CPs de la cepa susceptible presentan una mayor abundancia de peroxisomas en relación a la cepa resistente (control). Las CPs de ambas cepas pueden interactuar directamente con diferentes microorganismos (*S. cerevisiae*, *M. luteus*, *S. Marcescenses*, *P. berghei*) (99).

En nuestro grupo de investigación, Gutiérrez-Huante (99) observó que las CPs de *An. albimanus* pueden interactuar directamente con diferentes microorganismos incluyendo a *Plasmodium* (Figura 3). Mediante análisis ultraestructurales se comparó la respuesta de las CPs de una cepa resistente y una susceptible a la infección por *Plasmodium*, encontrando que las CPs en ambas cepas tienen la misma capacidad de respuesta contra levaduras y bacterias. Esta respuesta fue evaluada mediante la capacidad de las CPs de liberar microvesículas que se acumularon en la superficie de las bacterias y levaduras melanizadas. Para el caso de *Plasmodium*, en mosquitos de ambas cepas no se observó melanización. Sin embargo, en la

cepa resistente se observó una gran cantidad de material electrodensito rodeando a los esporozoítos de *Plasmodium* localizados en la periferia de las CPs (**Figura 3**). Estos datos indican que las CPs pueden estar jugando un papel importante en la eliminación de esporozoítos de *Plasmodium*, sin embargo, se necesitan más estudios al respecto.

Las CPs expresan diferentes marcadores de inmunidad e interactúan directamente con diferentes microorganismos, incluyendo a *Plasmodium*, evidencias que sugieren fuertemente la participación de estas células en la respuesta inmune. Por otro lado, se ha evidenciado con ensayos funcionales, que las CPs de mosquitos *An. albimanus* retados inmunológicamente con levaduras o zimosan, presentan actividad lisosomal y de fosfatasa ácida; y los extractos de proteína de corazones retados con zimosan, tienen propiedades líticas; por último, un análisis transcripcional demostró que en el corazón se expresan genes relacionados con inmunidad (100). Uno de estos genes es la *serpina11*, cuyo ortólogo en *An. gambiae* es *serpina10*, la cual se ha reportado su expresión en CPs en ese mismo modelo (88). En el transcriptoma de los corazones también se observó la sobreexpresión de algunos AMPs como cecropina y lisozima. Esta última, se ha descrito como parte de las proteínas almacenadas y secretadas por CPs en *Calliphora erythrocephala*, la cual es sobre-expresada solo después de un reto inmune, con una alta participación de lisis bacteriana en el hemocele (80).

La respuesta inmune del mosquito en contra de patógenos, demanda de procesos eficaces y eficientes que involucran procesos celulares y humorales. La exposición continua a un mismo tipo de patógenos confiere ventaja en la respuesta contra este mismo, puesto que se incrementa la expresión de los AMPs específicos contra él (37). El fenómeno de endoreplicación ocurre en muchos organismos, y es considerado como un mecanismo de respuesta al estrés ocasionado por múltiples factores endógenos y exógenos. Esta respuesta se refleja con la producción masiva de moléculas que ayudan a lidiar con la situación de estrés (101,102). En *D. melanogaster* la endoreplicación es esencial para su desarrollo y reproducción. En ambos casos se demuestra la amplificación de regiones genómicas en las que se encuentran las secuencias de los genes necesarios para cada situación, lo que tiene como resultado la producción masiva de las moléculas que se demandan en ese momento (103). En *An. albimanus* se presenta incorporación de BrdU (análogo de la timidina) sin presencia de mitosis después de un reto con levaduras, lo que sugiere un fenómeno de

endorreplicación. Este fenómeno ocurre en cuerpo graso, CPs y epitelio epidérmico subtegumentario, esto sugiere la posibilidad de que la endorreplicación sea un mecanismo para la producción masiva de moléculas de respuesta inmune (104). Soportando esta evidencia, se ha reportado que la síntesis de DNA ocurre de manera diferencial en los tejidos, e interesantemente siempre se presenta de manera evidente en PCs y cuerpo graso. Por otro lado, el patrón de presencia de BrdU en los núcleos no es uniforme, puesto que presenta regiones de alta incorporación y otras muestran ausencia (105). Estos datos sugieren que posiblemente haya una amplificación génica de genes involucrados en respuesta inmune. Aunado a esto, datos preliminares demuestran la posible amplificación de algunos genes cuya expresión en el transcriptoma fue elevada, sin embargo, estos datos se obtuvieron utilizando mosquitos enteros, por lo que la amplificación específica en cada tejido se desconoce (106). No obstante, resulta interesante el hecho de que la endorreplicación ocurre en órganos inmunocompetentes, y dentro de ellos se encuentran las CPs, sin embargo, para sentar las bases de la relación entre la endorreplicación y la inmunidad, es necesario demostrar que las CPs son un tipo celular inmucompetente.

### **3. Justificación**

La malaria es la enfermedad parasitaria tropical más importante del mundo. Es transmitida por mosquitos del género *Anopheles* infectados con *Plasmodium*. Los cuales durante su alimentación, liberan esporozoítos (los cuales están contenidos en la saliva del mosquito y son la fase infectiva en humanos) al torrente sanguíneo, iniciando así la infección en el humano y posteriormente los síntomas de la enfermedad. Recientemente, se reportó que los esporozoítos de *Plasmodium* utilizan al vaso dorsal (corazón) como medio de transporte para invadir glándulas salivales. Sin embargo, cerca del 80% de los esporozoítos son atrapados y eliminados en las cercanías del corazón. Lo que sugiere, que este órgano es un sitio estratégico para la eliminación de patógenos en el mosquito. Por lo que, es de suma importancia entender los mecanismos celulares y moleculares empleados por el corazón del mosquito durante la eliminación de microorganismos.

#### **4. Hipótesis**

Las células pericárdicas de *Anopheles albimanus* expresan genes relacionados a inmunidad después de un reto microbiano.

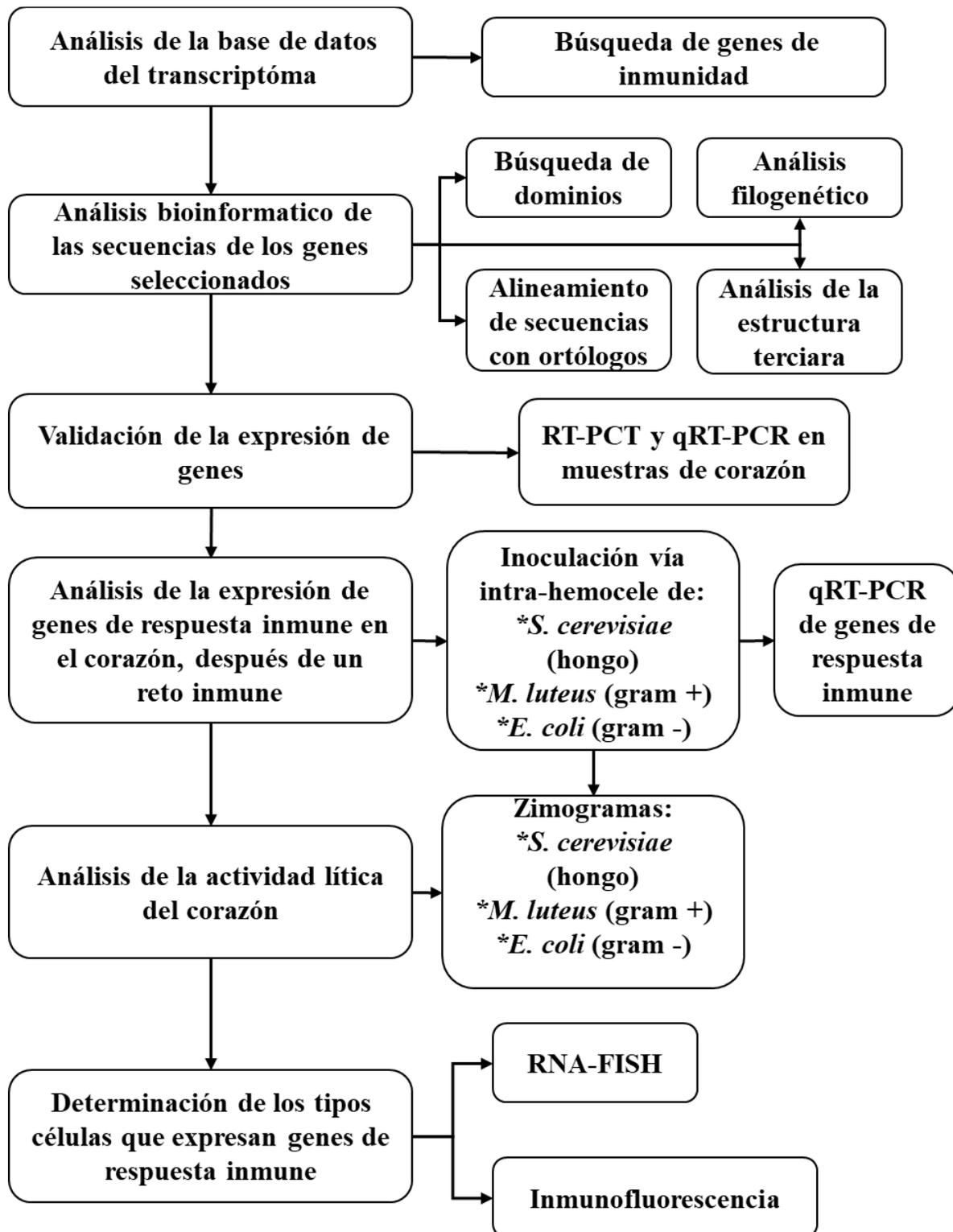
## **5. Objetivo**

Caracterizar los componentes celulares y moleculares, del corazón de *Anopheles albimanus*, que participan en la eliminación de patógenos.

## **6. Objetivos particulares**

1. Analizar la expresión de genes de respuesta inmune en el transcriptoma de corazones y validar su expresión.
2. Analizar la expresión de genes de respuesta inmune en corazones de *An. albimanus* después de un reto inmune.
3. Determinar los tipos celulares del corazón de *An. albimanus* que expresan genes de respuesta inmune.
4. Caracterizar la expresión espacio-temporal del gen AALB006666 en *An. albimanus* durante un reto inmune.

## 7. Estrategia Experimental



## **8. Metodología**

### **8.1. Material Biológico**

#### **8.1.1. Mosquitos**

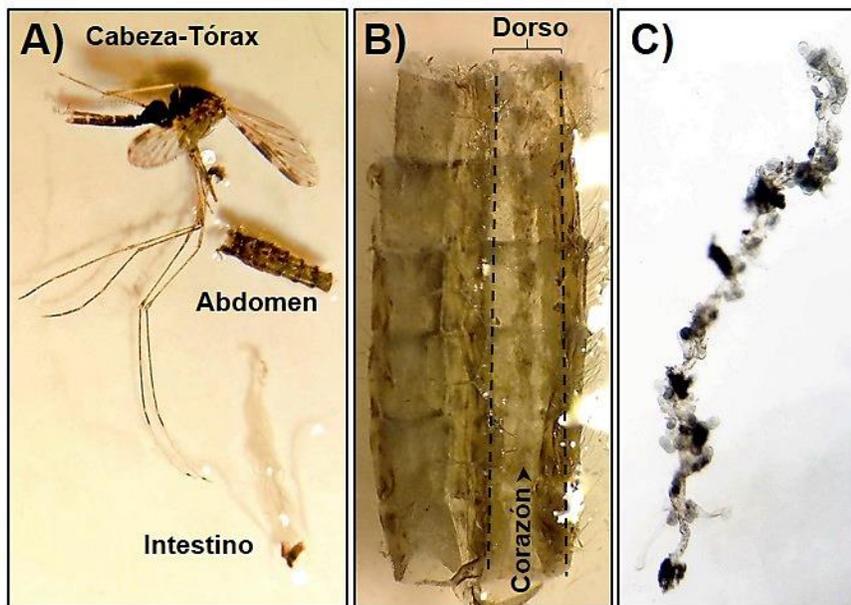
Mosquitos *Anopheles albimanus* cepa Tapachula (107), fueron obtenidos del Instituto Nacional de Salud Pública (INSP). Los huevecillos para pie de cría fueron obtenidos a partir de mosquitos adultos de 3 días de edad que fueron alimentados con sangre fresca de conejo, utilizando 15U/ mL de heparina (Sigma, Cat. H3393) para evitar la coagulación. Este proceso fue realizado por alimentación artificial por membrana, en donde los alimentadores que contiene la sangre fueron calentados a 37°C con un baño circulatorio. En la etapa larvaria, los mosquitos fueron alimentados con croquetas para cachorro de gato (Wiskas, gatitos) pulverizadas, y fueron mantenidos a una temperatura controlada de 28°C, con un fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. En la etapa adulta los mosquitos fueron alimentados utilizando algodones humedecidos con solución azucarada al 3%. Los mosquitos adultos fueron mantenidos a una temperatura de 28°C y 80% de humedad relativa, con un fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

#### **8.1.2. Microorganismos**

Los microorganismos utilizados para realizar los retos inmunes en los mosquitos fueron los siguientes: *Saccharomyces cerevisiae* (Levaduras), *Micrococcus luteus* (Gram +), *Escherichia coli* (Gram -), todos ellos de Sigma. Los microorganismos fueron re-suspendidos en agua inyectable (PiSA) libre de pirógenos e inactivados por calor, calentando las muestras en baño María de agua hirviendo durante 10 min. Por último, la concentración de microorganismo de cada suspensión fue ajustada para obtener stocks de trabajo 10X a una concentración de 80 000 células de *S. cerevisiae*/μL, y de 320 000 células de bacterias (*M. luteus* o *E. coli*)/μL. Se hicieron alícuotas de 10μl cada una, y fueron almacenaron a 4°C. Al momento de realizar los experimentos, a cada alícuota fue diluida 1:10 con 90 μL de medio RPMI 1640 (Gibco), y se homogenizaron. Las concentraciones de trabajo fueron las siguientes: 8 000 células de *S. cerevisiae*/μL, y de 32 000 células de bacterias (*M. luteus* o *E. coli*)/μL.

### 8.1.3. Reto inmune

Los mosquitos utilizados para todos los experimentos fueron alimentados desde su emergencia con solución azucarada al 10% suplementada con 1:100 de antibiótico-antimicótico (Cat. A5955) (Concentraciones finales 100 U de penicilina/ml, 100  $\mu$ g de estreptomicina/mL, 250 ng de anfotericina B/mL). Mosquitos hembra de 3 días de edad fueron anestesiados sobre una cama de hielo, y se inocularon entre el 5° y 6° segmento abdominal con la ayuda de una micro-jeringa y una micro-aguja, elaborada a partir de un capilar de toma de muestra sanguínea, insertada en una jeringa (Drummond). Los ensayos fueron realizados en 5 grupos de mosquitos, un grupo no inyectado, un grupo inoculado con 0.250  $\mu$ L de RPMI, y tres grupos (retados) inyectados con 0.250  $\mu$ L de RPMI que contiene *S. cerevisiae*, *M. luteus*, o *E. coli*, en las concentraciones ya mencionadas.



**Figura 4. Disección del mosquito.** Para la obtención de los corazones, **A)** se separa el abdomen del tórax, y el intestino es extraído del abdomen. **B)** Se abre el abdomen cortando un de las membranas pleurales laterales. **C)** Se separa el corazón del dorso del abdomen.

#### **8.1.4. Obtención del corazón**

Los mosquitos fueron anestesiados en hielo, posteriormente se colocaron sobre una gota de PBS (**Apéndice 13.1**), en la cual con ayuda de agujas entomológicas, el abdomen fue separado del tórax, entonces ovarios e intestino fueron retirados del abdomen. Posteriormente el abdomen fue cortado en una de las membranas pleurales laterales con ayuda del bisel de una aguja 21GX32mm y una aguja entomológica. Por último el corazón fue separado del abdomen con agujas entomológicas y lavado cuidadosamente tres veces sobre gotas de PBS (**Figura 4**). Las muestras fueron colectadas de diferente manera según el tipo de ensayo (las condiciones de colecta se indican en cada método).

### **8.2. Extracción de RNA, Síntesis de cDNA, RT-PCR y qRT-PCR**

#### **8.2.1. Extracción de RNA**

Para la obtención de RNA fueron utilizados 20 corazones de mosquito por cada condición, los cuales fueron colectados directamente en 250  $\mu\text{L}$  de reactivo TRIzol (Invitrogen) mantenido en hielo durante la colecta. Una vez terminada la colecta, la muestra se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento.

Las muestras previamente colectadas, fueron descongeladas sobre una cama de hielo (aproximadamente 10 min), y posteriormente se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 10 min. Una vez atemperadas, se les agregó 50  $\mu\text{L}$  de cloroformo a cada muestra y se agitaron vigorosamente por 30 segundos, entonces se dejaron reposar por 3 min. Después, las muestras fueron centrifugadas a 12 000 g durante 30 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se recuperó la fase acuosa (100  $\mu\text{L}$ ), se le agregó 0.5  $\mu\text{L}$  de acrilamida linear (5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) (**Apéndice 13.2**), 2 volúmenes de isopropanol (200  $\mu\text{L}$ ), fueron agitadas durante 30 seg y se incubaron por 2 h a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente las muestras se centrifugaron a 12 000 g por 30 min a  $4^{\circ}\text{C}$ , se descartó el sobrenadante, quedando únicamente la pastilla de RNA, la cual se lavó dos veces con etanol frío al 70%. Las pastillas secadas a T.A. y resuspendidas en 10  $\mu\text{L}$  de agua tratada con DEPC (Invitrogen). Las cantidades de RNA fueron medidas por espectrofotometría utilizando un NanoDrop<sup>TM</sup> Lite (Thermo Scientific).

### 8.2.2. Síntesis de cDNA

Para la obtención de cDNA a partir de mRNA, las muestras de RNA fueron tratadas previamente con DNasa para eliminar trazas de DNA. Para cada reacción se tomaron 100ng de RNA, se agregó 1  $\mu\text{L}$  de buffer de reacción para DNasa 10X, 1  $\mu\text{L}$  de DNasa I (Thermo Scientific Cat. EN0521), el volumen final fue ajustado a 10  $\mu\text{L}$  e incubado a 37°C por 30 min. Posteriormente la reacción fue detenida agregando 1  $\mu\text{L}$  de EDTA 50 mM e incubando a 65°C por 10 min. Una vez obtenido el RNA libre de trazas de DNA, se prosiguió con la síntesis de cDNA, la cual se realizó utilizando el kit First Strand cDNA Synthesis (Thermo Scientific Cat. K1622). A cada muestra de RNA se le agregó 1  $\mu\text{L}$  de la solución de oligo dT, se incubaron a 65°C por 5 min, e inmediatamente los tubos fueron colocados en hielo. Entonces, a cada reacción fueron agregados 4  $\mu\text{L}$  de buffer de reacción 5X, 1  $\mu\text{L}$  de inhibidor de RNasas RiboLock (20 U/ $\mu\text{L}$ ), 2  $\mu\text{L}$  de dNTPs Mix (10 mM) y 1  $\mu\text{L}$  de Reverso Transcriptasa RevertAid M-MuLV (200 U/ $\mu\text{L}$ ). Las mezclas de reacción se agitaron cuidadosamente y fueron incubadas a 42°C por 60 min. Por último, las reacciones fueron detenidas elevando la temperatura a 70°C durante 5 min.

### 8.2.3. PCR punto final

Para las reacciones de PCR punto final fue utilizado 1  $\mu\text{L}$  de las reacciones de cDNA obtenidas previamente, 0.2  $\mu\text{L}$  de DNA Taq polimerasa (5 U/ $\mu\text{L}$ , Thermo Fisher #EP0402), 0.5  $\mu\text{L}$  de dNTPs Mix (10  $\mu\text{M}$  c/u, Thermo Fisher #R0191), 0.4  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (25 mM), 1  $\mu\text{L}$  de primer mix (Forward and Reverse, 1  $\mu\text{M}$  c/u) (Secuencias en **Apéndice 13.3**), 1  $\mu\text{L}$  de buffer de reacción Taq 10X. Las reacciones tuvieron un volumen final de 10  $\mu\text{L}$ . Las condiciones usadas para la reacción fueron, 3 min a 95°C (1 ciclo), 95°C-30 seg / 60°C-30 seg / 72°C-1 min (40 ciclos), 72°C 10 min (1 ciclo). Una vez finalizada la PCR, a cada reacción se le agregó 2  $\mu\text{L}$  de Load Buffer 6X (**Apéndice 13.4**) y fueron mezcladas por pipeteo, posteriormente las reacciones se corrieron en geles de agarosa al 2% (con 1  $\mu\text{L}$  de EtBr [10 mg/mL]) en buffer TAE (**Apéndice 13.5**) a 60 mA por 1 hora. Finalmente los productos de PCR fueron visualizados usando un transiluminador de luz UV.

#### **8.2.4. qRT-PCR (PCR Tiempo-Real)**

Los ensayos de qPCR Tiempo-Real (qRT-PCR) fueron hechos usando reactivo Maxima SYBR /ROX qPCR Master Mix (2X) (Thermo Fisher) y un equipo ViiA7 Real Time PCR System (Applied Biosystems). Las reacciones fueron hechas en placas estándar de 96 pozos (Applied Biosystems). Tres reacciones por gen de cada muestra fueron hechas. Cada reacción se hizo con 0.4  $\mu$ L de reacción de cDNA, 0.125  $\mu$ M de primer Forward y Reverse. Los datos fueron analizados usando el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (108), en donde GAPDH fue utilizado como gen de referencia.

#### **8.3. Detección de RNA por Hibridación *In Situ* Fluorescente (RNA-FISH)**

La detección *in situ* del mRNA de lisozima por RNA-FISH fue realizada utilizando la tecnología de Stellaris<sup>®</sup>RNA FISH (LGC Biosearch Technologies) (109). Las secuencias de las sondas (**Apéndice 13.6**) fueron diseñadas con el software Stellaris Probe Designer 4.2, y usando como blanco la secuencia de la lisozima c-1 de *An. albimanus* (albLys c-1) con ID de VectorBase AALB004517. Por otro lado, los ensayos fueron realizados siguiendo el protocolo de E. K. Abbaszadeh y E. R. Gavis (110), como se describe a continuación.

**8.3.1. Fijación de tejido.** Cinco mosquitos fueron diseccionados en una gota de PBS, los corazones obtenidos fueron lavados cuidadosamente tres veces y fueron colocados en un tubo cónico de 1.5 mL con 500  $\mu$ L de PBS en frío. Posteriormente el PBS fue sustituido por buffer de fijación (**Apéndice 13.7.1**), se protegieron de la luz y se incubaron por 30 min en agitación a TA. Posteriormente el buffer de fijación es retirado y se dan tres lavados con PBST (**Apéndice 13.7.2**) de 5 min a TA.

**8.3.2. Deshidratación y permeabilización del tejido.** Después del último lavado de la fijación, los corazones fueron deshidratados en soluciones de PBST con concentraciones ascendentes de metanol, en donde fueron incubados durante 5 min en cada una de las siguientes soluciones 7:3 PBST:metanol, 1:1 PBST:metanol, 3:7 PBST:metanol, y 10 min en metanol absoluto. En este paso las muestras se pueden almacenar a  $-20^{\circ}\text{C}$ , sin embargo, es recomendable continuar con el proceso.

**8.3.3. Hibridación.** Los corazones fueron rehidratados por incubaciones seriadas en las siguientes soluciones: 3:7 PBST:metanol, 1:1 PBST:metanol, 7:3 PBST:metanol. En cada solución, los corazones fueron incubados por 5 min en agitación constante a TA. En seguida, se dieron 4 lavados con PBST, y se pre-hibridaron en 500  $\mu$ L de buffer de lavado (**Apéndice 13.7.3**) por 10 min a 37°C en agitación y oscuridad. El buffer de lavado fue reemplazado por 100  $\mu$ L buffer de hibridación (**Apéndice 13.7.4**) con 625 nM de sondas (Stellaris®RNA FISH de LGC Biosearch Technologies) específicas para *lisozimas c-1* de *An. albimanus*, las cuales están marcadas con el fluoróforo Quasar 570. Las muestras fueron incubadas por 16 horas a 37°C en agitación y en ausencia de luz. Posteriormente, fue retirado el buffer de hibridación y agregados 500  $\mu$ L de buffer de lavado precalentado a 37°C, en seguida el buffer de lavado fue reemplazado por uno fresco e incubado a 37°C por 30 min en agitación y en oscuridad. Este paso se repitió una vez más. Por último, se realizaron tres lavados de 5 min cada uno con PBST, y las muestras fueron colocadas en una gota de medio de montar DAPI fluoromount-G (EMS). Las muestras fueron observadas en un microscopio confocal C2 (Nikon) acoplado a un microscopio E-600 (Nikon). Las imágenes fueron analizadas usando el software Fiji ImageJ, y las imágenes 2D fueron obtenidas por la proyección de los datos Z-stack en un solo plano.

#### **8.4. Detección de RNA por RNA FISH STICs.**

Para la detección *in situ* de mRNA de *Cec1* fue utilizada la metodología RNA FISH-STICs descrita por Sinnamon and Czaplinski (111). La técnica consiste en el uso de tres sondas (Secuencias en el **Apéndice 13.8**) que hibridan con el mensajero y entre sí para amplificar la señal y por consiguiente detectar la presencia de mRNAs pequeños como el de *Cec1*. Cabe mencionar que todas las soluciones empleadas en el RNA FISH (**Sección 8.5**) fueron empleadas para el RNA FISH-STICs.

Los ensayos fueron realizados en abdómenes de mosquitos los cuales fueron fijados, deshidratados y permeabilizados como esta descrito en la sección anterior (**8.3.2.-8.3.3**). Una vez deshidratados los abdómenes se prosiguió con las hibridaciones, como se describe a continuación.

**8.4.1. Hibridación primaria.** Los abdómenes fueron rehidratados por incubaciones seriadas en las siguientes soluciones: 3:7 PBST:metanol, 1:1 PBST:metanol, 7:3 PBST:metanol. En cada solución, los corazones fueron incubados por 5 min en agitación constante a TA. En seguida, se dieron 4 lavados con PBST, y se pre-hibridaron en 500  $\mu$ L de buffer de lavado por 10 min a 37°C en agitación y oscuridad. El buffer de lavado fue reemplazado por buffer de hibridación con 1  $\mu$ M de cada sonda primaria (ambas de IDT), y los abdómenes fueron incubados por 16 horas a 37°C en agitación y en ausencia de luz. Posteriormente, se retiró el buffer de hibridación y fueron agregados 500  $\mu$ L de buffer de lavado precalentado a 37°C, en seguida se cambió por buffer de lavado nuevo y se incubó a 37°C por 30 min en agitación y en oscuridad, este paso se repitió una vez más.

**8.4.2. Hibridación secundaria.** El buffer de lavado fue retirado, y sustituido por 100  $\mu$ L buffer de hibridación que contiene 1  $\mu$ M de sonda secundaria (IDT) y se incubó por 3 h a 37°C en agitación. Posteriormente, el buffer de hibridación fue retirado y se realizaron tres lavados de 30 min cada uno con 500  $\mu$ L buffer de lavado a 37°C, en agitación.

**8.4.3. Hibridación terciaria.** El buffer del último lavado fue retirado y se agregaron 100  $\mu$ L de buffer de hibridación con 1  $\mu$ M de sonda terciaria (T4 Oligo) y se incubó por 3 h a 37°C en agitación y protegidos de la luz. Posteriormente, el buffer de hibridación fue retirado y se realizaron tres lavados de 30 min cada uno con 500  $\mu$ L buffer de lavado a 37°C, en agitación. Por último, se dieron tres lavados de 5 min cada uno con PBST, y las muestras fueron colocadas en una gota de medio de montar DAPI fluoromount-G (EMS). Las muestras fueron observadas en un microscopio confocal C2 (Nikon) acoplado a un microscopio E-600 (Nikon). Las imágenes fueron analizadas usando el software Fiji ImageJ, y las imágenes 2D fueron obtenidas por la proyección de los datos Z-stack en un solo plano.

## **8.5. SDS-PAGE y Western blot**

### **8.5.1. Obtención de la muestra**

Las muestras para el WB de lisozima fueron obtenidas colocando 10 abdómenes de mosquito en 50  $\mu$ L de RIPA (**Apéndice 13.9.1**) en un tubo de 1.6 mL, en donde los abdómenes fueron macerados utilizando un pistilo acoplado a un agitador. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 13,000 g durante 5 min a 4°C y se recuperó 40  $\mu$ L del sobrenadante, al cual

se le agregó 13.33  $\mu\text{L}$  de Laemmli load buffer 4X (**Apéndice 13.9.2**) y se mezclaron cuidadosamente, entonces 20  $\mu\text{L}$  fueron tomados para correrlos en el gel. Para los WB de la proteína AALB006666 las muestras se obtuvieron de 10 mosquitos hembra macerado en 200  $\mu\text{L}$  de RIPA, del cual se recuperaron 180  $\mu\text{L}$  y se le agregaron 60  $\mu\text{L}$  de Laemmli load buffer 4X, entonces se tomaron 5  $\mu\text{L}$  de cada muestra (aproximadamente 30  $\mu\text{g}$  de proteína) para correrlas en el gel.

### **8.5.2. SDS-PAGE y electro transferencia**

Las muestras de proteína se corrieron en un gel de poliacrilamida al 13 % (**Apéndice 13.9.3**) en buffer Laemmli de corrida (**Apéndice 13.9.4**) a una corriente de 25 mA durante 1 hora, usando un sistema de electroforesis Mini-PROTEAN Tetra Cell (BIO-RAD). Posteriormente, el gel fue equilibrado en buffer de transferencia (**Apéndice 13.9.5**) en agitación durante 10 min. Entonces el gel fue transferido a una membrana de nitrocelulosa de tamaño de poro 0.2  $\mu\text{m}$  (Whatman Protran) a 90 V durante 90 min a 4°C, usando un sistema de electro-transferencia Mini Trans-Blot (BIO-RAD). Una vez terminada la electro-transferencia, la membrana fue incubada con solución rojo de Ponceau durante un minuto para revisar la eficiencia de la transferencia, y seguido la membrana fue lavada con PBS para retirar el colorante. Entonces la membrana fue bloqueada en una solución de leche descremada (Svelty, Nestle) al 5% en PBS, durante una hora en agitación a RT.

### **8.5.3. Incubación con anticuerpos y revelado**

Para la detección de la lisozima se utilizó un anticuerpo comercial policlonal de conejo anti lisozima de clara de huevo (Abcam-Ab391) diluido 1:1500 PBS con leche al 5%. Para la detección de la proteína AALB006666 se utilizó el suero de un conejo inmunizado contra un péptido sintético cuya secuencia (QLVRDDGPVTGDGKPE) pertenece al carboxilo terminal de la proteína AALB006666, el suero fue usado a una dilución de 1:1500 en leche al 5% en PBS. Este anticuerpo fue gentilmente proporcionado por el grupo del Dr. Jesús Martínez Barnetche del CISEI-INSP. Los anticuerpos fueron incubados a 4°C en agitación durante toda la noche.

Posterior a la incubación con los anticuerpos primarios, las membranas fueron lavadas tres veces con solución de lavado (PBS con 0.2% de Tween 20) durante 10 min en agitación a

RT. Enseguida la membrana fue incubada 1 hora en agitación a RT, con un anticuerpo secundario de cabra anti conejo acoplado a peroxidasa de rábano (Millipore), a una dilución de 1: 60,000 en PBS con leche al 2.5%. Después, las membranas fueron lavadas tres veces con solución de lavado por 10 min a en agitación a RT. Por último la membrana fue lavada rápidamente con PBS y mantenida en PBS hasta el revelado.

Los anticuerpos adheridos a la membrana fueron revelados por quimioluminencia, utilizando reactivo Western Lightning PLUS-ECL (PerkinElmer) y placas auto-radiográficas BioMax XAR (Kodak). Las placas fueron expuestas a diferentes tiempos.

### **8.6. Ensayos de inmunofluorescencia**

Los mosquitos fueron anestesiados en frío y el abdomen fue separado del tórax, posteriormente fue separado el último segmento abdominal, y fueron removidos los ovarios y el intestino. En seguida el abdomen fue cortado longitudinalmente en una de las membranas pleurales laterales con ayuda del bisel de una aguja de jeringa y una aguja entomológica. Los abdómenes diseccionados (abiertos a manera de libro) fueron colocados en solución de fijación (4% de formaldehído en PBS) durante 30 min, protegidos de la luz a RT. Después, la solución de fijación fue retirada y se realizaron tres lavados de 10 min con solución de lavado (0.2% de Tween 20 en PBS). El tejido fue permeabilizado con PBS con 2% de detergente Tritón X-100 durante 10 min a RT. Posteriormente, los tejidos fueron lavados tres veces e incubados durante 2 horas a RT con solución de bloqueo (PBS con 2% de albumina sérica bovina). Posteriormente, la solución de bloqueo fue sustituida por solución de bloqueo fresca conteniendo el anticuerpo primario anti-lisozima de clara de huevo de gallina (Abcam-Ab391) a una dilución de 1:100. Las muestras fueron incubadas toda la noche a 4°C. El anticuerpo primario fue retirado y los tejidos fueron lavados tres veces, después se incubaron durante 2 horas a RT con anticuerpo secundario cabra anti-conejo conjugado a Alexa Fluor 488, a una dilución 1:100 en solución de bloqueo. Por último, el anticuerpo secundario fue retirado y los abdómenes lavados tres veces con solución de lavado y una vez con PBS. Las muestras fueron montadas en portaobjetos con medio de montar que contiene DAPI (DAPI-Fluoromont-G, EMS). Las muestras fueron visualizadas en un microscopio confocal C2 (Nikon), acoplado a un microscopio E-600 (Nikon).

## **8.7. Marcaje de hemocitos con CM-Dil**

Para la visualización de los hemocitos sobre los abdómenes o corazones aislados, los mosquitos fueron anestesiados en frío e inoculados vía intra-hemocele entre el sexto y séptimo segmento abdominal con Vybrant CM-Dil (V-22888, Thermo Fisher) diluido 1:200 en medio RPMI. Los mosquitos mantenidos a 28°C por 20 min, posteriormente fueron diseccionados los abdómenes o corazones y fueron colocados en solución de fijación (4% de formaldehído en PBS) durante 30 min, protegidos de la luz a RT. Después, la solución de fijación fue removida realizando tres lavados rápidos con PBS, y los abdómenes o corazones fueron montados en portaobjetos con medio de montar que contiene DAPI (DAPI-Fluoromont-G, EMS). Las muestras fueron analizadas en un microscopio de epifluorescencia Eclipse 80i (Nikon).

## **8.8. Detección de actividad lítica**

La detección de proteínas con actividad lítica fue realizada mediante el uso de zimogramas. La metodología original consiste en marcar células *M. luteus* con el colorante azul brillante de remazol, el cual se une a los grupos hidroxilo de los carbohidratos de la pared celular (111,112). En el caso de *M. luteus*, el carbohidrato de mayor abundancia es el péptidoglicano, sin embargo, las bacterias Gram (-) como *E. coli* contienen lipopolisacárido y las levaduras como *S. cerevisiae* contienen zimosan, ambos componentes al igual que el péptidoglicano son carbohidratos, por lo que potencialmente se pueden unir al azul de remazol. Por lo anterior, se decidió marcar con azul brillante de remazol a *M. luteus*, *S. cerevisia* y *E. coli* utilizando el mismo protocolo reportado para *M. luteus*.

### **8.8.1. Obtención de microorganismos marcados con azul brillante de remazol**

Para la obtención de los microorganismos marcados con azul brillante de remazol (RBB-*M. luteus*, RBB-*E. coli*, RBB-*S. cerevisiae*) se utilizaron 300 mg de *M. luteus* o 300 mg de *S. cerevisiae*, ambos liofilizados (Sigma). Para *E. coli*, se utilizó la pastilla bacteriana generada de 50ml de cultivo LB incubada a 37°C en agitación durante toda la noche. Los distintos microorganismos fueron resuspendidos en 30 mL de agua bidestilada a 50°C en agitación. Enseguida se le agregaron 20 mL de una solución acuosa de azul brillante de remazol (10 mg/mL, Sigma). Treinta minutos después fueron agregados de manera gradual 4 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

hasta que toda la sal estuviera disuelta, entonces fueron agregados 2 mL de una solución acuosa de  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  (200 mg/mL) y se agitaron durante 30 min a  $50^\circ\text{C}$ . Posteriormente, la suspensión fue centrifugada a 3,000 g por 10 min, el sobrenadante fue removido y la pastilla de microorganismos marcados con azul brillante de remazol fue resuspendida en 20 mL de una solución 50 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -NaOH pH 7.0. Este proceso se repitió varias veces hasta que el sobrenadante quedará libre de trazas de colorante. Entonces la pastilla fue resuspendida en 10 mL de agua desionizada y fue almacenada a  $4^\circ\text{C}$  hasta su uso.

### **8.8.2. Obtención de las muestras para los zimogramas**

Cincuenta corazones o 30 intestinos de mosquitos fueron colectado en 30  $\mu\text{L}$  Leammli load buffer 1X (**Apéndice 13.9.2**) con inhibidores de proteasa (100  $\mu\text{M}$  TLCK, 200  $\mu\text{M}$  de leupeptina, 1 mM de PMSF) y sin agentes reductores. Posteriormente las muestras fueron homogenizadas con un pistilo, y se almacenaron a  $-20^\circ\text{C}$  por un tiempo no mayor a una semana.

### **8.8.3. Zimogramas**

Las muestras fueron cargadas en un gel convencional de SDS-PAGE que contiene 20% de la suspensión de microorganismos marcados con azul brillante de remazol (**Apéndice 13.10**), y las condiciones de corrida fueron idénticas a las descritas en el apartado **8.7.2**. Una vez terminada la SDS-PAGE, el gel fue lavado 2 veces en agua desionizada durante 10 min a RT. Posteriormente se incubó en buffer de reacción de lisozima (**Apéndice 13.11**) a  $37^\circ\text{C}$  en agitación, después el buffer de reacción de lisozima fue cambiado por buffer fresco y se incubó toda la noche a  $37^\circ\text{C}$  en agitación.

## **8.9. Análisis Bioinformáticos**

El análisis filogenético fue realizado utilizando el software MEGA6 <https://www.megasoftware.net/> (113), donde la historia evolutiva se infirió utilizando el método de Neighbor-Joining (114), el bootstrap se infirió a partir de 1000 réplicas, y las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de corrección de Poisson (115). Los IDs de las secuencias utilizadas para la construcción del árbol filogenético de las lisozimas están indicadas en el **Apéndice 13.12**, los IDs de secuencias del árbol de las cecropinas en el

**Apéndice 13.13**, y los IDS de las secuencias para el alineamiento de las secuencias de los ortólogos de AALB006666 están en el **Apéndice 13.14**.

Los alineamientos de las secuencias de las proteínas de lisozima, cecropinas y los ortólogos de AALB006666 fueron realizados con el algoritmo Muscle en el software Jalview <https://www.jalview.org/> (116), y fueron visualizados en el servidor ESPript 3 <http://espript.ibcp.fr> (117).

Las estructuras terciarias de albLys c-1, Cec1, y AALB006666 fueron obtenidas por modelado por homología utilizando el servidor I-TASSER (118), y comparadas con el mejor homologo estructural de la base de datos. Los modelos obtenidos fueron visualizados y analizados con el software UCSF Chimera <http://www.cgl.ucsf.edu/quimera/> (119).

#### **8.10. Análisis estadístico**

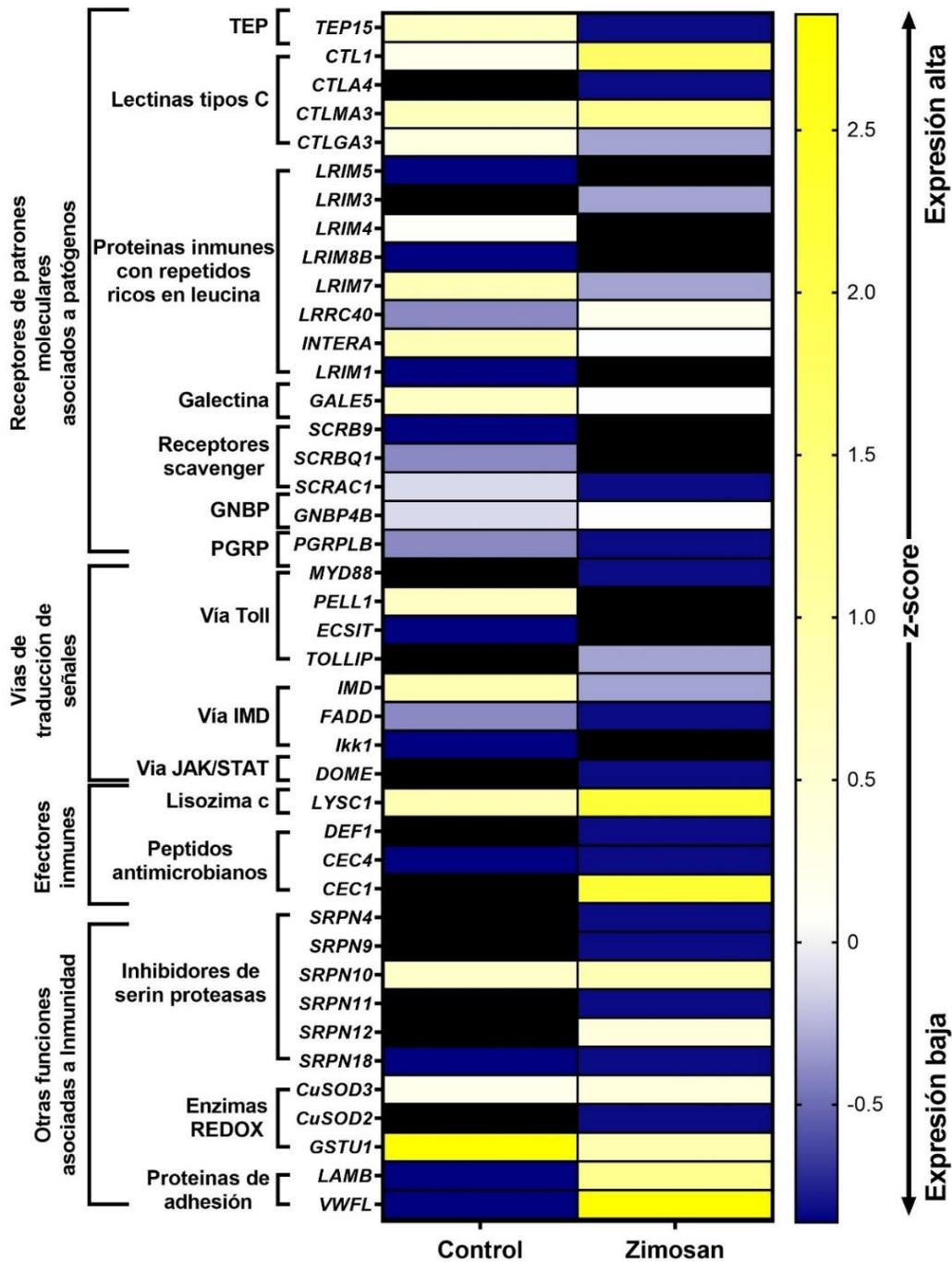
Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el software GraphPad Prism versión 5.0 para el sistema operativo Windows. Los valores de los resultados están expresados como valores del promedio  $\pm$  s.e.m. (error estándar de la mediana por sus siglas en ingles). Diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) fueron obtenidos con One way ANOVA seguido de una prueba de Tukey.

## 9. Resultados

### 9.1. Caracterización del perfil transcripcional del corazón de *An. albimanus*

Recientemente en nuestro grupo de investigación fue obtenido un transcriptoma de corazones de mosquitos retados con zimosan ( $\beta$ 1, 3-glucano, componente principal de las lavaduras) (120). El ensamble y los datos fueron procesados por el Dr. Jesús Martínez Barnetche del CISEI-INSP; obteniendo dos bibliotecas, la primera fue obtenida de corazones de mosquitos inyectados con medio RPMI [mosquitos control (vehículo + daño)], y la segunda de corazones de mosquitos retados con zimosan [mosquitos retados (RPMI + zimosan)]. En la biblioteca control se observó la expresión 1842 genes, y en la biblioteca de corazones de mosquitos retados se observaron 2088 genes. Los datos obtenidos de las bibliotecas se expresan en número de lecturas de cada gen por biblioteca, de los cuales se obtuvieron los valores de z-score siguiendo el protocolo de Cheadle, et al (121). Los valores del z-score obtenidos indican la abundancia relativa de cada transcrito en cada una de las bibliotecas con respecto a la media de expresión de todos los genes de una biblioteca en particular. Por lo cual, cuando un valor de z-score es positivo indica una mayor abundancias de ese transcrito, y cuando el valor es negativo indica una menor abundancia del transcrito.

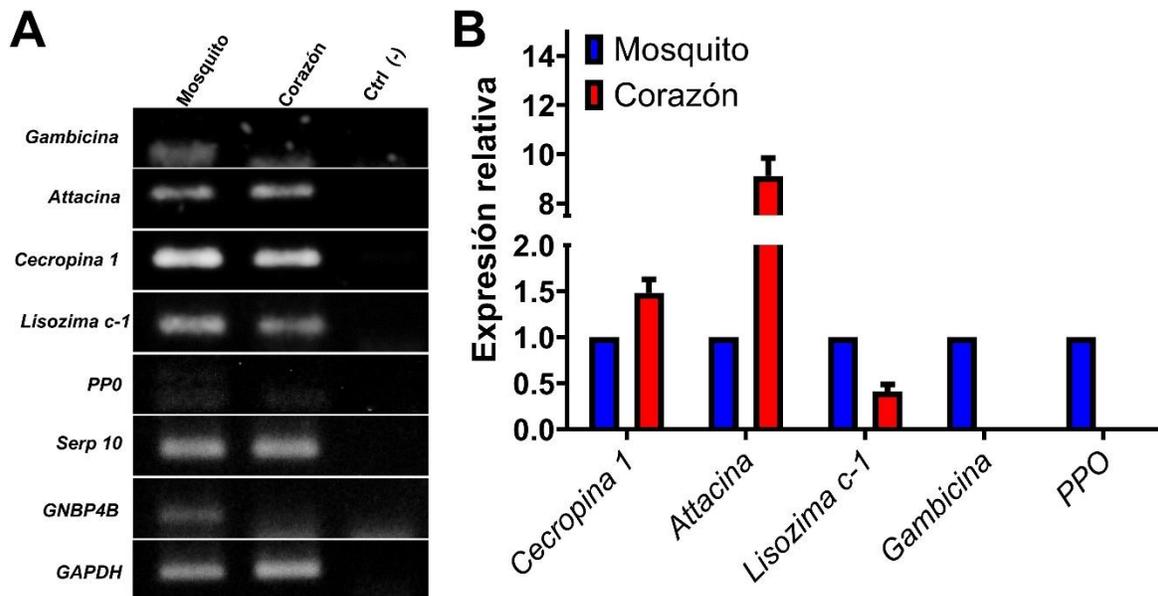
Debido a que el objetivo de este estudio es demostrar que el corazón de los mosquitos es un órgano inmunocompetente, fue realizada una búsqueda de genes relacionados a inmunidad. En esta búsqueda, fueron encontrados 42 genes relacionados con inmunidad (IDs en el **Apéndice 13.15**), los cuales fueron organizados en 4 categorías: 1) Receptores de patrones moleculares asociados a patógenos, 2) Vías de traducción de señales, 3) Efectores inmunes, y 4) Otras funciones asociadas a inmunidad (**Figura 5**). De manera interesante, 19 genes pertenecen a la categoría uno; 8 de ellos son de proteínas inmunes con repetidos ricos en leucinas, sin embargo, también se encontraron otras proteínas de reconocimiento como TEP15, Galectina 5, receptores scavenger, GGBP4B y PGRPLB, sugiriendo que las células del corazón posiblemente tienen la capacidad de reconocer una importante variedad de patógenos. Por otro lado, fueron encontrados genes pertenecientes a las tres principales vías de señalización que regulan la respuesta inmune: TOLL, IMD y JAK/STAT, sugiriendo que el corazón tiene los componentes necesarios para controlar diferentes tipos de respuesta según el estímulo.



**Figura 5. Heatmap de genes relacionados a inmunidad identificados en el transcriptoma del corazón de *An. albimanus* después de un reto inmune con zimosan.** Los valores representados en el heatmap están expresados en valores de z-score. El color amarillo representa genes con una alta expresión (z-score >0). En color blanco se representan genes con una expresión promedio (z-score=0). En color azul se marcan los genes con una baja expresión (z-score<0) y en negro genes no expresados o ausentes.

Adicionalmente, se encontró un gen de lisozima, dos genes de cecropina, y un gen de defensina, todos ellos efectores de la respuesta inmune. Por último, cabe mencionar que también se observó la presencia de genes cuyas funciones están indirectamente relacionadas con la respuesta inmune, como las Serpinas (reguladores de cascadas de señalización), Superóxido dismutasas y Glutación S transferasa (Reguladores de especies reactivas de oxígeno), y proteínas de adhesión como la laminina y un gene con un dominio similar al factor de Von Willebram relacionado a procesos de coagulación y adhesión. En conjunto, todos estos genes nos sugieren que el corazón de *An. albimanus* contiene todos los elementos necesarios para iniciar, regular y efectuar una respuesta inmune contra distintos patógenos. El análisis del transcriptoma mostró que el corazón de los mosquitos expresa distintos genes relacionados a la respuesta inmune, de los cuales se decidió validar solo algunos de las bases de datos obtenidas. La hipótesis sugerida en este trabajo es que los genes de inmunidad en el corazón de los mosquitos pueden ser sintetizados por las CPs, debido a que varios reportes demuestran la presencia de algunos genes de inmunidad en ellas (88,90,92,94). En trabajos previos, todos estos genes fueron buscados e identificados en hemocitos, sin embargo, también fueron encontrados en las CPs, lo que solo fue atribuido a su capacidad filtradora. La *serpina10* (*SRPN10*) es el único gen del cual se ha confirmado su expresión en CPs de *An. stephensi* (89), por lo que en el presente trabajo se decidió utilizar a la *SRPN10* como un gen control de la expresión de genes en el corazón. Aunado a lo anterior, se ha evidenciado que algunos hemocitos se encuentran interactuando con el corazón de *An. gambiae* (96,97), los cuales pueden expresar los genes a evaluar (122,123). Debido a lo anterior *PPO1* fue utilizada como un marcador de hemocitos, los cuales son los únicos productores de *PPO* (55,57) y es uno de los transcritos más abundantes en estas células (122). Dado que el interés de este estudio está enfocado en demostrar que las CPs pueden presentar una respuesta inmune, se decidió evaluar la expresión de *cecropina1* (*CEC1*) y *lisozima c-1* (*LYSC1*) debido a que en el transcriptoma se encuentran altamente expresados; adicionalmente se evaluó la expresión de *attacina* (*ATTA*) y *gambicina* (*GAM*), dos péptidos antimicrobianos que parecen participar en la respuesta inmune de *An. albimanus* bajo diferentes condiciones (31,124). Por último, se evaluó la expresión de *GNBP4B* ya que es uno de los receptores de  $\beta$ -1,3-glucano y es uno de los PRRs que participan en el reconocimiento de diferentes patógenos incluyendo a *Plasmodium* (125).

La expresión de los genes seleccionados fue evaluada por RT-PCR punto final y cuantitativa (qRT-PCR) en corazones de mosquitos sin tratar, en donde el control positivo fueron mosquitos hembra completos, ya que contienen todos los tipos celulares y por consiguiente expresan todos los genes que se evaluaron. Los resultados obtenidos por RT-PCR (**Figura 6A**), indican que el corazón de los mosquitos expresa *ATTA*, *CECI*, *LYSCI*. En adición, *SRPN10* (control positivo de CPs) también se encontró expresada y *PPO* (control positivo de hemocitos) ausente, sugiriendo que la expresión de estos genes es propia del corazón de los mosquitos y no de los hemocitos.



**Figura 6. El corazón de *An. albimanus* expresa genes que participan en inmunidad. A)** Determinación de la expresión de genes asociados a inmunidad en corazones de mosquito por RT-PCR punto final. **B)** Determinación de la expresión de genes efectores de la respuesta inmune en corazones de mosquitos por qRT-PCR. Los resultados fueron obtenidos de tres experimentos independientes, GAPDH fue utilizado como gene de referencia y PPO como control de presencia de hemocitos.

De manera interesante, la expresión de *GAM* y *GNBP4B* no fue observada, sugiriendo que posiblemente el corazón de los mosquitos expresa solo algunos genes de la respuesta inmune. A pesar de los resultados obtenidos por RT-PCR punto final (**Figura 6A**), se decidió evaluar la expresión de *CECI*, *ATTA*, *LYSCI*, *GAM* y *PPO* por qRT-PCR, ya que es una técnica alta

sensibilidad que permite detectar genes de baja expresión (126). Los resultados obtenidos por qRT-PCR (**Figura 6B**), demuestran que *CECI* y *ATTA* se expresan aproximadamente 1.5 y 9 veces más en el corazón que en el control respectivamente; *LYSCI* se expresa 0.5 veces menos, y *GAM* al igual que *PPO* se encuentran nuevamente ausentes. Estos resultados sugieren fuertemente que el corazón de *An. albimanus* expresa *CECI*, *ATTA* y *LYSCI* de manera constitutiva y autónoma.

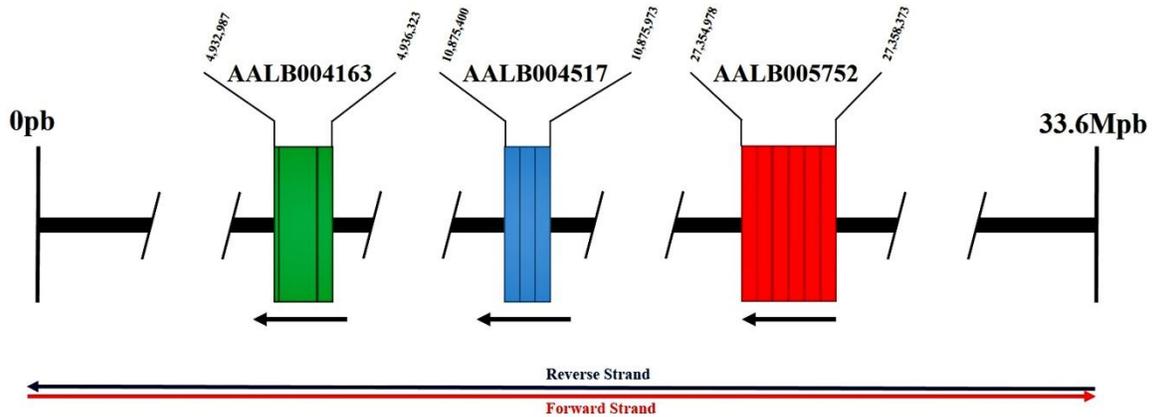
## **9.2. Análisis de las secuencias de los genes de lisozima y cecropina de *An. albimanus***

Los resultados mostrados anteriormente sugieren que el corazón de *An. albimanus* podría expresar *lisozima c-1*, *Cecropina 1*. Sin embargo, es importante mencionar que el análisis del transcriptoma y la asignación de nombres de los genes fue hecho usando como referencias la base de datos de *An. gambiae* (127), debido a que fue el único genoma de mosquitos disponible por más de una década. No obstante, recientemente se han secuenciado los genomas de 16 mosquitos del género *Anopheles* (incluyendo *An. albimanus*) (128); haciendo posible comparar las diferencias que existen entre las distintas especies de *Anopheles*, así como también de sus particularidades. Tomando ventaja de las nuevas bases de datos, se decidió realizar un análisis bioinformático de las lisozimas tipo c y cecropinas de *An. albimanus* para validar la secuencia del gen, buscar sus ortólogos y por consiguiente su posible participación en la respuesta inmune.

### **9.2.1. Lisozimas tipo c de *An. albimanus***

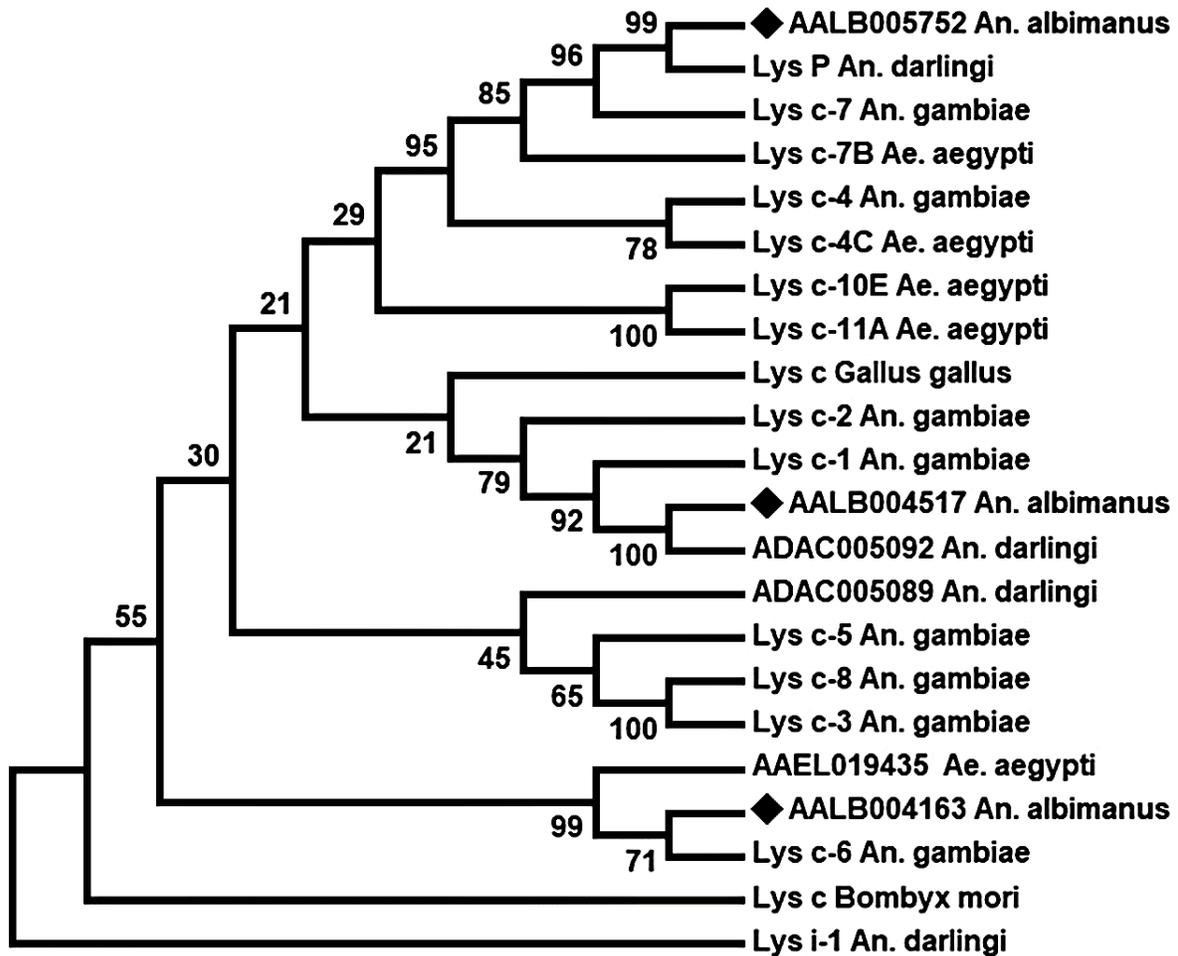
Las lisozimas son proteínas antimicrobianas fundamentales para la respuesta inmune innata, son tan importante que están presentes en todos los seres vivos del reino animal, en donde pueden desempeñar distintas funciones (129). Dicha diversificación ha provocado que una misma especie pueda tener varios genes de lisozima con funciones específicas. En *An. gambiae* se han identificado 8 lisozimas tipo c, de las cuales solo se conoce la función de la lisozima c-1, y del resto se desconocen sus funciones (130). Por otro lado, tras la secuenciación del genoma de *An. albimanus* se lograron identificar tres genes de lisozima tipo c (128), con VB<sub>ID</sub> AALB004163, AALB004517, AALB005752. Estos genes, se encuentran posicionados en tres loci separados por varios Mpb (**Figura 7**), lo cual sugiere

que pueden estar regulados de manera distinta, y por consiguiente desempeñar funciones diferentes.



**Figura 7. Organización genómica de las lisozimas tipo c en *An. albimanus*.** La familia de las lisozimas tipo c de *An. albimanus* comprende tres genes putativos, los cuales tienen el ID<sub>VB</sub> AALB004163, AALB004517, AALB005752. Las secuencias de los genes se encuentran localizadas a lo largo del cromosoma 3L, en la posición indicada en la parte superior de los bloques que representan los genes.

Para conocer un poco más acerca de las posibles funciones que pueden desempeñar estos genes se realizó un análisis filogenético usando secuencias de lisozimas de *An. gambiae*, *An. darlingi*, *Ae. aegypti* y *Bombyx mori* que previamente han sido caracterizadas, con la finalidad de encontrar ortólogos cuyas funciones se conocen. Los resultados demuestran que las lisozimas se agrupan en tres clados diferentes (**Figura 8**), por un lado, AALB004163 se agrupa con la lisozima c-6 de *An. gambiae*, AALB005752 se agrupa con la lisozima c-7 de *An. gambiae* y la lisozima c-7B de *Ae. aegypti*, y AALB004517 se agrupa con las lisozimas c-1 y c2 de *An. gambiae* y con la lisozima ADAC005092 de *An. darlingi*. Este resultado sugiere que el gen con ID<sub>VB</sub> AALB004163 podría ser la lisozima c-6 de *An. albimanus*, el gen ID<sub>VB</sub> AALB005752 la lisozima c-7 y el gen ID<sub>VB</sub> AALB004517 la lisozima c-1.



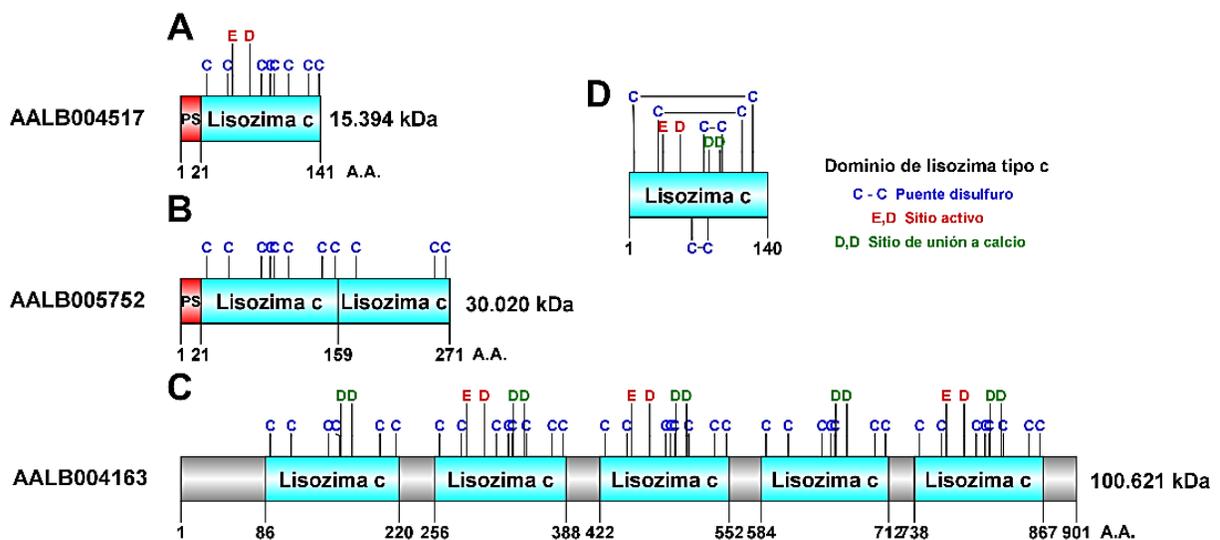
**Figura 8. Análisis filogenético de las lisozimas de *An. albimanus*.** Árbol filogenético de lisozimas de cuatro mosquitos (*An. gambiae*, *An. darlingi*, *An. albimanus* y *Ae. aegypti*) y *B. mori*. Los diamantes negros indican la *An. albimanus*, las secuencias de lisozimas, y los números junto a las ramas indican el valor de arranque.

Posteriormente, fue realizado un análisis de los dominios de las proteínas putativas de estos genes, el cual muestra diferencias notables entre ellas (**Figura 9**). Primero AALB004517, AALB005752, y AALB004163 tienen un peso aproximado de 15, 30 y 100 kDa respectivamente. Esta diferencia se debe en primer lugar al largo de la secuencia de aminoácidos, pero de manera muy importante al número de dominios de lisozima que contiene cada proteína. AALB004517 contiene solo un dominio de lisozima, AALB005752 tiene dos dominios y AALB004163 tiene cinco. La razón por la cual estas lisozimas pueden tener más de un dominio es desconocida, sin embargo, los dominios de todas ellas contienen diferencias puntuales. Un dominio común de lisozima tipo c (**Figura 9D**) contiene 8 residuos

de cisteína que forman 4 puentes disulfuro, los cuales son necesarios para el correcto plegamiento y funcionamiento de la proteína (129). Además, el centro catalítico contiene un residuo de ácido glutámico (Glu) y uno de ácido aspártico (Asp) que son fundamentales para la actividad de muramidasa, los cuales en insectos están en la posición Glu32 y Asp49 (131). Por otro lado, algunas lisozimas presentan un sitio de unión a calcio, el cual les proporciona mayor estabilidad (132–134). La proteína del gen ID<sub>VB</sub> AALB004517 tiene un dominio clásico (**Figura 9A**), con los 8 residuos de cisteínas y los residuos Glu32 y Asp49, sugiriendo que esta proteína tiene actividad de muramidasa; además esta proteína tiene una secuencia de péptido señal, indicando que podría ser secretada. Por otro lado, la proteína del gen ID<sub>VB</sub> AALB005752 (**Figura 9B**) contiene los 8 residuos de cisteína en uno de sus dominios, y en el segundo dominio solo tiene 3; esta proteína carece de Glu32 y Asp49, sugiriendo que posiblemente no posee la actividad de muramidasa, pero también posee una secuencia de péptido señal, indicando que puede ser secretada. Por último, la proteína del gen ID<sub>VB</sub> AALB004163 (**Figura 9C**) tiene el dominio 2, 3 y 5 completos, es decir, cada uno con 8 residuos de cisteína y los dos residuos de Glu32 y Asp49. Adicionalmente, todos los dominios de esta proteína contienen dos residuos de Asp85 y Asp90/91, los cuales forman un sitio de unión a calcio. Por último, cabe mencionar que esta proteína carece de péptido señal, indicando que no se secreta y que puede estar jugando una función dentro de la célula.

De manera interesante, el gen ID<sub>VB</sub> AALB004517 fue el gen de lisozima encontrado en el transcriptoma de corazones de mosquito. Este gen en el análisis filogenético se agrupó con los genes ID<sub>VB</sub> ADA005092 de *An. darlingi*, y las lisozimas *c-1* y *c-2* de *An. gambiae* (**Figura 8**), los cuales han sido descritos como importante en la respuesta inmune de los mosquitos (52,130,135). Estos datos sugieren que AALB004517 puede estar jugando un papel importante en la respuesta inmunitaria. Sin embargo, para fortalecer esta hipótesis se hizo un alineamiento usando las secuencias de aminoácidos de estos genes (**Figura 10A**). El resultado muestra que los genes son altamente conservados, dado que presentan un porcentaje de identidad de 72.34% para el caso de la lisozima *c-1* de *An. gambiae*, de 92.36% con ADA005092 la cual es la lisozima *c-1* de *An. darlingi*, y un 57.97% con la lisozima *c-2* de *An. gambiae*. En adición, se encontró que todas estas lisozimas poseen péptido señal, los 8 residuos de cisteína necesarios para el correcto plegamiento de las lisozimas tipo *c*, y los dos residuos de Glu32 y Asp49 del centro catalítico, sugiriendo que todas ellas pueden jugar un

papel similar (en inmunidad) en los mosquitos. Por otro lado, se obtuvo la estructura terciaria de la proteína del gen ID<sub>VB</sub> AALB004517 por modelado por homología usando el servido I-TASSER, en el cual se puede observar que la estructura terciaria es altamente conservada. Los residuos de Glu32 y Asp49 se encuentran en la misma posición que los del centro catalítico de la lisozima c de *Bombyx mori*, la cual juega un papel muy importante en la inmunidad como un factor lítico (131). Lo cual indica que la proteína del gen ID<sub>VB</sub> AALB004517 posee la función de muramidasa. Todos estos datos apuntan fuertemente que el gen con ID<sub>VB</sub> AALB004517 es el gen de *lisozima c-1* de *An. albimanus*, el cual posiblemente juega un papel importante en la inmunidad como un factor lítico al igual que sus ortólogos, por lo cual a partir de aquí se mencionará al gen con ID<sub>VB</sub> AALB004517 como *albLys c-1*.



**Figura 9. Análisis de los dominios de las lisozimas de *An. albimanus*.** Esquemas de las lisozimas de *An. albimanus* en donde se marcan los 8 residuos de cisteínas (c azules), ácido glutámico 32 (E roja), ácido aspártico 49 (D roja), residuos de ácido aspártico del sitio de unión de calcio (D verde), y la péptido señal (PS-bloque rojo). **A)** Proteína del gen con ID<sub>VB</sub> AALB004517. **B)** Proteína del gen con ID<sub>VB</sub> AALB005752. **C)** Proteína del gen con ID<sub>VB</sub> AALB004163. **D)** Dominio de la familia de la lisozimas.



### 9.2.2. Las cecropinas de *An. albimanus*

Una de las familias de los genes efectores de inmunidad más representativas del transcriptoma de los corazones de mosquitos fue la de las cecropinas, en donde se encontró la expresión de tres genes cuyos ortólogos son *Cec1*, *Cec3*, y *Cec4* de *An. gambiae*. Sin embargo, en un primer análisis del transcriptoma solo se encontraron los genes *Cec1* y *Cec4*, debido a que el gen *Cec3* no existe en las bases de datos de VectorBase, por lo cual no se pudo obtener un GO term y por consiguiente identificar un ortólogo. No obstante, en trabajos previos ha sido reportada la existencia y presencia del gen *Cec3* en *An. albimanus* (31,46,136), por lo cual se decidió buscar la secuencia codificante del gen *Cec3* de *An. albimanus* usando como templatado el marco abierto de lectura del gen *Cec3* de *An. gambiae*. Interesantemente, se encontró que el gen con ID<sub>VB</sub> es AALB006949 contiene la secuencia codificante de *Cec3*, sin embargo, un posible error en la predicción de los codones de inicio y termino de la transcripción recorre el marco abierto de lectura, por lo cual, se obtiene una secuencia alterna y errónea del producto del gen (**Figura 11**). Por otro lado, una diferencia interesante entre *Cec3* de *An. albimanus* y *An. gambiae* es el codón de paro de la transcripción los cuales son UAA y UAG respectivamente, siendo en el primer caso un codón raro, y posiblemente la razón por la cual existe un error en la predicción del gen.

En VectorBase solo se encuentran tres genes putativos de cecropina en *An. albimanus*, *Cec1* (ID<sub>VB</sub>: AALB006948), *Cec2* (ID<sub>VB</sub>: AALB014625), *Cec4* (ID<sub>VB</sub>: AALB005383). Sin embargo, con la identificación del error del gen *Cec3* (ID<sub>VB</sub>: AALB006949) de *An. albimanus*, se puede sugerir que al igual que *An. gambiae* (128), *An. albimanus* tiene 4 cecropinas. En *An. gambiae* y *Ae. albopictus*, a pesar de ser especies de mosquitos distantes las cecropinas se encuentran organizadas de manera similar (en tándem) (137,138). Un análisis de la localización de las secuencias de los 4 genes de cecropinas en el genoma de *An. albimanus*, muestra que al igual que en *An. gambiae* (137), *Cec1*, *Cec2* y *Cec3* se encuentran organizadas en tándem en el cromosoma X (**Figura 12**), y *Cec4* se encuentra en el cromosoma 3L. Sin embargo, en *An. gambiae* *Cec1* y *Cec3* ambas se encuentran en la cadena forward y *Cec2* se encuentra en la cadena reverse; en *An. albimanus* *Cec1* y *Cec2* se encuentran en la cadena forward y *Cec3* en la cadena reverse (**Figura 12**). Estos resultados

sugieren que posiblemente las cecropinas de *An. albimanus* se regulan de manera similar que en *An. gambiae* y *Ae. albopictus*, sin embargo, más estudios son necesarios para demostrarlo.

Las cecropinas son péptidos antimicrobianos altamente conservados en insectos, sin embargo, presentan características puntuales que las han diversificado, permitiendo que cada especie presente múltiples genes de cecropinas con especificidades y funciones diferentes (139). Para poder pronosticar las posibles funciones de cada una de las cecropinas de *An. albimanus*, se hizo un árbol filogenético usando secuencias de cecropinas de *An. gambiae*, *An. stephensi*, *Ae. aegypti* y *H. Cecropia*, las cuales previamente han sido reportadas (137,140–142). En la **Figura 13** se puede observar dos grande clados en el árbol filogenético: las cecropinas de *Hy. cecropia*, y las cecropinas de mosquitos, esto debido a la distancia evolutiva que existe entre ambos. Por otro lado, las secuencias de *An. albimanus* se agrupan en el clado perteneciente a cada uno de sus respectivos ortólogos de *An. gambiae*, *An. stephensi*, y *Ae. aegypti*, en los que se observa que la cercanía filogenética es más estrecha entre anofelinos. Sin embargo, a pesar de la distribución de las cecropinas en los diferentes clados del árbol filogenético, un alineamiento de las secuencias muestra un alto grado de conservación que existe entre ellas, que incrementa entre los miembros de un mismo tipo de cecropinas (**Figura 14A**). Este grado de conservación les permite mantener la estructura terciaria  $\alpha$ -helicoidal única de las cecropinas (**Figura 14B, C**), y por consiguiente realizar las funciones propias de estos AMPs.

Los resultados presentados en esta sección sugieren que todas las cecropinas incluyendo las de *An. albimanus* probablemente tengan funciones similares. Posiblemente, cada una de las cecropinas de *An. albimanus* tenga cierto grado de especificidad hacia un grupo de bacterias en particular, sin embargo, todas juegan un papel en la respuesta inmune humoral del mosquito.

```

AGAP000694-RA/1-183 .....
AALB006949-RA/1-1003 CGCACATACATGACATTAGGCCCCGTGTAACCTACTACGGGCTTCTATCTTTTTAACTA
consensus>70
.....

AGAP000694-RA/1-183 .....
AALB006949-RA/1-1003 AGAAACATAAAAAAGGGGAGCTACGACAAAGAGGTAGAAGAAAAACAAGCTGGAACAATAG
consensus>70
.....

AGAP000694-RA/1-183 .....
AALB006949-RA/1-1003 TTGATTGACCTGATATGTTCCCTTAGAAGAGGGCAAACAGTACGGCTCAAGTGTTCATACA
consensus>70
.....
AALB006949-RA (VB) →
Inicio
.....

AGAP000694-RA/1-183 .....
AALB006949-RA/1-1003 CTTCATACACATATACTCCCGTGCAGCATCCCACCGAATTGAAATGAAGAGAAGGGGAGG
consensus>70
.....

AGAP000694-RA/1-183 .....
AALB006949-RA/1-1003 AAGAAAAATGTAGCTCGTAACTACACTGCAATTGGCATGTTCCGGTTCCTCGCCGCTCCGGT
consensus>70
.....

AGAP000694-RA/1-183 .....
AALB006949-RA/1-1003 AATCCCCTCGACATCGTTTCGATCGCCGGGAGCTCCTAGGGCTGCGTTCGCGCTTCGTAC
consensus>70
.....

AGAP000694-RA/1-183 .....
AALB006949-RA/1-1003 GTCTCGGGAATTTTTCAGATCAGCAGCATCAGGCGGGGAATCCCAACAAAAAAAACCTTC
consensus>70
.....

AGAP000694-RA/1-183 .....
AALB006949-RA/1-1003 ACTATTCCATGTGTATGTGTGATCCAGAGGGAAGTGCCTTTAAAAAGCTTCAGTCCGACG
consensus>70
.....

AGAP000694-RA/1-183 .....
AALB006949-RA/1-1003 GTTCCCGGGCATCAGTTTGCTCGCTAGTTTCGCATCCAGCAACCCGCATCCAGGGCCAGGA
consensus>70
.....
Cec3 →
Termino AALB006949-RA (VB)
AGAP000694-RA/1-183 .....
AALB006949-RA/1-1003 AACCCGCACGAACCTAAAGACGACGATGAACTTCACGAAGCTTTCATCTGGTGGCGAT
consensus>70
.....
Inicio
AGAP000694-RA/1-183 .....
AALB006949-RA/1-1003 GCGGTCTGTGTCGTTGGGCTACAGCCAGTCCGATGCTGCGCCGCGGTGGAAGTTGCGG
consensus>70
.....
AGAP000694-RA/1-183 .....
AALB006949-RA/1-1003 AAACGACTTGAAAGCTGGTCCGAAATGTGTTCCGGCGGCAGAAAGGATGCCCAGTC
consensus>70
.....
Termino Cec3
AGAP000694-RA/1-183 .....
AALB006949-RA/1-1003 CATCGCTATTTTTTCGTGCCTCATCTTATCCCTGCTGTGATCAACGCACCATGAGTACGGT
consensus>70
.....

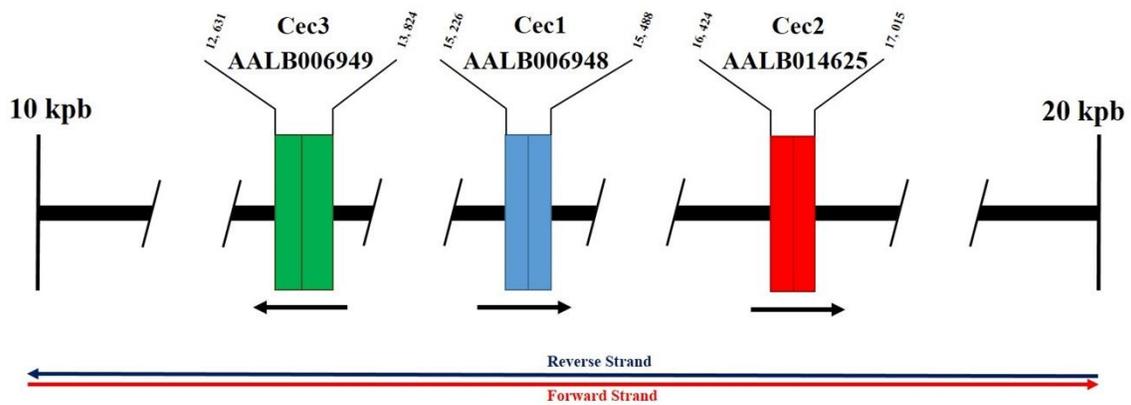
AGAP000694-RA/1-183 .....
AALB006949-RA/1-1003 CGCCATTACTGATCATCGTTGAACCTACAACATTC AATTCTCTCTGACACACACTAA
consensus>70
.....

AGAP000694-RA/1-183 .....
AALB006949-RA/1-1003 CTGTGTTTAAATGTGCTTGCTGTGTATGTGTGGATGTATGTAGTTTTTAAACTTACG
consensus>70
.....

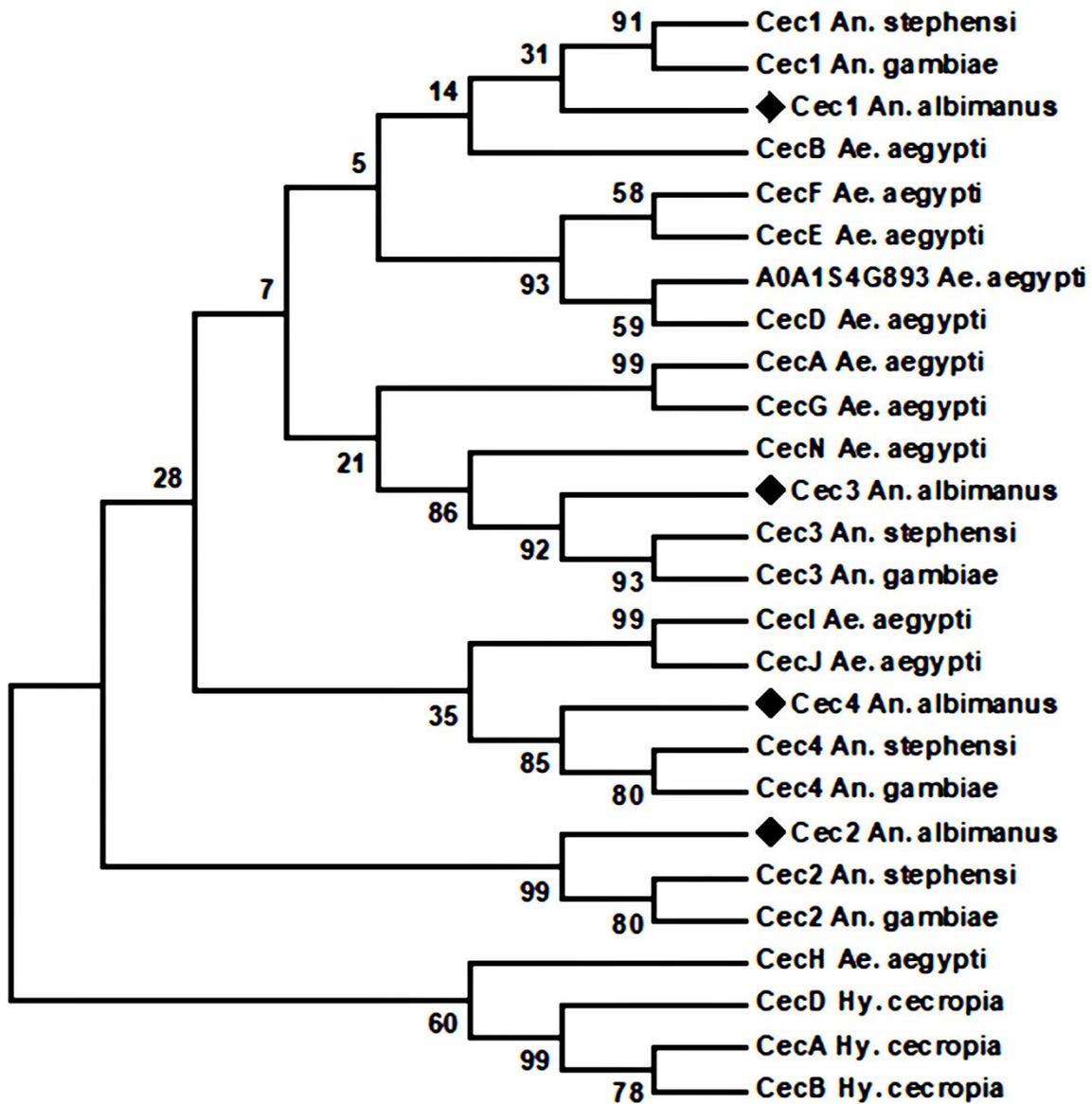
AGAP000694-RA/1-183 .....
AALB006949-RA/1-1003 ATTAAGTCAATAAACGCCCTACCAGGCTCTCCTTTTTGCAAGTA
consensus>70
.....

```

**Figura 11.** El gen con ID<sub>VB</sub> AALB006949 codifica la cecropina 3 de *An. albimanus*. Alineamiento de la secuencia del mRNA del gen *Cec3* de *An. gambiae* (AGAP000694) con la secuencia del gen con ID<sub>VB</sub> AALB006949 de *An. albimanus*. Las secuencias marcadas con un rectángulo rojo indican los codones de inicio y de término de la secuencia codificante putativa del VB. La región que es homóloga en las secuencias está marcada en rojo y letras blancas, en donde la marca verde indica un codón de inicio, y en amarillo un codón de termino, el cual es un codón de término raro en la secuencia de *An. albimanus*. Este cambio, posiblemente es la razón de una predicción errónea por parte del algoritmo de VB, sugiriendo que el gen AALB006949 contiene la secuencia codificante de la cecropina 3 de *An. albimanus*.



**Figura 12. Organización genómica de tres cecropinas de *An. albimanus*.** Los genes de cecropina *Cec1* (ID<sub>VB</sub>: AALB006948), *Cec2* (ID<sub>VB</sub>: AALB014625), *Cec3* (ID<sub>VB</sub>: AALB006949) se encuentran localizados en tándem, en el cromosoma X. La posición de cada gen está indicada en los números que flanquean los bloques que representan los genes.



**Figura 13. Análisis filogenético de las cecropinas de *An. albimanus*.** Análisis filogenético de las secuencias de las cecropinas de 4 mosquitos (*An. albimanus*, *An. gambiae*, *An. stephensi*, *Ae. aegypti*) y *Hy. cecropia*. Las cecropinas de *An. albimanus* (marcadas con rombos negros) se encuentran localizadas en 4 clados diferentes agrupadas con sus respectivos ortólogos.

**A**

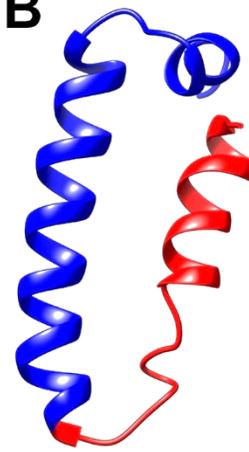
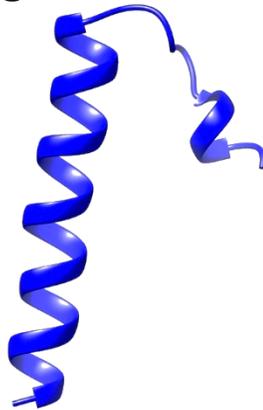
	1	10	20	30	40	50						
Cec2_An_stephensi	MNF	KLFLVALVLM	AVCLG	QS...	EGRRF	KKFLKK...	VEG	AGRRV	AGAA	QKG	LP	LA
Cec2_An_gambiae	MNF	KLFLVALVLM	AAFLG	QT...	EGRRF	KKFLKK...	VEG	AGRRV	ANAA	QKG	LP	LA
Cec2_An_albimanus	MQL	KVILLVALVLM	ATLGG	QT...	EARRF	KKFLKK...	VEG	AGRRV	ITNA	AKG	LP	VV
CecA_Hy_cecropia	MNFS	RIFFFVFAC	LTAAMV	NA...	APEPK	KKLKK...	IEK	VGQ	NI	RDGI	IK	KA
CecB_Hy_cecropia	MNFS	RIFFFVFAL	VLA	STV	SA...	APEPK	KKLKK...	IEK	VGQ	NI	RDGI	IK
CecD_Hy_cecropia	MNFT	KILFFV	VACV	FAMRT	VSA...	AP...	WNPF	KE	LEK	VGQ	VRD	AVISA
CecH_Ae_aegypti	MNFT	KLLLVV	MLAAV	LFG	SA...	EAGKL	KKI	GKK...	VEK	TG	KH	VANAA
CecI_Ae_aegypti	MNF	KRLFFV	VFAV	LVLTA	QT...	EAGKL	KKL	GKK...	IEK	AG	KN	VVH
CecJ_Ae_aegypti	MNF	KRLFFV	VFAV	LVLTA	QT...	EAGKL	KKL	GKK...	IEK	AG	KN	VVH
Cec4_An_stephensi	MNLS	KLFI	VLLGL	LLLF	FGG	QT...	EAGHL	KKF	GKK...	LEK	TG	KN
Cec4_An_gambiae	MNV	SKLFI	VLLA	TLLLF	FGG	QA...	EAGHL	KKF	GKK...	IEK	VG	KN
Cec4_An_albimanus	MNLT	KLFI	VLLA	VAAV	LFGG	QA...	EAGHL	KKF	GKK...	LEK	VG	KN
Cec1_An_stephensi	MNFN	KIFV	VVLA	VLLLC	SQT	...	EAGRL	KKL	GKK...	IEG	VG	KN
Cec1_An_gambiae	MNFS	KIFV	VVLA	VLLLC	SQT	...	EAGRL	KKL	GKK...	IEG	VG	KN
Cec1_An_albimanus	MNFN	KV	VLVV	VAAALL	V	GQT	...	DAGFL	KKL	GKK...	IEG	VG
CecB_Ae_aegypti	MNFN	KLFI	VILV	LAALL	L	GQT	...	EAGRL	KKL	GKK...	IEG	VG
CecF_Ae_aegypti	MNFN	KLFI	VILV	LAALL	L	GQT	...	EAGRL	KKL	GKK...	IEG	VG
CecE_Ae_aegypti	MNFS	KVFI	LVLLI	GLVLL	TGHT	...	EAGGL	KKL	GKK...	LEG	VG	KN
A0A1S4G893_Ae_aegypti	MNFN	KLFI	VILV	LAALL	L	GQT	...	EAGRL	KKL	GKK...	IEG	VG
CecD_Ae_aegypti	MNFT	KLFI	VILV	LAALL	L	GQT	...	EAGGL	KKL	GKK...	LEG	VG
CecA_Ae_aegypti	MNFT	KLFI	VILV	LAALL	L	GQT	...	EAGGL	KKL	GKK...	LEG	VG
CecG_Ae_aegypti	MNFT	KLFI	VILV	LAALL	L	GQT	...	EAGGL	KKL	GKK...	LEG	VG
Cec3_An_stephensi	MNFT	KLFI	VILV	LAALL	L	GQT	...	EAGGL	KKL	GKK...	LEG	VG
Cec3_An_gambiae	MNFT	KLFI	VILV	LAALL	L	GQT	...	EAGGL	KKL	GKK...	LEG	VG
Cec3_An_albimanus	MNFT	KLFI	VILV	LAALL	L	GQT	...	EAGGL	KKL	GKK...	LEG	VG
CecN_Ae_aegypti	MNFN	RILFI	VLA	VLLV	L	GQ	...	EAPRM	EI	GKR	...	REK
consensus>70	M#f	...f	.v	...l	l	...q	...	ea	...kk	.gKk	...	e

Peptido señal

Peptido maduro

Cec2_An_stephensi	IGV	KG	V	L	G	.....
Cec2_An_gambiae	AGV	KG	V	L	G	.....
Cec2_An_albimanus	AGV	KG	V	L	G	.....
CecA_Hy_cecropia	AVV	GQA	T	Q	IAK	G
CecB_Hy_cecropia	AVL	GEA	K	A	L	G
CecD_Hy_cecropia	ATVA	QA	T	A	L	AKG
CecH_Ae_aegypti	AGV	A	A	L	V	.....
CecI_Ae_aegypti	LGL	QQ	I	R	E	N
CecJ_Ae_aegypti	LGL	QQ	I	R	E	N
Cec4_An_stephensi	AGV	Q	D	L	R	E
Cec4_An_gambiae	QGI	Q	D	L	R	E
Cec4_An_albimanus	LGI	K	Q	L	G	Q
Cec1_An_stephensi	AGV	K	A	L	G	.....
Cec1_An_gambiae	AGV	K	A	L	G	.....
Cec1_An_albimanus	VG	V	K	A	L	G
CecB_Ae_aegypti	AGI	K	G	L	G	.....
CecF_Ae_aegypti	TGY	K	A	V	G	.....
CecE_Ae_aegypti	TGY	K	A	V	G	.....
A0A1S4G893_Ae_aegypti	VGI	K	A	V	G	.....
CecD_Ae_aegypti	VGI	K	A	V	G	.....
CecA_Ae_aegypti	AGA	K	A	L	G	.....
CecG_Ae_aegypti	AGA	K	A	L	G	.....
Cec3_An_stephensi	DGV	K	A	L	G	.....
Cec3_An_gambiae	AGY	K	A	L	G	.....
Cec3_An_albimanus	AGY	K	A	L	G	.....
CecN_Ae_aegypti	AGY	K	A	L	G	.....
consensus>70	.g	.....	.....	.....	.....	.....

Peptido maduro

**B****C**

**Figura 14. Análisis de la secuencia de Cec1 de *An. albimanus*.** A) Alineamiento de las secuencias de cecropina de 4 mosquitos y *Hy. cecropia*. Se puede apreciar un alto grado de conservación independientemente del tipo de cecropina y la especie. Sin embargo en los anofelinos Cec1 es altamente conservada. En todas las cecropinas la péptido señal (barra roja) es conservada tanto en secuencia como en tamaño. No obstante, a pesar de que la secuencia del péptido maduro es latamente conservada, la longitud varía entre cecropinas. B) Modelo de la estructura terciaria del precursor de Cec1. En rojo se marca la péptido señal. C) Estructura terciaria del péptido maduro de Cec1, en donde se puede observar la estructura característica de las cecropinas (dos hélices alfa separadas por un loop).

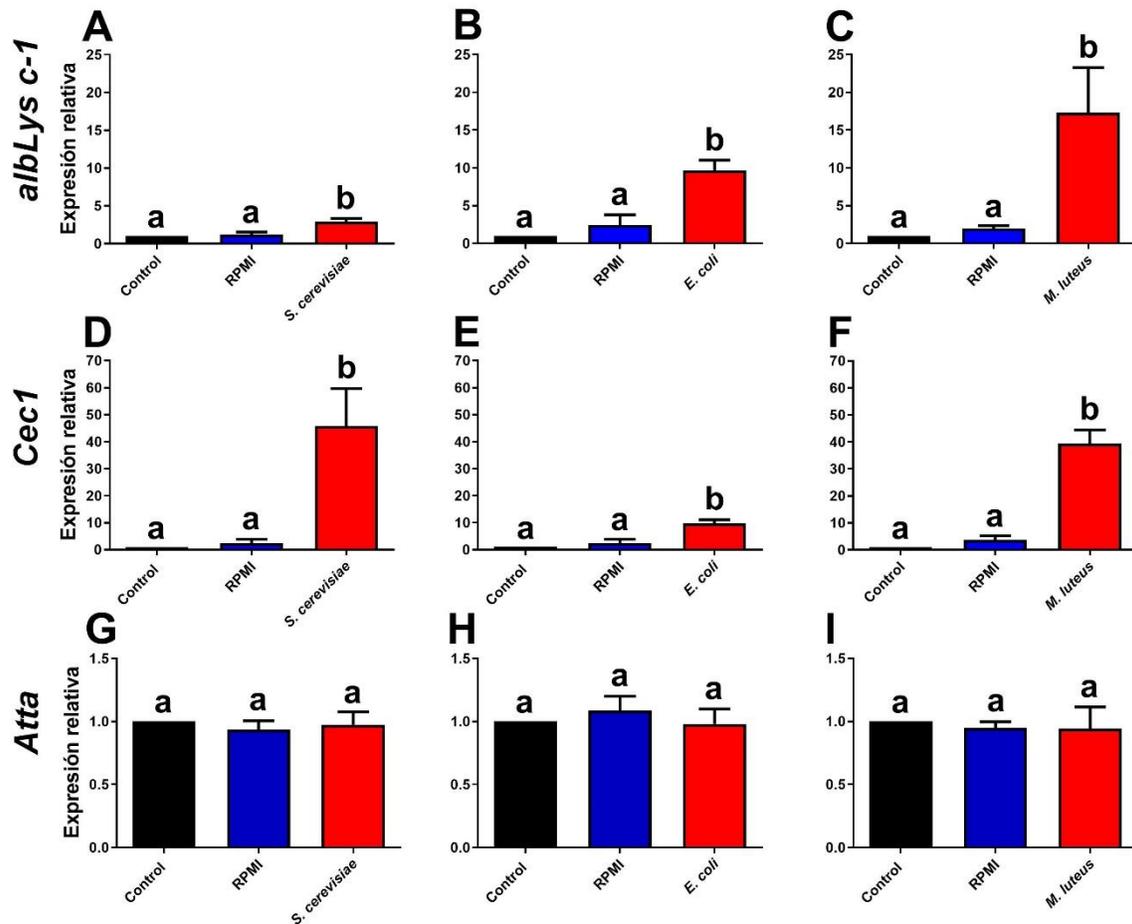
### 9.3. El corazón de *An. albimanus* responde ante un reto inmune

Previamente se ha evidenciado que el corazón de *An. albimanus* puede responder ante un reto inmune con zimosan, sin embargo, las evidencias se enfocan en ensayos histológicos y de actividad lítica (100). Por otro lado, la información obtenida del transcriptoma de corazones de mosquitos muestra que un gran número de genes asociados a inmunidad podrían expresarse en el corazón, no obstante, solo se decidió validar la expresión de *albLys c-1*, *Cec1* y *Atta*, debido a que juegan un papel directo en la eliminación de patógenos en el mosquito. Sin embargo, es importante conocer si estos genes pueden modificar su expresión ante un reto inmune en los corazones de mosquito, para conocer si el corazón tiene la capacidad de reconocer a un patógeno y desencadenar una respuesta inmune mediada por componentes humorales como los AMPs y lisozimas.

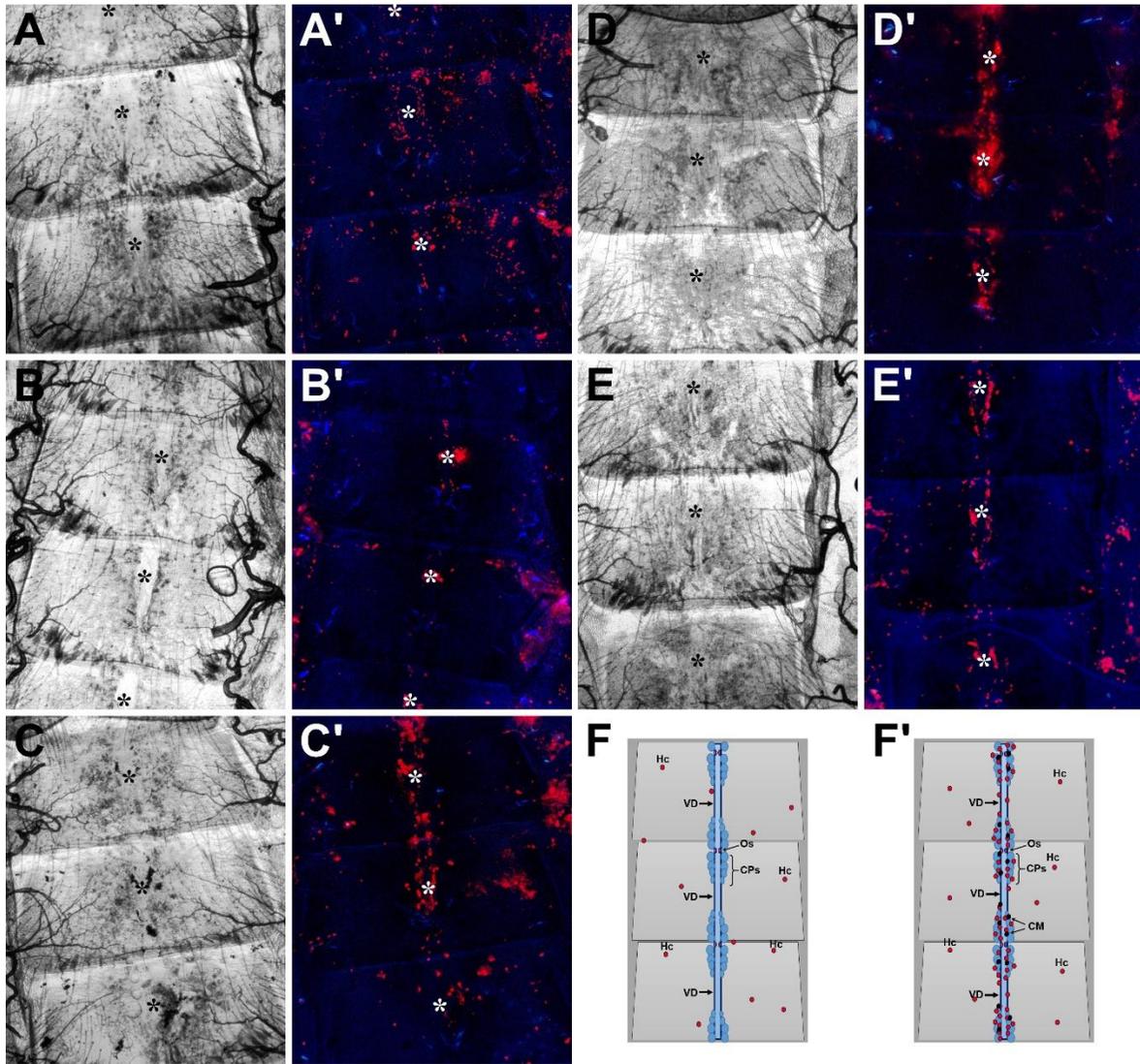
Para evaluar la capacidad respuesta del corazón de *An. albimanus*, los mosquitos fueron inyectados vía intra-hemocele con *M. luteus*, *E. coli* o *S. cerevisiae*, y la expresión de los genes se evaluó a las 12 h post-tratamiento en corazones aislados. En la **Figura 15** se puede observar un incremento notable en la expresión de *Cec1* y *albLys c-1* en los corazones de mosquitos retados con los diferentes organismos, no siendo así en los grupos control (sin inocular, inoculados con RPMI). Por otro lado, no se observó ningún cambio en la expresión de *Atta*, sugiriendo que posiblemente es un AMPs constitutivo de la respuesta inmunitaria, o que probablemente los microorganismos utilizados no son los adecuados para inducir la sobre-expresión de *Atta*, sin embargo, se necesitan más ensayos para poder comprobar estas hipótesis.

Todos los ensayos de inducción de la respuesta inmune en el corazón de los mosquitos, fueron realizados utilizando las mismas dosis. Interesantemente, se puede observar que *Cec1* y *albLys c-1* fueron sobre-expresados con distinta intensidad, a pesar de tener el mismo estímulo. En el caso de los corazones de mosquitos retados con *S. cerevisiae* se puede observar que *albLys c-1* incrementa aproximadamente 3 veces, mientras que *E. coli* y *M. luteus* incrementan aproximadamente 12 y 17 veces respectivamente. En contraste, *M. luteus* y *E. coli* incrementan la expresión de *Cec1* alrededor de 40 y 10 veces, mientras que *S. cerevisiae* incrementa la incrementa 50 veces, siendo este último el microorganismo que mejor induce la sobre-expresión de *Cec1*. A pesar de que estas evidencias sugieren que existe

una especificidad en la respuesta inmune del corazón, para demostrarlo son necesarios más ensayos que incluyan una mayor variedad de microorganismos (vivos o inactivos) y diferentes dosis de los mismos.



**Figura 15.** El corazón de *An. albimanus* sobre-expresa *albLys c-1* y *Cec1* después de un reto inmune. La expresión relativa de *albLys c-1*(A-C), *Cec1* (D-F) y *Atta* (G-H) fue determinada en corazones de mosquitos a las 12 hpi con *S. cerevisiae* (A, D, G), *E. coli* (B, E, H), y *M. luteus* (C, F, I). En cada experimento se ocuparon como controles los mosquitos no inyectados (Control), y mosquitos inyectados con el vehículo que es RPMI (RPMI). Los datos fueron normalizados por el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , en donde GAPDH fue ocupado como gen de referencia. Cada barra representa el promedio  $\pm$  s. e. m. de tres experimentos independientes por gen en cada condición, en donde fueron utilizadas diferentes generaciones de mosquitos. Los valores marcados con letras diferentes indican diferencias significativas obtenidas por One Way ANOVA seguido de la prueba de Tukey ( $P < 0.05$ ).



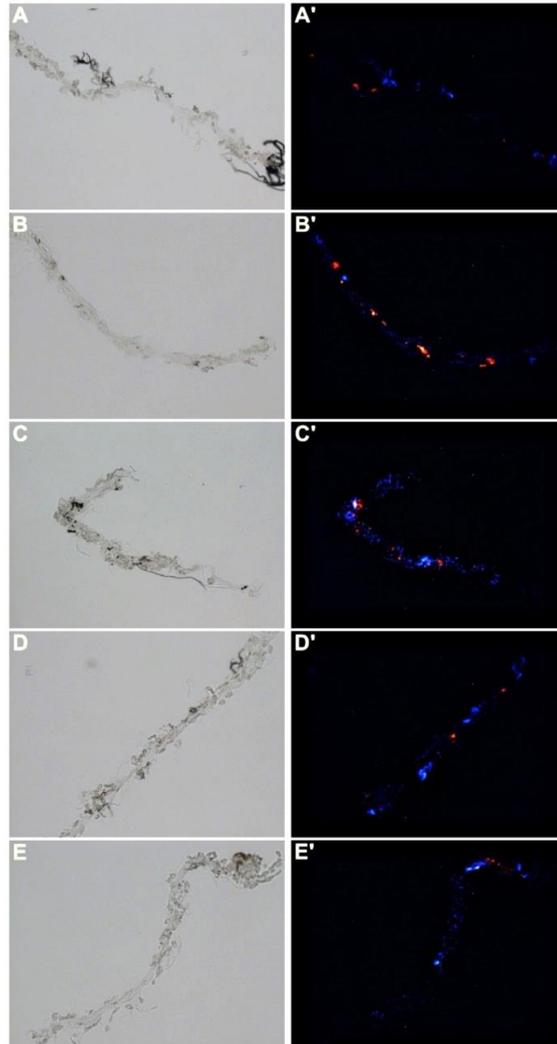
**Figura 16. Los hemocitos se acumulan en el corazón de *An. albimanus* después de un reto inmune.** La acumulación de hemocitos en el corazón fue observada en abdómenes obtenidos de mosquitos sin tratamiento (A, A'), inoculados con RPMI (B, B'), inoculados con *S. cerevisiae* (C, C'), *E. coli* (D, D'), *M. luteus* (E, E'). En azul pueden ser observados los núcleos de las células del abdomen (cuerpo graso, tráqueas, membrana pleural, corazón, etc.) marcadas con DAPI, y en rojo hemocitos marcados con CM-Dil; los asteriscos (blancos y negros) señalan las regiones periostiales. Los hemocitos se encuentran distribuidos por todo el cuerpo del mosquito (F), sin embargo, después de un reto inmune (F') se puede observar una acumulación de hemocitos (Hc) y capsulas melanóticas (CM) en las regiones periostiales (Os) del vaso dorsal (VD) en donde también se encuentran las células pericárdicas (CPs).

El resultado anterior demuestra que *Cec1* y *albLys c-1* son genes que se sobre-expresan en el corazón durante un reto inmune. Recientemente en *An. gambiae* se ha reportado que durante una infección los hemocitos se acumulan en el corazón, en donde fagocitan de manera más eficiente a los microorganismos que circulan por el hemocele (96,97). Sin embargo, los hemocitos son uno de los principales productores AMPs y lisozima (58,143), y el incremento en la expresión de *Cec1* y *albLys c-1* podría deberse a una acumulación de hemocitos en el corazón. Adicionalmente, en cada ensayo se evaluó la expresión de PPO, debido a que los hemocitos expresan este gen (55,56,63), pero bajo ninguna condición se logró encontrar la presencia del gen. Sugiriendo que el incremento de transcritos de *Cec1* y *albLys c-1* en el corazón no involucra a los hemocitos.

Por otro lado, en *An. albimanus* también se ha reportado que los hemocitos se acumulan en el corazón después de la activación de la respuesta inmune con allatotropina (124), sugiriendo que con un reto inmune inducido con microorganismos puede ocurrir lo mismo. Para comprobar esta hipótesis, fueron obtenidas las carcacas de mosquitos *An. albimanus* a las 12h post-inoculación con RPMI, *S. cerevisiae*, *M. luteus*, y *E. coli*, en las cuales 20 minutos previos a la disección fueron inoculados con colorante CM-Dil, el cual marca de manera específica la membrana de los hemocitos (debido a que son el único tejido en el mosquito que no presenta una lámina basal). Los resultados obtenidos muestran que tras un reto inmune los hemocitos se acumulan en las regiones periostiales (**Figura 16**). Sin embargo, se ha reportado que los mosquitos (incluyendo *An. albimanus*) poseen diferentes subpoblaciones de hemocitos (55,56,58), las cuales expresan diferentes tipos de PPO (144–146). En los ensayos presentados aquí solo se evaluó la expresión de *PPO1*, lo cual abre la posibilidad de que no se observó la expresión de *PPO1* por que la subpoblación de hemocitos adheridos al corazón no lo expresan.

En adición es importante recalcar que los corazones utilizados en los ensayos de qRT-PCR fueron lavados cuidadosamente, procurando remover todos los restos de cuerpo graso y hemocitos. No obstante, y debido a que *PPO1* podría no ser un buen marcador de hemocitos, se decidió evaluar la presencia de los hemocitos en los corazones aislados. En la **Figura 17** se muestra a los corazones aislados (como se utilizan en los ensayos de qRT-PCR), en donde se puede observar que hay pocos hemocitos (marcados con CM-Dil) adheridos a ellos,

indicando que a pesar de que los hemocitos se acumulan en el corazón después del reto inmune, son removidos eficientemente con los lavados. Este resultado indica fuertemente que el corazón de los mosquitos puede responder ante un reto inmune mediante la sobre-expresión de *Cec1* y *albLys c-1*.

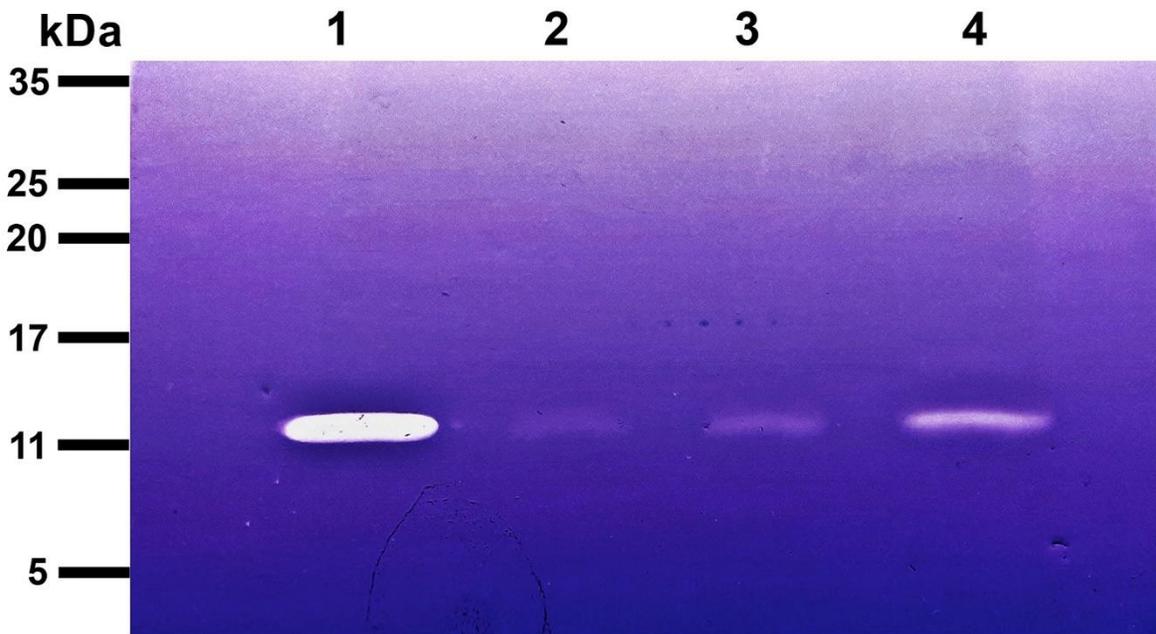


**Figura 17. Los corazones aislados contienen pocos hemocitos.** Los corazones fueron obtenidos de mosquitos sin tratamiento (A, A'), inoculados con RPMI (B, B'), *S. cerevisiae* (C, C'), *E. coli* (D, D'), o *M. luteus* (E, E'). En azul se muestran los núcleos marcados con DAPI de los diferentes tipos celulares del corazón, y en rojo hemocitos marcados con CM-Dil. Todas las muestras (corazones) fueron obtenidas a las 12 hpt, y fueron lavadas cuidadosamente tres veces para retirar los hemocitos adheridos. Poca presencia de hemocitos y un número similar de ellos se observan adheridos en los corazones de cualquier condición después de los lavados, indicando que los corazones poseen un buen grado de pureza durante su obtención. La figura fue obtenida de imágenes representativas obtenidas de 5 corazones de mosquito por cada condición.

### 9.3.1. Una proteína de 14kDa (peso esperado de albLys c-1) con actividad lítica incrementa su abundancia en extractos de corazones de mosquitos retados con *M. luteus*.

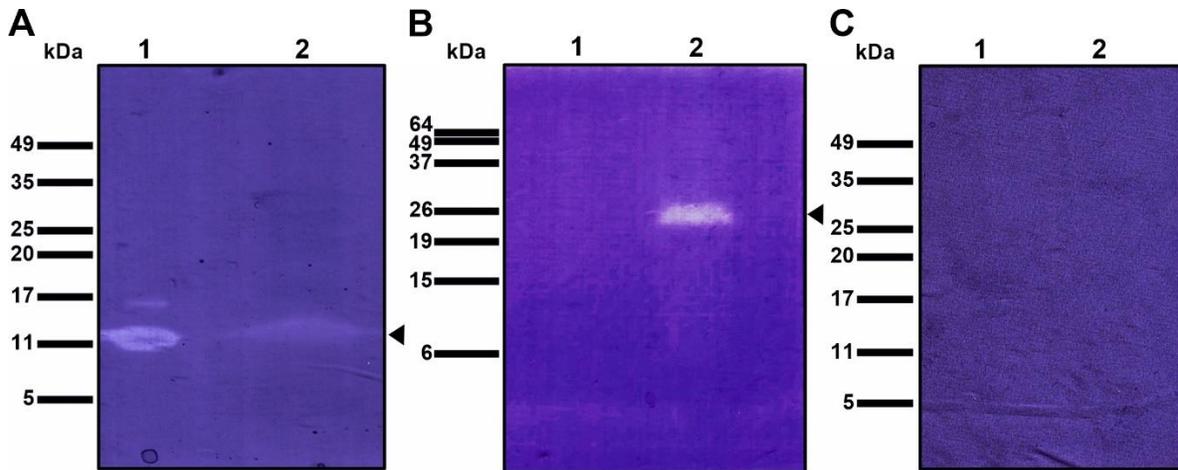
Previamente han sido reportadas las propiedades antimicrobianas de las CPs de *An. albimanus*, en donde se demuestra que los extractos de corazones que poseen CPs presentan actividad lítica contra *M. luteus* (100). Sin embargo, estos ensayos no permiten discernir a los componentes que están participando en la lisis bacteriana. Es importante mencionar que uno de los principales componentes de la actividad lítica en la respuesta inmune son las lisozimas (129,147). Interesantemente, albLys c-1 es una lisozima cuya secuencia tiene todas las características de una lisozima con actividad de hidrolasa, la cual es necesaria para llevar a cabo la lisis bacteriana (**Figura 10**). Lo anterior sugiere la posibilidad de que albLys c-1 sea uno de los componentes que participan en la lisis bacteriana de los extractos de corazones de *An. albimanus*. Para comprobar esta hipótesis, se hicieron zimogramas que contienen *M. luteus* marcados con azul brillante de remazol (RBB-*M. luteus*) como sustrato de lisozima. El colorante se une por enlace covalente al PGN de la pared celular de *M. luteus* y es liberado por la actividad de muramidasa de las lisozimas, lo cual crea una zona clara en el peso de las proteínas con dicha actividad (111,112).

Los resultados obtenidos demuestran que los extractos de corazones presentan una sola banda con actividad lítica que tiene un peso de 14kDa, que corresponde al peso esperado de albLys c-1 (**Figura 18**). Este resultado sugiere que albLys c-1 es uno de los principales componentes de la actividad lítica del corazón de *An. albimanus*. Adicionalmente para comprobar que albLys c-1 es un agente lítico que participa en la respuesta inmune, se midió la actividad lítica de los extractos de corazones de mosquitos previamente retados con *M. luteus*. Los resultados indican que existe un incremento de la actividad lítica de los extractos de corazones de mosquitos retados (**Figura 18**), no siendo así en los controles (inoculados con RPMI y sin inocular). Este resultado correlación con los datos obtenidos por qRT-PCR (**Figura 15**), sugiriendo fuertemente que albLys c-1 participa en la respuesta inmune como un agente lítico.



**Figura 18. La actividad de lisozima incrementa en el corazón de los mosquitos después de un reto inmune con *M. luteus*.** Lisozima de clara de huevo de gallina (0.5 $\mu$ g, carril 1), proteína de extracto de corazones (n=50) de mosquitos no inyectados (carril 2), 12 h post inyección con RPMI (carril 3), y 12 h post inyección con *M. luteus* (carril 4). Las muestras de proteínas fueron separadas por electroforesis en un gel que contiene RBB-*M. luteus*. Solo una banda fue observada una banda con actividad lítica en todas las condiciones, indicando la presencia de albLys c-1 en el corazón de los mosquitos. Una mayor actividad lítica fue observada en los extractos de corazones de mosquitos retados con *M. luteus*. Tres geles independientes fueron hechos, en los cuales se obtuvo resultados similares. Las tres replicas biológicas fueron hechas con mosquitos provenientes de tres generaciones diferentes.

Por otro lado, los resultados obtenidos por qRT-PCR demuestran que *M. luteus* es el microorganismo que mejor induce la sobre-expresión de *albLys c-1*, seguido de *E. coli* y *S. cerevisiae*, lo cual se explica parcialmente por una mayor cantidad de PGN en la pared de *M. luteus* que es el blanco de degradación, y el principal inductor de la sobre-expresión de las lisozimas en humanos e insectos(148,149). Sin embargo, se ha evidenciado que *E. coli* al igual que *M. luteus* también induce la sobre-expresión de *Lys c-1* en *An. gambiae* (130,150), similar a los resultados presentados aquí (**Figura 15**). Adicionalmente, se ha reportado que *Lys c-1* de *An. gambiae* presenta actividad antimicrobiana contra *M. luteus*, *E. coli* (151), sin embargo, no está claro si dicha actividad anti-microbiana está asociada a la vía canónica (lítica) o presenta un mecanismo alterno.



**Figura 19. La actividad de muramidasa de albLys c-1 es específica contra *M. luteus*.** Zimogramas hechos con geles de acrilamida al 13% que contienen **A)** RBB-*M. luteus*, **B)** RBB-*E. coli*, **C)** RBB-*S. cerevisiae*. El carril 1 en cada gel contiene 1µg de lisozima de clara de huevo de gallina, el carril 2 de cada gel contiene el sobrenadante de extracto de intestinos (n=30). Las zonas claras indican actividad lítica específica de un sustrato. En el gel **A)** se observa actividad lítica de una proteína de 14kDa (albLys c-1) (carril 2) similar al peso de la lisozima de clara de huevo de gallina (carril 1). En el gel **B)** se observa una banda con un peso aproximado de 24kDa (carril 2) en el extracto de intestino, sin embargo, la lisozima de clara de huevo de gallina no presenta actividad lítica contra *RBB-E. coli*. En gel **C)** no se observó actividad lítica de la lisozima de clara de huevo de gallina (carril 1) ni del extracto de intestinos (carril 2) contra *RBB-S.cerevisiae*. Cada ensayo se realizó por duplicado, utilizando muestras provenientes de mosquitos de generaciones diferentes.

Para demostrar la especificidad de la actividad de muramidasa de albLys c-1, se realizó una modificación de la técnica del zimograma usando RBB-*M. luteus*, la cual consiste en marcar *E. coli* y *S. cerevisiae* con azul brillante de remazol. Al igual que en los geles que contienen RBB-*M. luteus*, se espera que se presente una zona clara en el peso donde exista una proteína con actividad lítica contra RBB-*E. coli* o RBB-*S. cerevisiae*. Debido a la dificultad en la obtención de la muestra de corazones, se decidió usar proteína de extractos de intestinos de mosquitos hembra, en donde también se ha reportado la expresión de lisozimas en otros insectos (130,147,152,153) y posiblemente en mosquitos. En la **Figura 19** se muestran los resultados obtenidos, en donde el gel que contiene como sustratos a RBB-*M.luteus* (**Figura 19A**) presenta actividad lítica en el peso de albLys c-1 (14kDa) al igual que en corazones. Por otro lado, en el gel que contiene a RBB-*E. coli* no se presenta actividad lítica en el carril que contiene la lisozima de clara de huevo de gallina, ni a los 14 kDa (MW de albLys c-1)

en el carril que contiene la proteína de extracto de corazones. Sin embargo, se observa una banda en aproximadamente los 24 kDa (**Figura 19B**), sugiriendo que existe una proteína diferente a albLys c-1 que posee actividad lítica contra *E. coli*. Por último, el gel que contiene RBB-*S. cerevisiae* no presentó ninguna banda con actividad lítica (**Figura 19C**). En conjunto estos resultados sugieren que: 1) albLys c-1 posee actividad lítica específica contra *M. luteus*; 2) el intestino de *An. albimanus* expresa albLys c-1, lo cual no había sido reportado; 3) el extracto de intestinos contiene una proteína que presenta actividad lítica contra *E. coli*, sugiriendo que el mosquito contiene múltiples componentes líticos que posiblemente no son lisozimas; 4) esta modificación en la técnica del zimograma permite identificar componentes específicos con diferente afinidad de sustrato, lo cual permitirá un estudio más complejo de los componentes líticos de la respuesta inmune. Hasta donde se ha investigado en este trabajo, está es la primera vez que se describe esta modificación técnica, que es sencilla y accesible a cualquier laboratorio.

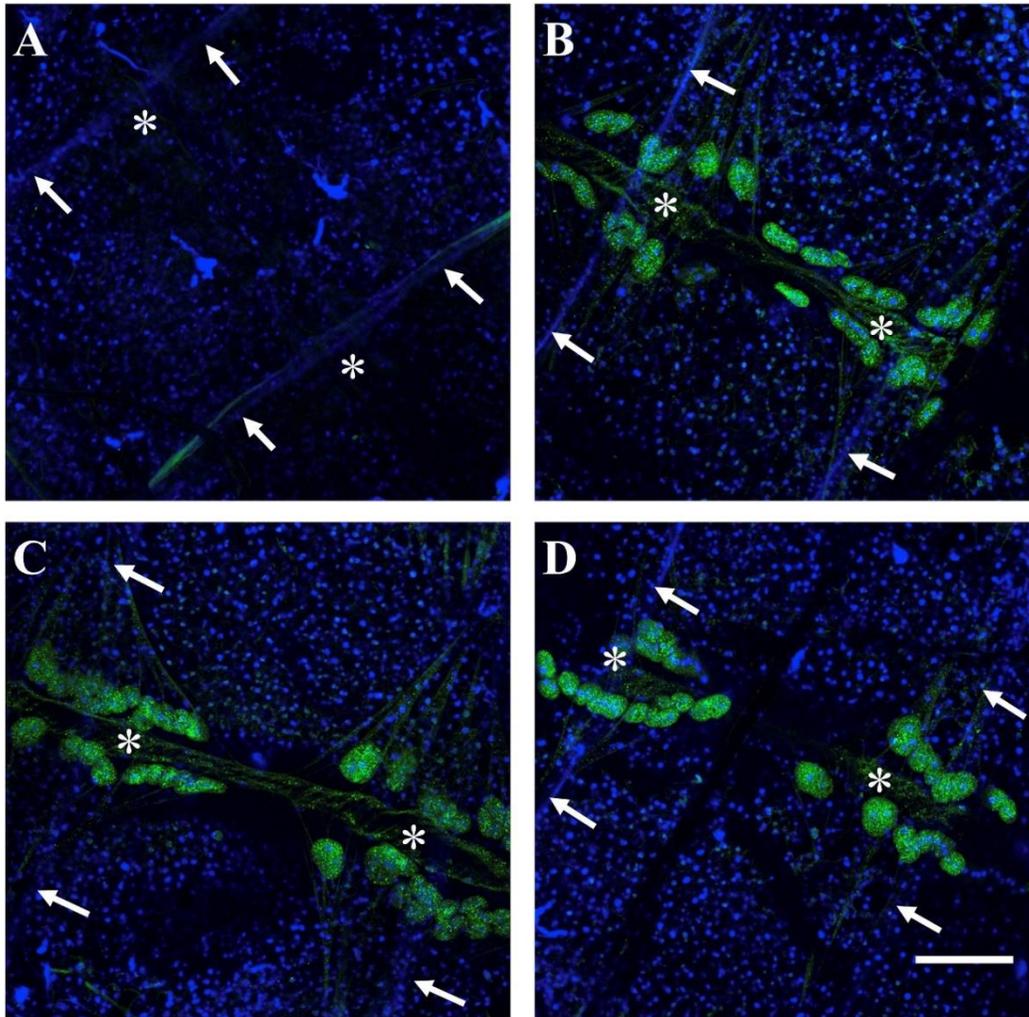
#### **9.4. Las CPs son responsables de la expresión de genes relacionados a inmunidad en el corazón de *An. albimanus***

Los resultados presentados anteriormente demuestran que el corazón de *An. albimanus* expresa diferentes genes de inmunidad, sin embargo, estos resultados no evidencian cuales son los tipos celulares del corazón que expresan estos genes. Previamente se ha evidenciado que las CPs de *An. albimanus* presentan algunos marcadores histológicos de inmunidad (100), y en *An. gambiae* y *An. stephensi* se ha reportado la presencia de genes de inmunidad en CPs (88–90,92), lo que sugiere que las CPs podrían ser las productoras de *albLys c-1* y *Cec1* en el corazón de *An. albimanus*.

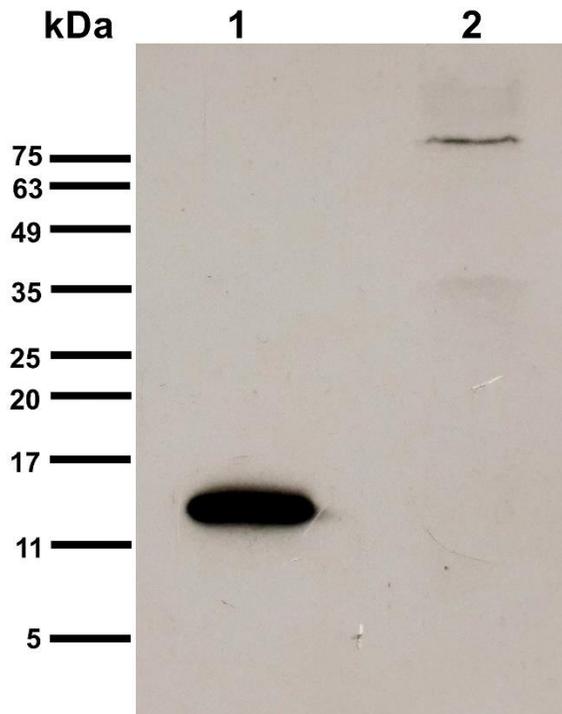
##### **9.4.1 Las CPs expresan *albLys c-1***

Para demostrar que las CPs expresan albLys c-1, se decidió buscar su presencia usando un anticuerpo anti lisozima de clara de huevo de gallina, debido a que anteriormente este tipo de anticuerpos se han usado para detectar lisozima en *Ae. aegypti* (154). En la **Figura 20**, se muestran los resultados obtenidos de una inmunofluorescencia usando este anticuerpo para detectar lisozima sobre abdómenes de mosquitos, en donde se puede observar un reconocimiento específico en las CPs. Interesantemente, la señal se puede observar en lo que

posiblemente son vacuolas; en adición después de un reto inmune la señal no cambia de intensidad ni de localización, lo que no concuerda con los resultados anteriores, sugiriendo la posible detección de otra molécula.



**Figura 20. Inmunoreactividad de un anticuerpo anti-lisozima de clara de huevo de gallina en abdómenes de mosquito.** El ensayo fue realizado en abdómenes de mosquitos *An. albimanus* hembra de 3 días de edad. Para evaluar la inmunoreactividad contra lisozimas se usó un anticuerpo policlonal de conejo anti-lisozima de clara de huevo de gallina, y un anticuerpo secundario cabra anti-conejo conjugado a Alexa Fluor 488. Las imágenes fueron obtenidas en un microscopio confocal, y las reconstrucciones tridimensionales obtenidas del Z-stack son representadas en una proyección 2D. **A)** Solo anticuerpo secundario (sin anticuerpo primario), **B)** No inyectados, **C)** Inyectados con RPMI, **D)** Inyectados con *M. luteus*. Reactividad positiva del anticuerpo primario fue observada solo en CPs (verde), en azul se muestra los núcleos teñidos con DAPI. Las flechas apuntan a las membranas intersegmentarias del quinto segmento abdominal de la región dorsal, y también señalan hacia la parte anterior del mosquito. (\*) Corazón. Barra de escala (100  $\mu$ m).

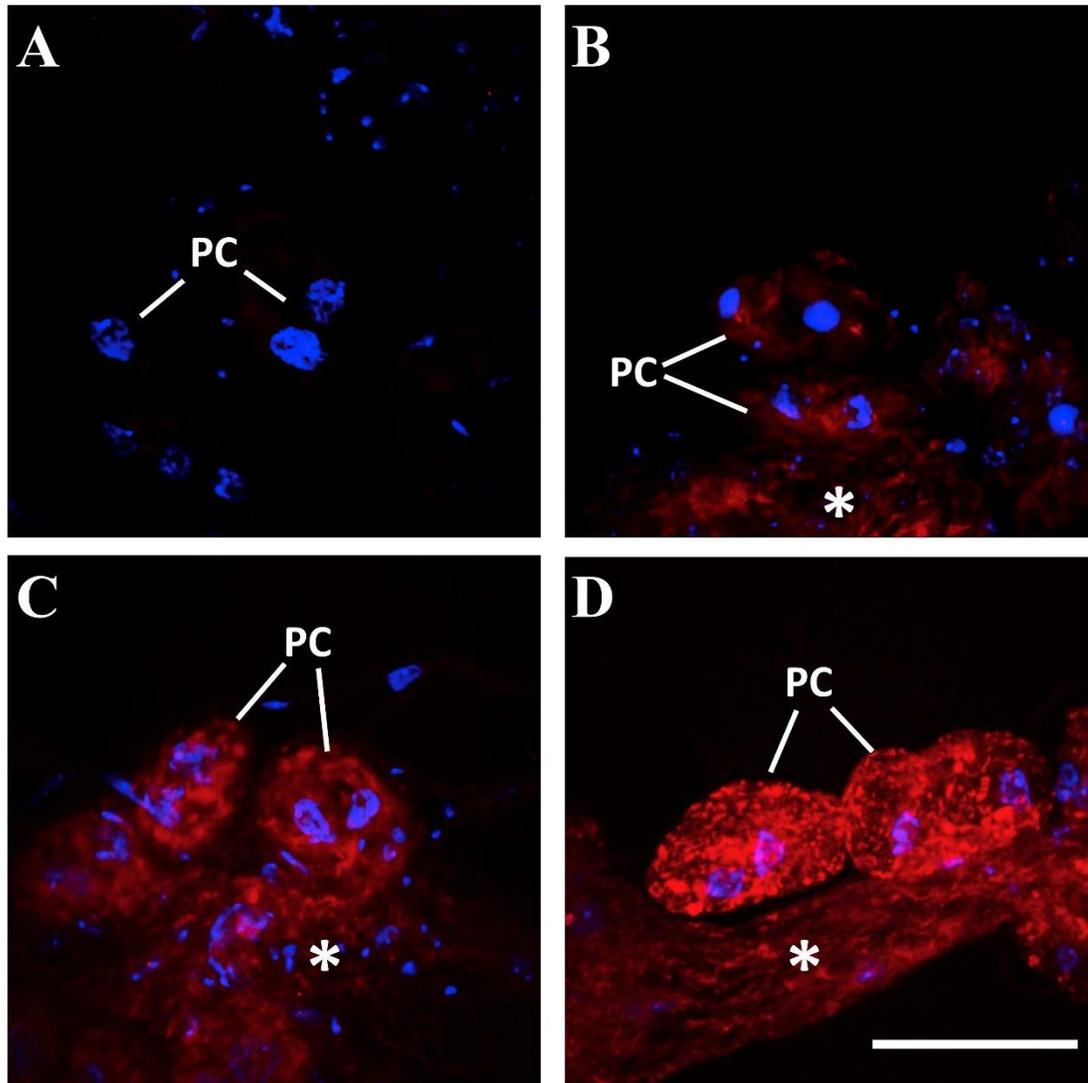


**Figura 21.** El anticuerpo anti-lisozima de clara de huevo de gallina reconoce una proteína de 90kDa de *An. albimanus*. Lisozima de clara de huevo de gallina (0.5 $\mu$ g, carril 1) y extracto de proteína de cinco abdómenes de mosquitos (carril 2) se corrieron en condiciones no desnaturalizantes en SDS-PAGE. El gel fue transferido a una membrana de nitrocelulosa y fue incubado con un anticuerpo anti-lisozima de clara de huevo de gallina y posteriormente con un anticuerpo secundario de cabra anti-conejo conjugado a peroxidasa de rábano. En el carril 1 contiene el control positivo (0.5 $\mu$ g de lisozima de clara de huevo de gallina), en donde se observa una sola banda a los 14.31kDa. En el carril 2 (extracto de proteína de abdómenes de mosquito) se observa una banda con un peso aproximado de 90kDa.

Adicionalmente se realizó un ensayo de WB para conocer el peso de la proteína que se detectó en las inmunofluorescencias. La proteína para realizar el ensayo se obtuvo de extracto de 5 carcasas de mosquitos, y las condiciones de corrida en el gel fueron no desnaturalizante. El resultado obtenido muestra que tal y como se esperaba, el anticuerpo reconoció un proteína de peso molecular cercano a 90 kDa que no corresponde al peso de albLys c-1 (aproximadamente 14kDa) (**Figura 21**). Es interesante resaltar el hecho de que la lisozima c-6 (gen ID<sub>VB</sub>: AALB004163) de *An. albimanus* tiene un peso esperado de 106kDa, lo que sugiere que posiblemente el anticuerpo este reconociendo a esta lisozima, la cual presenta 5 diferentes dominios de lisozima que incrementan la posibilidad de reacción cruzada con el

anticuerpo anti-lisozima de clara de huevo de gallina. En adición, es importante mencionar que la lisozima c-6 no presenta una secuencia de péptido seña, lo que correlaciona con las inmunofluorescencias, en donde se observa una señal constante dentro de la célula, que no se altera con un reto inmune, sugiriendo que la lisozima c-6 podría jugar un papel distinto al de la inmunidad. Sin embargo, son necesarios más experimentos para demostrar que la proteína que reconoce este anticuerpo es realmente lisozima c-6, así como también dilucidar el posible papel de esta lisozima.

La detección de la expresión de proteínas por medio de anticuerpos es una buena herramienta para saber si el gen realmente se está transduciendo, sin embargo, es importante hacer hincapié en que las CPs son células filtradoras (79,155), las cuales podrían tomar proteínas como albLys c-1, por lo que es necesario el uso de otras técnicas para la demostrar la expresión de genes como la lisozima en las CPs. El RNA-FISH, es una técnica que permite la detección individual y específica del mRNA de un gen. La técnica consiste en emplear un set de sondas (mínimo 20 sondas) las cuales son diseñadas para hibridar específicamente con el mRNA de interés (110) dentro de la célula. Por lo cual, para demostrar las CPs de *An. albimanus* expresan *albLys c-1* ese decidió buscar la presencia de mRNA de *albLys c-1* por RNA-FISH en los distintitos tipos celulares del corazón. Los resultados demuestran que la CPs es el único tipo celular del corazón que expresa *albLys c-1* (**Figura 22**). Adicionalmente, se observó un incremento en la señal de *albLys c-1* en las CPs de mosquitos retados con *M. luteus*, lo cual correlaciona con los resultados obtenidos por qRT-PCR (**Figura 15**), y fortalece la hipótesis de que las CPs son células inmunocompetentes que pueden expresar genes de respuesta inmune como *albLys c-1*.



**Figura 22. Localización *in situ* del mRNA de *albLys c-1* en el corazón de *An. albimanus*.** La localización de los transcritos de *albLys c-1* fue analizada por RNA-FISH en corazones aislados de mosquito. En rojo se marcan los transcritos de *albLys c-1* con sondas acopladas a el fluoróforo Quasar 570, y en azul se marcan los núcleos teñidos con DAPI de los diferentes tipos celulares del corazón. A) Corazón control (sin sondas), B) Corazón de mosquitos no inyectados, C) Corazón de mosquitos inoculados con RPMI, D) Corazón de mosquitos inoculados con *M. luteus*. Las muestras C y D fueron obtenidas a las 12 h post-inyección. En la figura se puede observar que el reto con *M. luteus* induce un incremento en la expresión de *albLys c-1* en las CPs. Las imágenes son áreas representativas de cinco muestras obtenidas por cada condición. (\*) Vaso dorsal; (PC) célula pericárdica. Barra de escala (50  $\mu$ m).

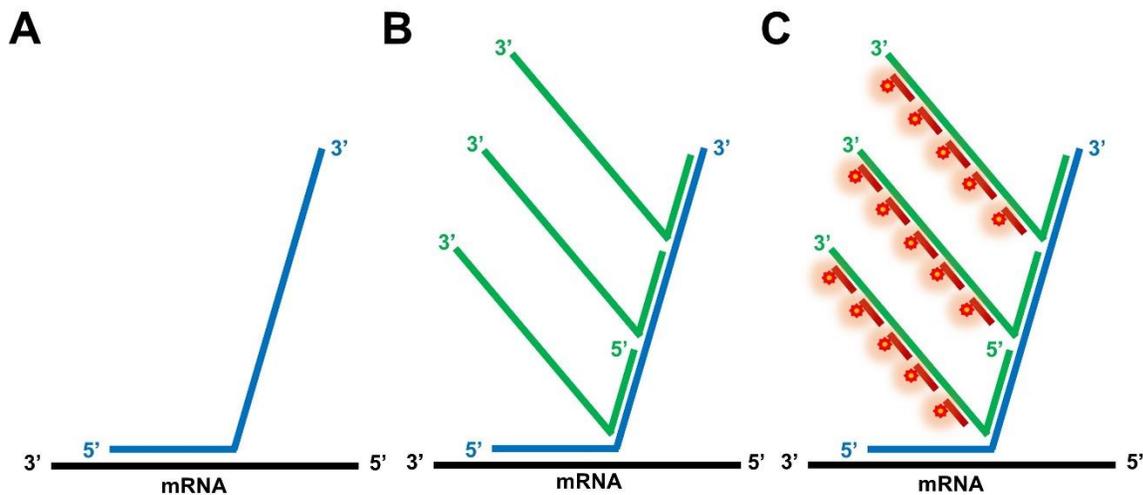
#### 9.4.2. Las CPs expresan *Cec1*

Al igual que la *albLys c-1* las CPs podrían estar expresando *Cec1*, por lo cual en un inicio se decidió emplear la misma metodología de RNA-FISH usada para *albLys c-1*, debido a que la detección de mRNA de manera *in situ* es una prueba que evidencia fuertemente de la expresión de un gen por un tipo celular en particular. Sin embargo, la técnica de RNA-FISH empleada para la detección de mRNAs de *albLys c-1* solo puede detectar transcritos cuya longitud permitan hibridar al menos 20 sondas, lo cual es una limitante en el mRNA de *Cec1*, debido a que su longitud (224 nt) solo permite hibridar 9 sondas, por lo cual se decidió usar una variante del RNA-FISH convencional llamada RNA FISH-STICs (por sus siglas en inglés: Fluorescence *In Situ* Hybridization with Sequential Tethered and Intertwined ODN Complexes), la cual permite concentrar un gran número de sondas fluorescentes en un pequeño espacio, haciendo posible la detección de mRNA de tamaño pequeño (156). La técnica consiste en tres tipos de sondas: la sondas primarias que se unen al mRNA blanco y a la sonda secundaria, la sonda secundaria que hibrida con las sondas primarias y la sonda terciaria; esta última contienen una marca fluorescente que permite la detección del complejo mRNA-sondas como se muestra en la **Figura 23**.

El RNA FISH-STICs es una técnica de gran sensibilidad, sin embargo, debido a que usa tres tipos de sondas y a que dos de ellas tienen una longitud de 150 nt que en condiciones no apropiadas pueden generar cierto grado de inespecificidad. Por lo cual, es recomendado estandarizar previamente de las condiciones de hibridación. En primer lugar, se debe verificar que las secuencias de las sondas son las correctas y que ellas pueden interactuar entre sí para formar el complejo de sondas que permite la magnificación de la señal. Para demostrarlo, se decidió correr diferentes combinaciones de las sondas en un gel de poliacrilamida, en donde se puede observar que las sondas interactúan entre sí, y forman complejos de oligonucleótidos de pesos mayores con referencia al peso de las sondas que se corrieron por separado (**Figura 24**).

Es importante mencionar que las secuencias que permiten la hibridación entre sí de las sondas (sonda-sonda) no se encuentran reportadas en ningún ser vivo, y son las secuencias recomendadas y probadas por Sinnamon y Czapinski (156), inventores de RNA FISH-STICs. Sin embargo, es fundamental aclarar que las bandas de pesos mayores a 150nt

observadas en las mezclas de hibridación no son complejos inespecíficos; se debe a que los complejos de hibridación son estructuras terciarias que forman ramificaciones, y que estas varían en el número de sondas que las conforman (eje.: complejo 1 [1 sonda primaria + 3 sondas secundarias + 15 sondas terciarias], complejo 2 [1 sonda primaria + 2 sondas secundarias + 7 sondas terciarias], complejo n [...], etc). En resumen, estas variaciones en la estructura terciaria y combinación de las sondas provoca la formación de complejos de diferentes pesos, lo cual se refleja en el gel de poliacrilamida (**Figura 24**).



**Figura 23. Esquema de RNA FISH-STICs.** El RNA FISH-STICs es una técnica de hibridación de ácidos nucleicos modificada del RNA FISH convencional. Consiste en tres juegos de sondas que interactúan entre el mRNA blanco o entre sí. **A)** La primera sonda o sonda primaria (azul) contiene una región con una secuencia complementaria a el mRNA blanco, y otra región que contiene secuencias idénticas colocadas en tándem que son complementarias a la sonda secundaria. **B)** La sonda secundaria (verde), posee una secuencia que hibrida con la sonda primaria y adicionalmente contiene 5 secuencias idénticas repetidas en tándem que son complementarias a la sonda terciaria. **C)** La secuencia de la sonda terciaria (rojo) es complementaria a la secuencia secundaria. Adicionalmente, esta sonda contiene una marca fluorescente (TAMRA), la cual permite la detección del complejo mRNA-sondas.

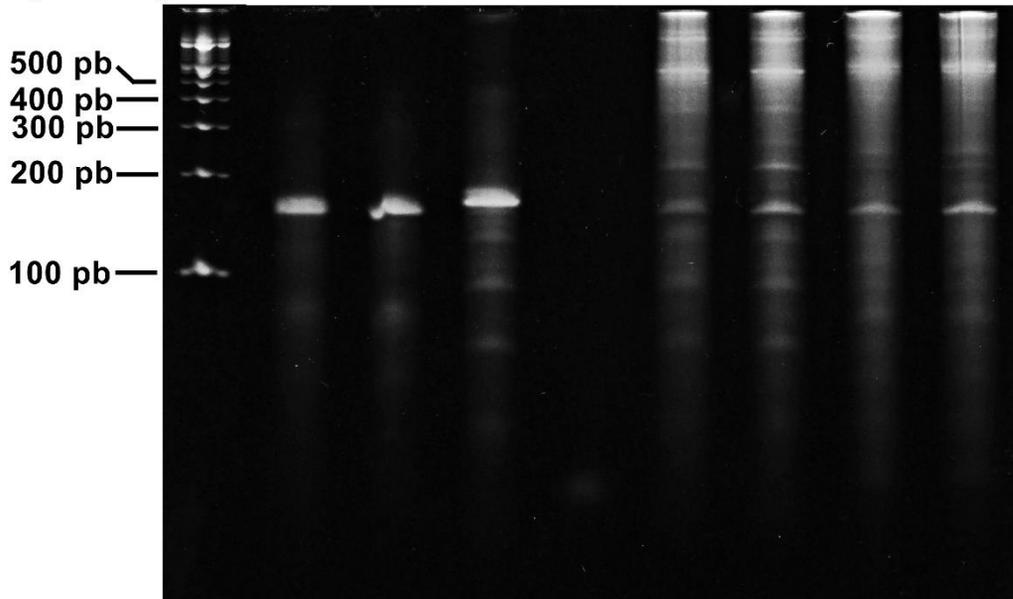
La detección del complejo mRNA-sondas de RNA FISH-STICs es posible porque la sonda terciaria contiene una etiqueta fluorescente, que en este caso en particular se utilizó TAMRA. Para demostrar la integridad de la sonda y su fluoróforo la sonda fue cargada en un gel de agarosa, y adicionalmente se cargó una mezcla de la sonda terciaria con la sonda secundaria. Los resultados indican que la sonda terciaria posee integro el taq de TAMRA, debido a que

no se necesitó de EtBr para su detección, además se logró detectar a la sonda secundaria incubada con la sonda terciaria, y no así con la sonda secundaria sola (**Figura 25**), sugiriendo que la sonda terciaria puede permitir la detección del complejo mRNA (*CecI*)-sondas de manera *in situ* en un tejido.

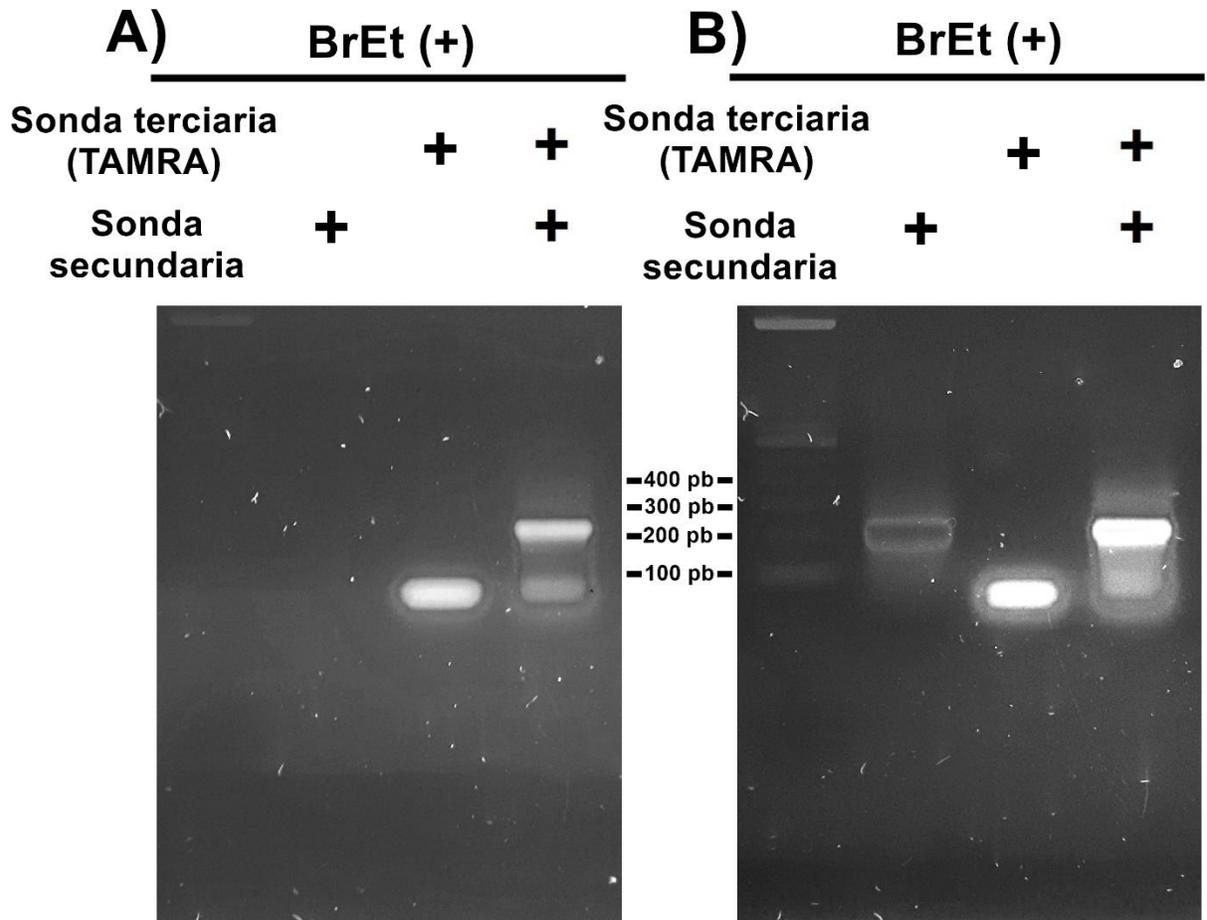
Para demostrar que la sonda primaria es la que brinda la especificidad en el ensayo de RNA FISH-STICs se hizo un ensayo *in situ* en corazones aislados de mosquitos sin tratamiento, en donde en una condición se usaron los tres tipos de sondas del RNA FISH-STICs, y en la otra no fue agregada la sonda primaria. En la **Figura 26** se puede observar que solo presentan señal los corazones de mosquito que tienen todas las sondas (ensayo completo de RNA FISH-STICs), mientras que los corazones que fueron incubados en ausencia de la sonda primaria carecen de señal. En primer lugar, esto sugiere que la especificidad del ensayo está dada por las sondas primarias, y en segundo lugar que las sondas secundaria y terciaria por si solas no hibridan de manera inespecífica en el tejido.

La hipótesis es que *CecI* al igual que *albLys c-1* se expresa en CPs. En la **Figura 27** se muestran los resultados obtenidos de RNA-FISH STICs, en donde se puede apreciar señal solo en las CPs y no así en vaso dorsal, sugiriendo fuertemente que las CPs son el único tejido del corazón que expresa *CecI*. Adicionalmente, se decidió hacer un ensayo de RNA FISH-STICs en carcasas de mosquitos retados con levadura (**Figura 28**), ya que es el microorganismo que mejor estimuló la expresión de *CecI* en los ensayos de qRT-PCR. Los resultados demuestran que el cuerpo graso al igual que las CPs también expresan *CecI* de manera constitutiva, sin embargo, cuando los mosquitos son retados con *S. cerevisiae*, la señal incrementa en ambos tejidos. Este resultado correlaciona con los resultados de qRT-PCR (**Figura 15**), sugiriendo fuertemente que las CPs pueden responder a un reto inmune mediante la sobre-expresión de *CecI* y por consiguiente que son un tipo celular inmunocompetente. En adición, se ha reportado que el cuerpo graso es el principal productor de cecropinas en los mosquitos (140,157,158), lo que correlaciona con los datos obtenidos aquí (**Figura 28**), y soporta la especificidad del RNA FISH-STICs, debido a que la presencia de señal en el cuerpo graso, es un control positivo del ensayo.

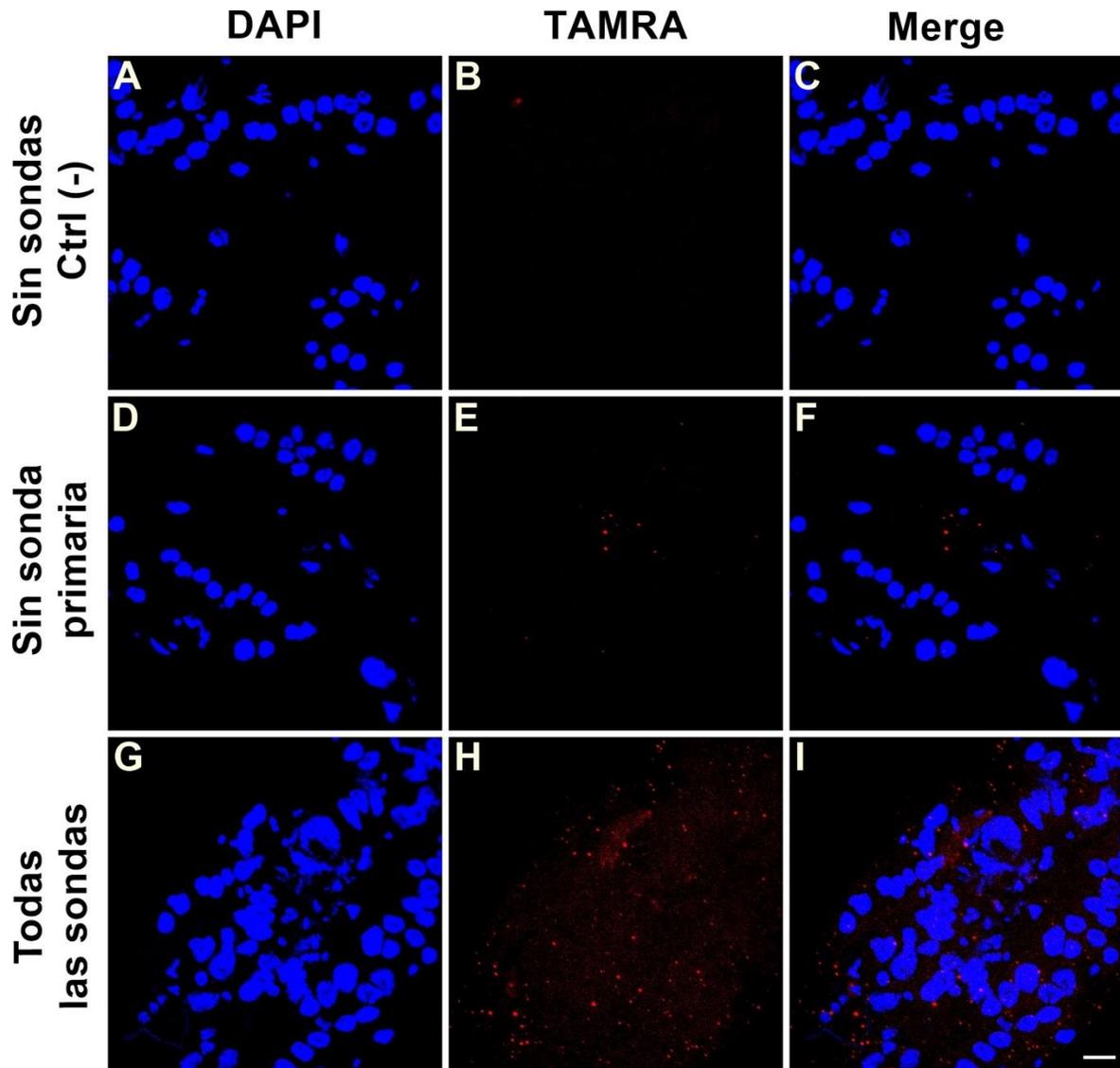
	1	2	3	4	5	6	7	8
Sonda primaria A	+				+		+	
Sonda primaria B		+				+		+
Sonda secundaria			+		+	+	+	+
Sonda terciaria (TAMRA)				+			+	+



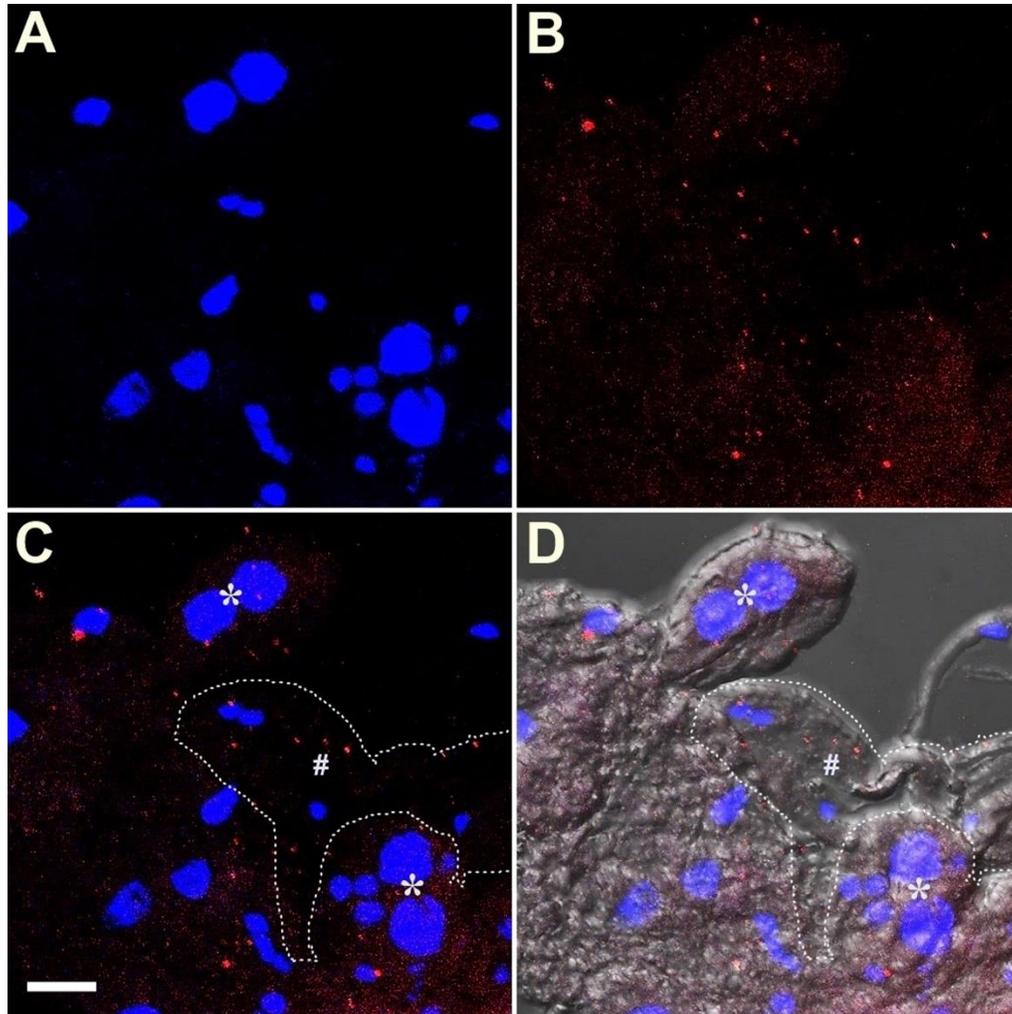
**Figura 24. Hibridación *in vitro* de las sondas para RNA FISH-STICs.** Cantidades equimolares de cada sonda fueron previamente incubadas para interactuar entre sí, posteriormente las mezclas se corrieron en un gel de poliacrilamida. En los carriles 1-4 se corrieron cada sonda por separado. En los carriles 5 y 6 se corrió cada sonda primaria interactuando con la sonda secundaria. En los carriles 7 y 8 se corrieron los productos de hibridación de las sondas primaria, secundaria y terciaria. En el gel se puede observar la aparición de bandas de distintos tamaño con respecto a la combinación de la sondas, lo cual indica que las sondas están hibridando entre sí.



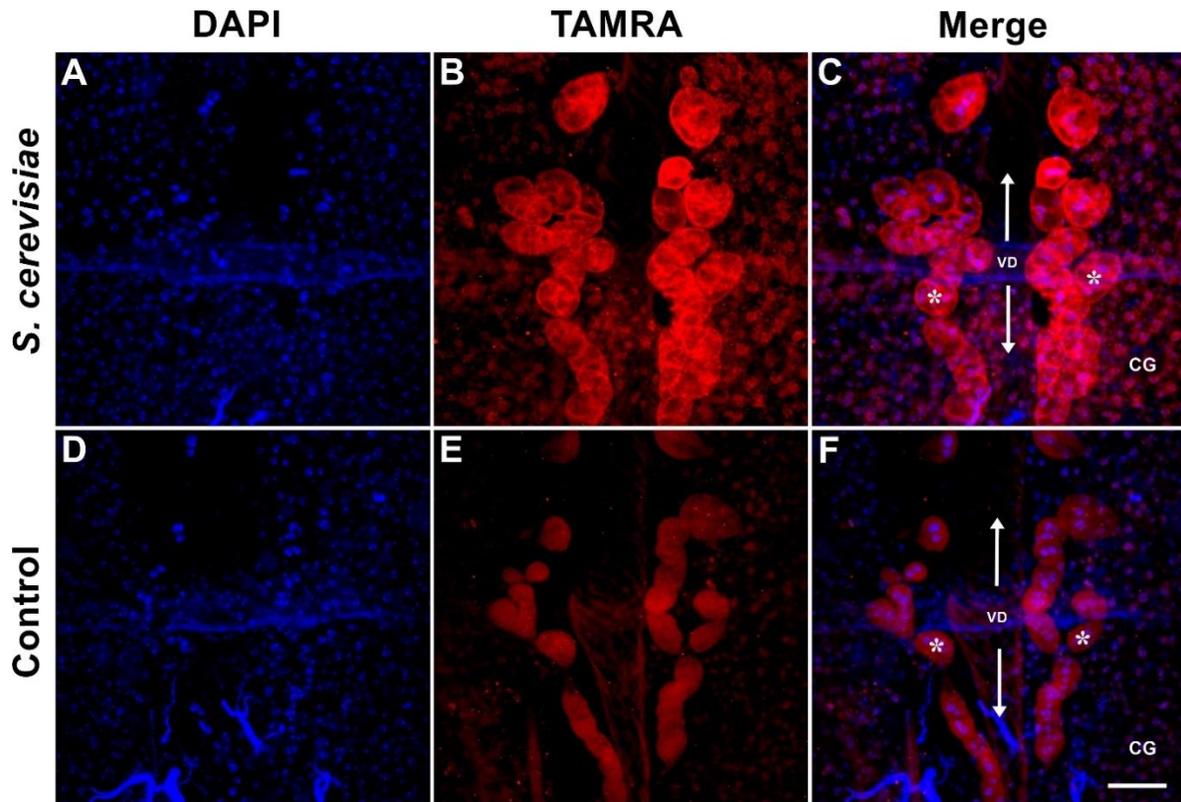
**Figura 25. Interacción *in vitro* de las sondas secundaria y sonda terciaria para RNA FISH-STICs.** En el carril 1 se corrieron 10 pm de la sonda secundaria, en el carril 2 se corrieron 50 pm de la sonda terciaria marcada con TAMRA, en el carril 3 se corrieron los productos de hibridación de la sonda secundaria (10 pm) y la sonda terciaria (50 pm). En **A)** se muestra el gel sin teñir, en donde se puede observar que la sonda terciaria posee fluorescencia por la modificación con TAMRA que posee, la cual permite detectar a la sonda secundaria debido a que a la hibridación (Carril 3). En **B)** se muestra el mismo gel, pero teñido con EtBr, en donde ahora se observa la sonda secundaria (sin sonda terciaria).



**Figura 26. Detección de mRNA de *Cec1* por RNA FISH-STICs.** Corazones aislados de mosquitos hembra fueron obtenidos para realizar la detección de transcritos de *Cec1* usando la técnica de RNA FISH-STICs. Esta técnica consiste en el uso de tres sondas diferentes, sin embargo, solo las sondas primarias son las que deben hibridar con el mRNA blanco (*Cec1*). Por lo cual, para demostrar la especificidad del ensayo se utilizaron los siguientes controles: Un control sin sondas [Ctrl (-)] (**A, B, C**), un control sin sondas primarias (**D, E, F**), el RNA FISH-STICs completo usando todas las sondas (**G, H, I**). En azul se muestran los núcleos de los diferentes tipos celulares del corazón teñidos con DAPI. En rojo se muestran los transcritos de *Cec1* que hibridan con las sondas de la FISH-STICs (TAMRA). En la figura se puede observar que el control que no tiene sondas primarias (**D, E, F**) carece de señal, sin embargo, cuando se usan las sondas primarias, se puede observar la presencia de señal en el tejido, indicando que la técnica es específica y que solo la sonda primaria es la que hibrida con los transcritos de *Cec1*. Las imágenes son zonas representativas de 5 muestras diferentes por cada condición, las cuales fueron obtenidas en un microscopio confocal, y la reconstrucción 3D del z-stack es representada en 2D por proyección máxima.



**Figura 27. Las CPs de *An. albimanus* expresan *Cec1*.** Detección de transcritos de *Cec1* en corazones aislados de mosquitos hembra sin tratamiento por RNA FISH-STICs. En azul se muestran los núcleos de los distintos tipos celulares del corazón teñidos con DAPI, en rojo se muestran los transcritos de *Cec1* hibridados con las sondas (TAMRA). (\*) CPs, (#) Vaso dorsal. El espacio delimitado con las líneas punteadas y marcado con #, indica el área ocupada por el vaso dorsal. Barra de escala (10µm). Las imágenes son regiones representativas obtenidas de 5 muestras obtenidas por cada condición. En la figura se puede observar que la señal solo se encuentra en CPs, sugiriendo que es el único tipo celular que expresa *Cec1* en el corazón de *An. albimanus*.



**Figura 28.** Las CPs sobre-expresan *Cec1* después de un reto inmune. Detección de transcritos de *Cec1* por mRNA FISH-STIC en abdómenes de mosquitos inyectados con (A, B, C) *S. cerevisiae* a las 12 hpi, o en (D, E, F) abdómenes de mosquitos control (no inyectados). En azul se muestran los núcleos teñidos con DAPI de los diferentes tipos celulares del abdomen, en rojo se muestran los transcritos de *Cec1* detectados por las sondas marcadas con TAMRA. Se puede observar que después de un reto inmune, incrementa la cantidad de mRNA de *Cec1* solo en CPs y en cuerpo graso. (\*) CPs, (VD) vaso dorsal, (CG) Cuerpo graso. Las flechas indican los segmentos abdominales, hacia arriba indican dirección a la parte anterior del mosquito, hacia abajo indican dirección a la parte posterior. Barra de escala (50um). Las imágenes son regiones representativas obtenidas de 5 muestras obtenidas por cada condición.

## **9.5. Las CPs expresan un gen rico en cisteínas con dominio del Factor de Von Willebrand tipo C**

En el transcriptoma de los corazones se encontraron varios genes sobre-expresado en las bibliotecas correspondientes a los corazones de mosquitos retados con zimosan; algunos de estos genes tal y como se esperaba fueron relacionados a inmunidad, no obstante, también se encontraron otros genes con funciones desconocidas. Uno de ellos fue el gen con ID<sub>VB</sub> AALB006666, el cual fue el gen más sobre-expresado del transcriptoma. Un análisis en la base de datos del VB mostró que este gen solo está presente en el genoma de los anofelinos y ausente en mosquitos de otro género, sugiriendo que podría estar jugando un papel fundamental en la biología de los anofelinos y que posiblemente está relacionado a inmunidad.

Un alineamiento del gen AALB006666 con sus 26 ortólogos del VectorBase (**Figura29**) revela que la gran mayoría de las secuencias contienen un sitio de corte de la péptido señal que está altamente conservado. De manera similar los 6 residuos de cisteínas están conservados en la gran mayoría de los ortólogos de AALB006666, sin embargo, de manera interesante un residuo de cisteína, uno de ácido aspártico y uno de glicina, están conservados en todos los ortólogos, sugiriendo que pueden tener un papel fundamental en la función que desempeña este gen.

Para conocer un poco más acerca de las posibles funciones de este gen, se realizó un análisis y construcción de la estructura terciara usando la secuencia completa de la proteína AALB006666. El análisis fue realizado en el servidor I-TASSER, el cual crea un modelo 3D de la proteína problema usando como templados los homólogos de la proteína cuya estructura y función previamente han sido descritas. Los resultados obtenidos indican que los homólogos estructurales desempeñan dos principales funciones: estructura y señalización (**Apéndice 13.16**). De manera interesante las isoformas de la proteína de colágeno  $\alpha$  tipo 2, comprenden el 40% de los homólogos utilizados para la construcción del modelo 3D de la proteína AALB006666, y además son los únicos homólogos que conservan los 6 residuos de cisteína (**Figura 30**).

```

AEP1011303-PA/1-49 .....MKLAINRSV
AMAM010411-PA/1-114 .....MKPAINRTV
ASTE001335-PA/1-114 .....MKPAINRLV
AMIN005741-PA/1-114 .....MVHLRVAAVG
ADAC008390-PA/1-121 .....MKPSTNVKV
AQUA009232-PA/1-116 .....MGPSTNFKV
AQUA009233-PA/1-114 .....MKSSTNFKV
AQUA009234-PA/1-117 .....MGPSTNFKV
AQUA011960-PA/1-80 .....MRP SINHTV
ADIR000883-PA/1-116 .....M .....MK
CPIJ012666-PA/1-100 .....M
PFAI003194-PA/1-103 .....M
PFAI003195-PA/1-80 .....M
AARA003729-PA/1-116 .....MKPSTNVKV
AARA003730-PA/1-116 .....MGPSTNFKV
AARA003731-PA/1-118 .....MKSSTNFKV
LLOJ001109-PA/1-104 .....M
LLOJ001110-PA/1-104 .....M
CPIJ006227-PA/1-100 .....MK
AFAF016008-PA/1-167 LRPYSRRRARS AHIRSDRELDRCGHRLQTFSPARRPCLLLFFFLFVSTTPESPAPT MKPV
CPIJ009658-PA/1-100 .....MK
AGAP010046-PA/1-118 .....MMKTSTNFKV
AGAP010047-PA/1-116 .....MKPSTNVKV
ASIS006165-PA/1-116 .....MNRVACRIA
AFUN000569-PA/1-114 .....MKPAINRLV
AALB006666-PA/1-121 .....MVHRRV .ALG
AATE014945-PA/1-116 .....MNPSTRCVM

```

```

AEP1011303-PA/1-49 .....C1 .....C2 1
AMAM010411-PA/1-114 LVA YV LFA . . . C L A S I S Q A Y V Y I V P D A K H P D Q E G H C W D D N L K I S V P V N E I R Q R P E K C E S M S
ASTE001335-PA/1-114 LVA L V L F A . . C L A S I A Q A Y V Y I I P D A K S P D Q E G H C Y D E T L K I S V P V N E V R Q R P E K C E S M S
AMIN005741-PA/1-114 P V A L A L F V . . C L A S I S D A Y V F I I P D A K S P N Q K D H C Y D E A T K I L V P V N E D R Q R P N R C B T M S
ADAC008390-PA/1-121 V S A A I I F L F A G L L P G G S A Y V Y I N P A G K S P D R E G H C Y D K D S N T T F P I G E V Q Q R L G R C E S M H
AQUA009232-PA/1-116 V A T L F L L Q M I F L M P F S Q A Y V Y I I P N A K S Q V Q E G S C Y D E S L K I N V P V N E V R Q R T G K C E S M S
AQUA009233-PA/1-114 L V T L V L L Q M I Y L I S F S Q A Y V Y M V R N A K S Q D Q E N S C Y D E S L Q I N V P V N E E R Q R P G K C E S M R
AQUA009234-PA/1-117 L V T L V L L Q M I Y L V S F S H A Y T F L I S N T K S Q V Q E D S C Y D E S L Q I N V P V N E E R Q R P G K C E S I R
AQUA011960-PA/1-80 L V T L V L L Q I I Y I I S F S Q A Y V Y M V P N A K S Q V Q E D S C Y D E S L Q I N V P V N E E R Q R P G K C E S M R
ADIR000883-PA/1-116 L I A F L L A T P C L V S L A D A Y V Y I I P N A K S P D Q E G H C Y D E T L K I S V P L N E V V Q R P E R C E S M S
CPIJ012666-PA/1-100 L F L V L S L A I S C L L Q Q I T G Y V A F L P N A T H P D H P G K C Y D E D S K T V V E K G . . S A V Y Q N C K E K S
PFAI003194-PA/1-103 S W I K I A F L V L S A V S L V A G Y V V N H P T S T N P E F P G H C W V E D L K Q A V K S G E E W T N R E K C E K I S
PFAI003195-PA/1-80 .....M L S A R I D F P G H C W L K S F K K A V K G G E E W T D R E N C L K Y S
AARA003729-PA/1-116 L A T L F L L Q M I F L M P F S Q A Y V Y I I P N A K S K V Q E S C Y D E S L K I N V P V N E V R Q R T G K C E S M S
AARA003731-PA/1-116 V V T L V L L Q M I Y L I S F S Q A Y V Y M V P N A K S Q V Q E G S C Y D E S L Q I N V P V N E E R Q R P G K C E S M R
AARA003731-PA/1-118 L A T L V L L Q M I Y L V S F S H A Y T F L I R N T K S Q V Q E N S C Y D E S L Q I N V P V N E E R Q R P G K C E S I R
LLOJ001109-PA/1-104 S A I R T G I L V I A L A I V I S G Q I L R H P P S T H P D Y P G H C W I A D L K Q A V R G G S E W S D R Q N C V R Y S
LLOJ001110-PA/1-104 S A I R S G I F V I A L A I V I S G Q I L R H P P S T H P D Y P G H C W I A D L K Q A V R G G S E W S D R Q N C V R Y S
CPIJ006227-PA/1-100 L L F V V L L I C C L L Q F T S G Y Y R A M A N A R N T A Y P G Q C Y D G Q T K T T V K K G . . F S K Y K N C E K W T
AFAF016008-PA/1-167 L F A F L L A T P C L V S L S D A Y V Y I I P D A K S P D Q E G H C Y D A T L K I A V P L N E V R Q R P E R C E S M S
CPIJ009658-PA/1-100 F L F V V L L V C C I M Q F T N G Y S R T M A N A R H S A Y P G Q C Y D G Q T K T T V K K G . . F S K Y K N C E K W T
AGAP010046-PA/1-118 L A T L V L L Q M I Y L V S F S H A Y T F L I R N T K S Q V Q E D S C Y D E S L Q I N V P V N E E R Q R P G K C E S I R
AGAP010047-PA/1-116 L A T L F L L Q M T F L M P F S Q A Y V Y I I P N A K S Q V Q E G S C Y D E S L K I N V P V N E V R Q R T G K C E S M S
ASIS006165-PA/1-116 I L A L M L M A I S S L M P T I E A Y T Y I V P N A K S A D K P G H C F D D Q L K I T V P V N K I R Q R T G R C E S M S
AFUN000569-PA/1-114 F V A L V V F V . . C L A S V S Q A Y V Y I I P N A K S P D Q E G H C Y D E T L K I S V P V N E V R Q R P E R C B T M S
AALB006666-PA/1-121 V I G A . L T L V A C L L P T A S A Y V Y I N P S G K S P D Q D G H C Y D K D T K T T F A I G E T R Q R A G R C E S M H
AATE014945-PA/1-116 S L V L L M V A I I S L I P A A R A Y V Y I V P D A K S P D Q E G C Y D T Q L K I A V P M N E I R Q R T G R C E S M S

```

```

AEP1011303-PA/1-49 .....C3 C4 10 20 30 C5C640
AMAM010411-PA/1-114 C . G S D Y S L S V A C C G A T A A G P G L I L T K I D Y S K P Y P D C C P Q V V M . . . . S E N L V .
ASTE001335-PA/1-114 C . G T D Y S L H V A C C G V I A A G P G M T V T K T D Y S K P Y P D C C P Q V V L . . . . T S D N E V .
AMIN005741-PA/1-114 C . G S D Y S L H V A C C G V I G A G P G M I I T K T D Y S K P Y P D C C P H V V M . . . . T S D N L V .
ADAC008390-PA/1-121 C . G T D D Y S L H V A C C G A I A A G P G M I I T K T D F S K P Y P D C C P K L A M . . . . S A E N I V .
AQUA009232-PA/1-116 C . T S D Y H I S I M C C G L I G A G P G T R V T E T D Y S K P Y P E C C P Q L V R D D S . . N D D V K P E
AQUA009233-PA/1-114 C . S D D Y S L H V A C C G S I A V G P G M I I T P T D Y S K P Y P D C C P H P A L . . . . S A E N D Y .
AQUA009234-PA/1-114 C . S D D Y S L H V A C C G V I G V G P G M V L T K T D Y S K P Y P D C C P Q V K I . . . . T A E D . .
AQUA011960-PA/1-80 C . S D D Y S L H G I C C G F F A V G P G M V L T K I D Y S K F P D C C P K A I K . . . . Q T E Q D L F
ADIR000883-PA/1-116 C . G S D Y S L H V A C C G V I G A G P G M T I T K T D Y S K P Y P D C C P H I A M . . . . S E N V V .
CPIJ012666-PA/1-100 C . S D D Y F L Q I T C C G L A V A D G D C R L E T . D S S K Y P E C C P K T V C . . . . N . . . .
PFAI003194-PA/1-103 C . S D D F S Y E I V C C G L L S P P P S C T I T P D N T K N Y P D C C P K F S C . . . . N . . . .
PFAI003195-PA/1-80 C . S A E D F S Y K I G C C G L N A P T S C S I P G D K T K D Y P D C C P K I S C . . . . N . . . .
AARA003729-PA/1-116 C . S D D Y S L H V A C C G S I A V G P G M I I T P T D Y S K P Y P D C C P H P A L . . . . S A E N V V .
AARA003731-PA/1-116 C . S D D Y S L H I A C C G V I G V G P G M V L T K T D Y S K P Y P D C C P Q V K I . . . . T A E D S N .
AARA003731-PA/1-118 C . S D D Y S L H G I C C G F F A V G P G M V L T K I D Y S K F P D C C P K A I K . . . . Q T E Q D L F
LLOJ001109-PA/1-104 C F A H D Y S Y E I V D C C G K M A I P D T C K P T P I D T T K D Y P D C C P K F T C . . . . N . . . .
LLOJ001110-PA/1-104 C F A H D Y S Y E I D C C G K M A I P D T C K P T P I D T T K D Y P D C C P K F T C . . . . N . . . .
CPIJ006227-PA/1-100 C . S N D Y T L S V T C C G V A A V P K G C R T T K . D T S K K Y P D C C P K V V C . . . . S E N T V .
AFAF016008-PA/1-167 C . G S D Y S L H V A C C G V I A A G P G L I I T K T D F S K P Y P E C C P H I A K . . . . S E N T V .
CPIJ009658-PA/1-100 C . S N D Y T L S V T C C G V A A V P K G C R T T K . D T S K K Y P D C C P K V V C . . . . S E N T V .
AGAP010046-PA/1-118 C . S D D Y S L H G I C C G F F A V G P G M V L T K I D Y S K F P D C C P K A I K . . . . Q T E Q D L F
AGAP010047-PA/1-116 C . S D D Y S L H V A C C G S I A V G P G M I I T P T D Y S K P Y P D C C P H P A L . . . . S A E N V V .
ASIS006165-PA/1-116 C . G S D Y S L Q V A C C G A V A A G P G F V I T P T D Y S K P Y P E C C P H V V M . . . . N S E N L V .
AFUN000569-PA/1-114 C . G D D Y S I Q V A C C G V I A A G P G M I I T K T N Y S K P Y P D C C P H V A M . . . . S A E N V V .
AALB006666-PA/1-121 C . T D D Y V I S I M C C G A I G A G P G T R V T E T D F S K P Y P E C C P Q L V R D D G P V T G D G K P E
AATE014945-PA/1-116 C . G K D Y S L S V V C C G A I G A G P G F I I T P T D Y S K P Y P E C C P Q L V M . . . . S E N L I .

```

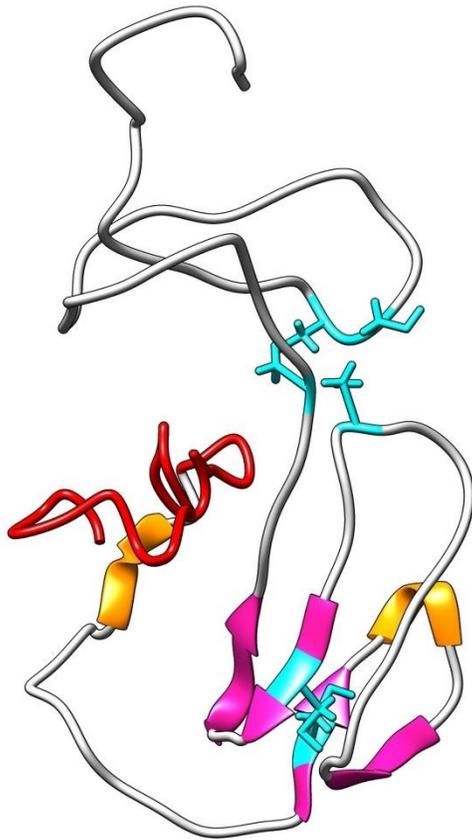
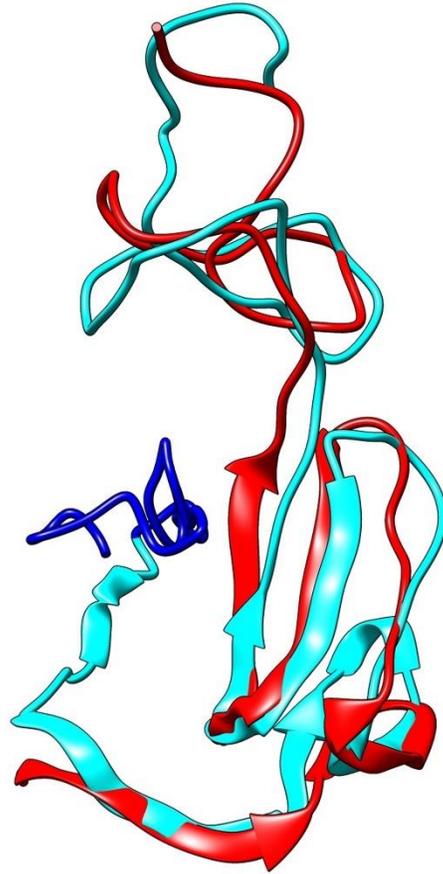
Figura 29. Alineamiento de la secuencia de los ortólogos de la proteína del gen con ID<sub>VB</sub> AALB006666. La familia del gen con ID<sub>VB</sub> AALB006666 únicamente está presente en mosquitos del género *Anopheles*. En la figura se muestra un alineamiento hecho con las

secuencia de las proteínas de estos genes. Las letras negras indican un porcentaje de conservación <70%, las letras rojas indican un porcentaje de conservación >70% y <100%, letras blancas con fondo rojo significan 100% de coincidencia. Las 6 cisteínas características de esta familia de genes se encuentran indicadas en la parte superior del alineamiento con una letra C y su orden (1-6). La barra roja en la parte inferior del alineamiento indica la región de la secuencia que pertenece a la péptido señal, la barra azul indica la región de la secuencia que corresponde a la proteína madura. En la figura se puede observar que la región de la péptido señal es un poco variable en cada especie, sin embargo, la proteína madura presenta un alto grado de conservación entre todas las especies.

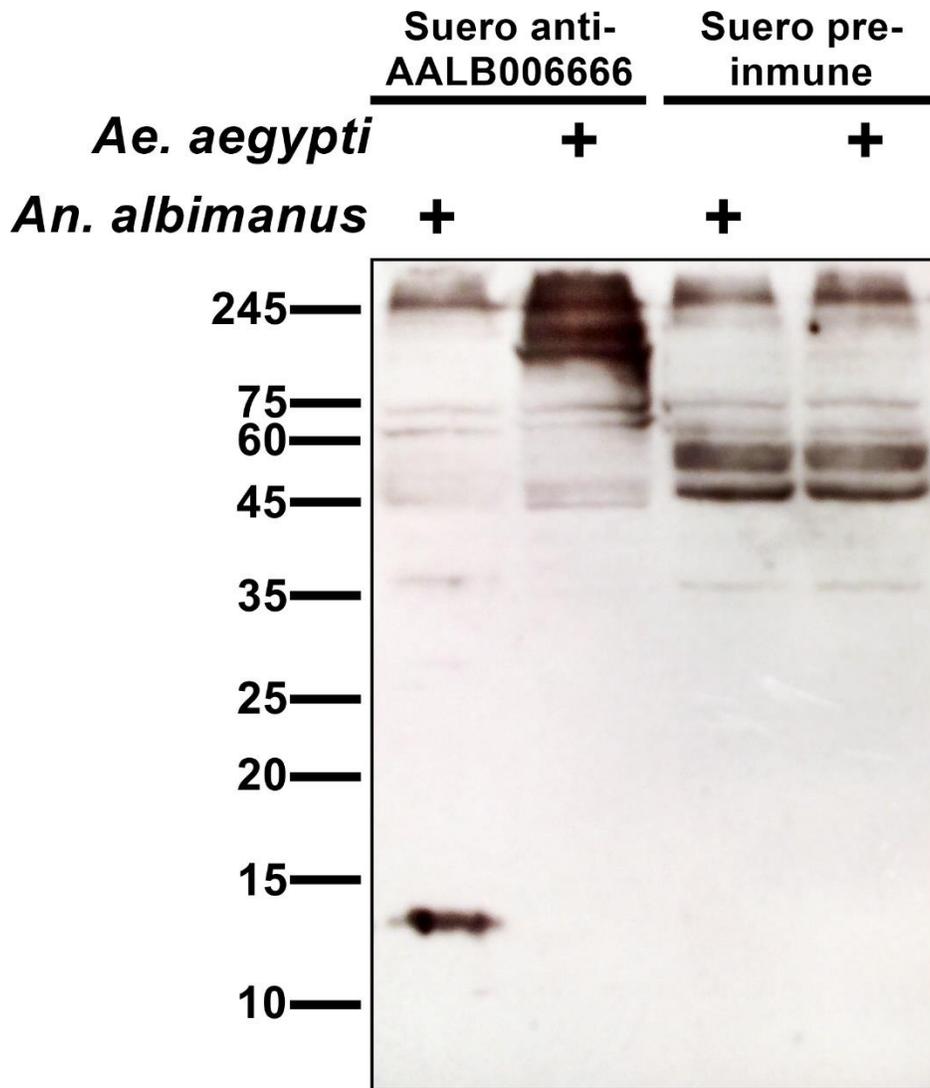
De manera interesante, el colágeno  $\alpha$  tipo 2 (ID<sub>PDB</sub> 1U5M) es una de la proteína que contiene el dominio del Factor de Von Willebrand tipo C (VWC); este dominio está presente en múltiples proteínas involucradas en procesos de señalización y de formación de matriz extracelular, y su principal característica es que contiene 10 residuos de cisteína. La proteína AALB006666 solo contiene 6 de los 10 residuos de cisteína, no obstante, un análisis de la estructura secundaria sugiere que son suficientes para obtener el plegamiento correcto de la lámina  $\beta$  típica de las proteínas con dominio VWC (**Figuras 30,31**). Adicionalmente, el modelo 3D de AALB006666 obtenido muestra que la estructura terciaria presenta un alto grado de conservación con el colágeno  $\alpha$  tipo 2 (**Figura 31**), sugiriendo que la proteína AALB006666 posiblemente tiene funciones similares.

La secuencia de la proteína AALB006666 posee una péptido señal, lo que sugiere que puede ser secretada, sin embargo, se desconoce que otros órganos adicionales al corazón la producen, si realmente es secretada, o cuál es su destino una vez secretada. Para responder todas estas preguntas, se decidió hacer un anticuerpo contra la proteína AALB006666 y usarlo para rastrear la localización de la proteína y sus posibles cambios durante un reto inmune. El anticuerpo se obtuvo de un conejo inmunizado con un péptido sintético con la secuencia del carboxilo terminal de la secuencia, y para comprobar que la inmunización fue exitosa, se hizo un WB utilizando extractos de proteína de mosquitos hembra *An. albimanus* y *Ae. aegypti*. En la **Figura 32** se puede observar que el suero de conejo inmunizado reconoce una proteína de 13kDa, el cual corresponde al peso esperado de la proteína AALB006666, indicando que la inmunización fue exitosa y que se generaron anticuerpos contra la proteína. Por otro lado, en los extracto de proteína de *Ae. aegypti* no se detectó ninguna proteína, esto debido a que como se mencionó anteriormente esta proteína es exclusiva de anofelinos.



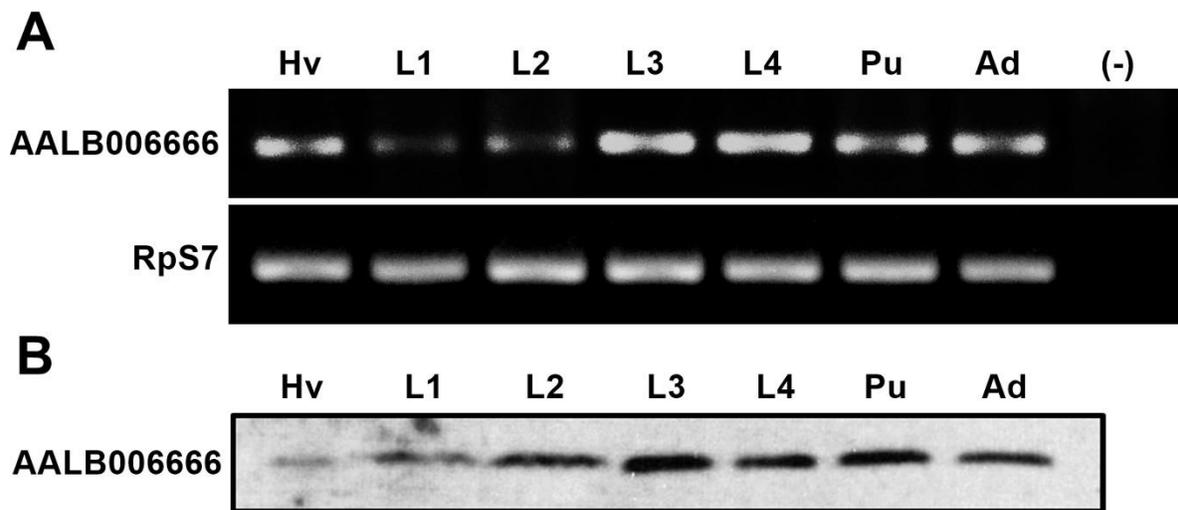
**A****B**

**Figura 31. Estructura terciaria de la proteína AALB006666.** La secuencia de la proteína putativa del gen con IDVB AALB006666 se usó para obtener la estructura terciaria por modelado por homología usando el servidor I-TASSER. **A)** Modelo 3D de la proteína AALB006666, en donde la región marcada en rojo indica la péptido señal, las regiones en naranja indica las regiones de  $\alpha$ -hélices, las magentas las láminas  $\beta$ , las grises las regiones de estructura aleatoria (coil) y los residuos marcados en azul cian indican las cisteínas características del dominio del factor de Von Willebrand tipo C. **B)** Alineamiento tridimensional de la proteína AALB006666 con su templado homologo con mayor score de I-TASSER, en azul cian se muestra la proteína madura AALB006666 y en azul marino la región de la péptido señal; en rojo se muestra la estructura del colágeno  $\alpha$  tipo 2.



**Figura 32. Inmunoreactividad de un suero de conejo inmunizado contra un péptido con la secuencia de la región del carboxilo terminal de la proteína AALB006666.** Un conejo fue inmunizado contra la región del carboxilo terminal de la proteína AALB006666. La inmunoreactividad del suero fue probada por WB usando 30µg de proteína de extractos de mosquitos *An. albimanus* y *Ae. aegypti* hembra completos los cuales se separaron por SDS-PAGE en condiciones desnaturalizantes. En el carril 1 y 2 se muestra la membrana que fue incubada con el suero anti-AALB006666, en donde se puede observar que el suero está reaccionando contra una proteína de *An. albimanus* de 13kDa el cual es el peso esperado de la proteína AALB006666. En los carriles 3 y 4 se muestra la membrana que fue incubada con el suero pre-inmune, en donde no se observa reactividad específica.

Una información valiosa para conocer la importancia de un gen dentro de la vida de un organismo, es saber en qué momento y bajo qué condiciones se expresa, por lo cual se decidió evaluar la expresión de AALB006666 a nivel transcripcional y de proteína durante la ontogenia del mosquito. Sorprendentemente los resultados obtenidos demuestran que el gen se expresa durante toda la vida del mosquito, desde huevo hasta la edad adulta (**Figura 33**), sugiriendo que el gen posiblemente juega un papel fundamental en la biología del mosquito.



**Figura 33.** El gen con ID<sub>VB</sub> AALB006666 se expresa durante todo el ciclo de vida de *An. albimanus*. **A)** RT-PCR del gen AALB006666 de los diferentes estadios de *An. albimanus*. **B)** Western Blot de 30µg proteína de extractos de los diferentes estadios de *An. albimanus*. (Hv) huevo, (L1) estadio larvario 1, (L2) estadio larvario 2, (L3) estadio larvario 3, (L4) estadio larvario 4, (P) pupa, (Ad) adulto hembra. La expresión constitutiva a través de todas las etapas de la vida del mosquito sugiere que el gen AALB006666, podría estar jugando un papel fundamental para la vida del mosquito.

Por otro lado, también es importante conocer en que órganos y células se expresa el gen AALB006666, por lo cual se decidió evaluar la expresión de este gen en órganos y tejidos del mosquito adulto. Los resultados indican que la proteína AALB006666 está presente principalmente CPs, hemocitos y de manera escasa en cuerpo gordo (**Figura 34**), de manera interesante, se puede observar que la proteína está distribuida uniformemente en las células, no obstante, parece ser más abundante sobre la membrana celular. Este resultado sugiere que al igual que su homólogo el colágeno  $\alpha$  tipo 2, AALB006666 puede estar presente la matriz

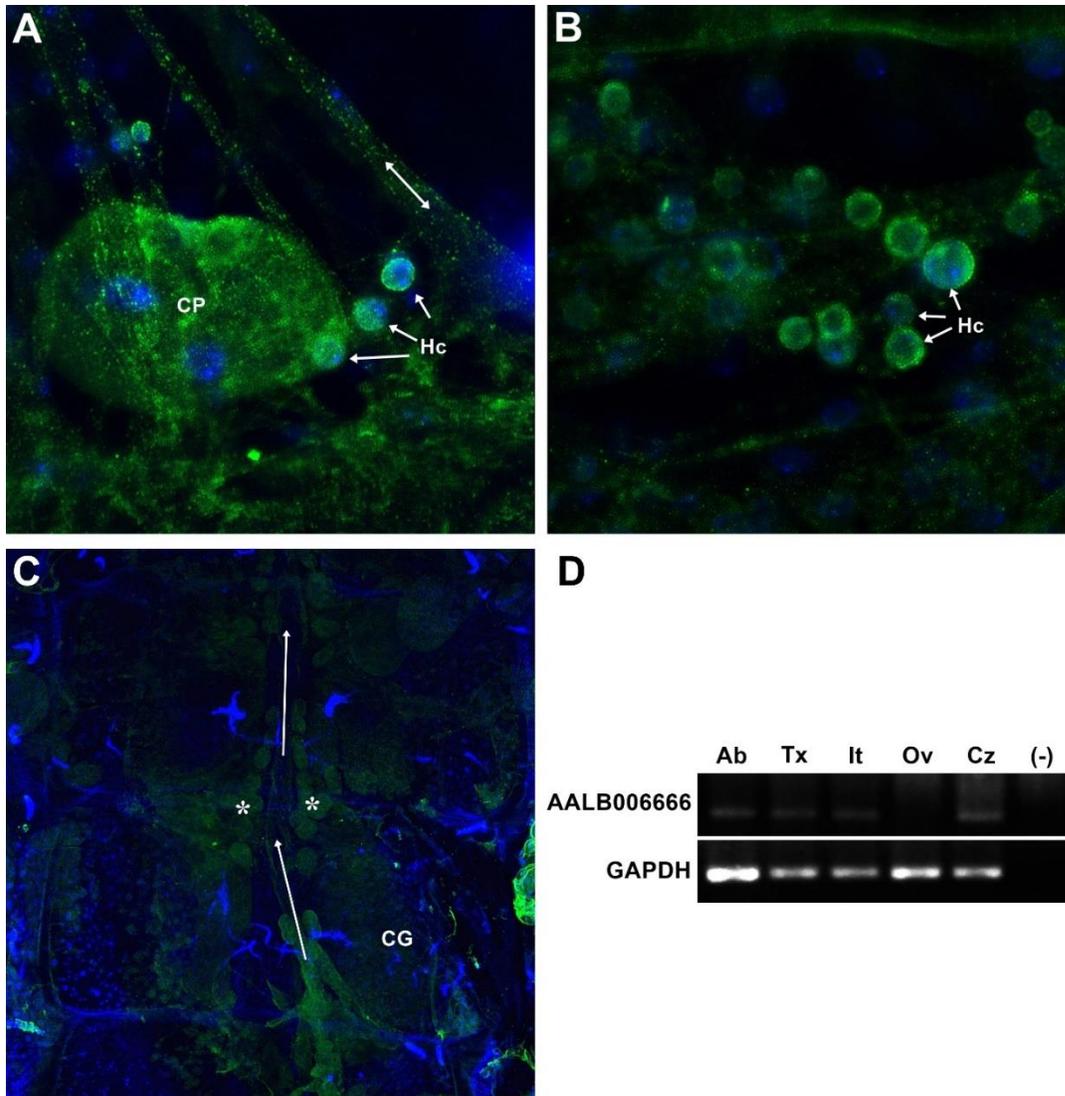
extracelular de las células, sin embargo, es importante mencionar que la proteína contiene un péptido señal, y es muy probable que las CPs, hemocitos y cuerpo graso secreten la proteína y que está se encuentre en grandes cantidades en la hemolinfa. Un análisis por RT-PCR muestra que en abdómenes sin corazón, tórax y corazón se expresa el gen AALB006666, no obstante, el corazón es el órgano que aparentemente expresa más fuertemente el gen (**Figura 34**), indicando nuevamente que el corazón posiblemente es la principal fuente de producción de AALB006666. En adición, cabe mencionar que los abdómenes están compuestos básicamente por la cutícula y cuerpo graso; el tórax contiene grandes cantidades de cuerpo graso, y además en ambos los hemocitos sésiles pueden estar adheridos. Ambos, cuerpo graso y hemocitos son los principales órganos inmunocompetente, lo cual sugiere fuertemente que AALB006666 podría estar jugando un papel en la respuesta inmune del mosquito.

La evidencia obtenida en el transcriptoma indica que el gen AALB006666 podría estar involucrado en la respuesta inmune contra hongos, debido a que el zimosan fue usado como el inductor de la respuesta inmune en los mosquitos utilizados para obtener los corazones para el transcriptoma. Para verificar esta información se decidió validar la expresión del gen AALB006666 por qRT-PCR, usando muestras de corazones de mosquitos retados con zimosan a las 6, 12 y 18 hpi, no obstante, no se logró encontrar cambios en la expresión en ningún tiempo post-inoculación (**Figura 35**). Debido a que no se observaron cambios en el corazón, y a que las evidencias indican que además del corazón, los hemocitos y el cuerpo graso también expresan AALB006666, se decidió evaluar la expresión de la proteína en mosquitos completos (que contienen, corazón, hemocitos y cuerpo graso), y así incrementar la probabilidad de observar algún cambio, sin embargo, tampoco se observaron cambios (**Figura 35**).

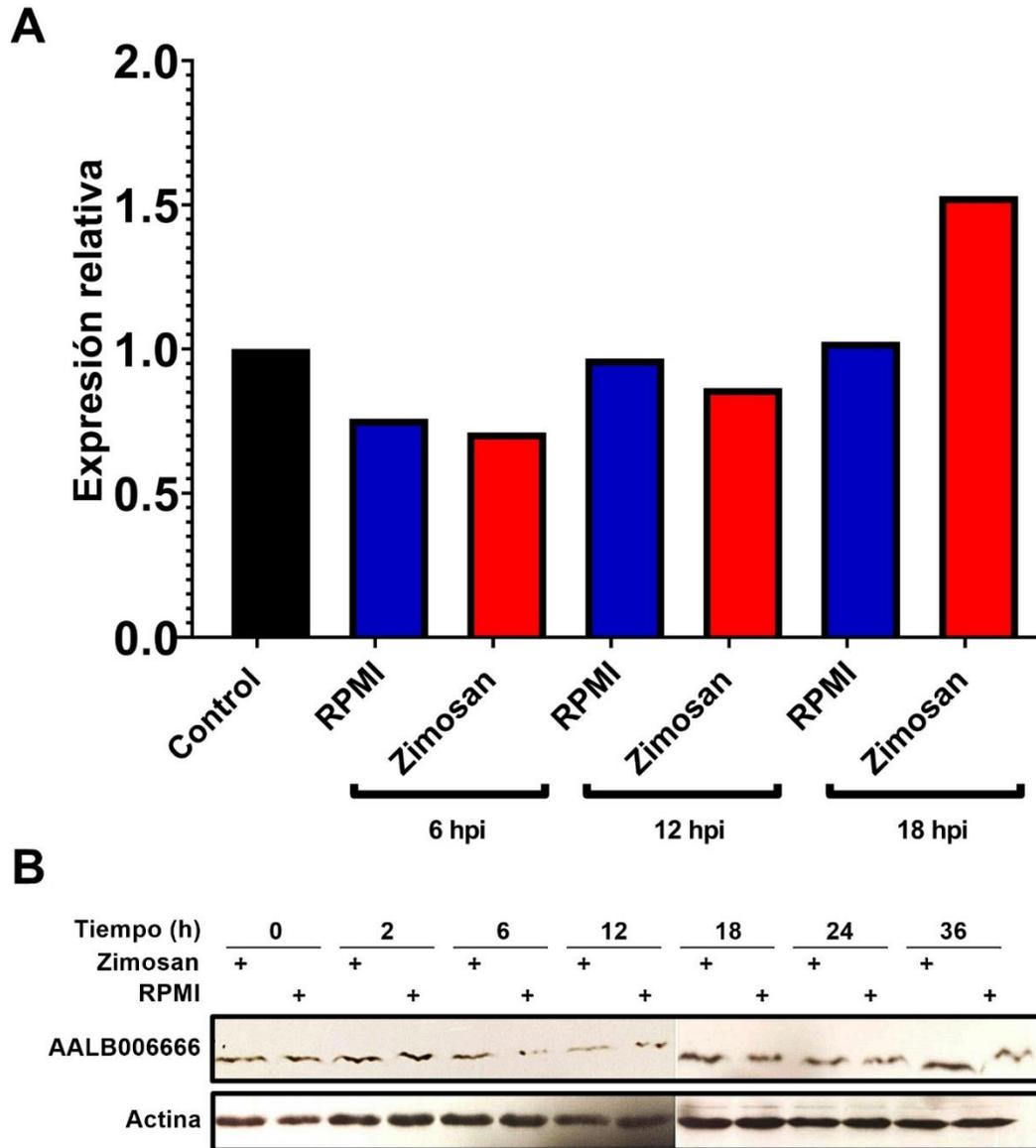
La secuencia de la proteína AALB006666 contiene un péptido señal, sugiriendo que puede ser secretada en la hemolinfa, por lo cual se decidió evaluar si la proteína se encontraba en hemolinfa, o si esta incrementaba su abundancia después de un reto inmune. Tal y como se esperaba, la proteína es abundante en hemolinfa, de hecho, el tiempo de exposición de la placa del WB para el revelado solo fue de 1 segundo (**Figura 36**), y la señal obtenida es equivalente a el tiempo de exposición de 5 minutos en WB hechos con extractos de proteína

de mosquitos completos. Este resultado sugiere que la gran mayoría de la proteína es secretada a la hemolinfa, no obstante, no se observaron cambios en la abundancia de la proteína en la hemolinfa de mosquitos retados con zimosan. Adicionalmente, se decidió evaluar si un reto inmune cambia la localización de la proteína en el mosquito, por lo cual se decidió hacer una inmunofluorescencia en abdómenes de mosquitos retados con zimosan. Sorprendentemente, se observó que el reto inmune con zimosan favorece la acumulación de la proteína AALB006666 en el corazón, mientras disminuye la señal en cuerpo graso (**Figura 37**). Este resultado es muy interesante debido a que la señal se observa no solo en las CPs, sino que también en vaso dorsal y músculos alares, sugiriendo que puede estar jugando un papel importante en esta región durante un reto inmune, sin embargo, este resultado se discutirá más adelante.

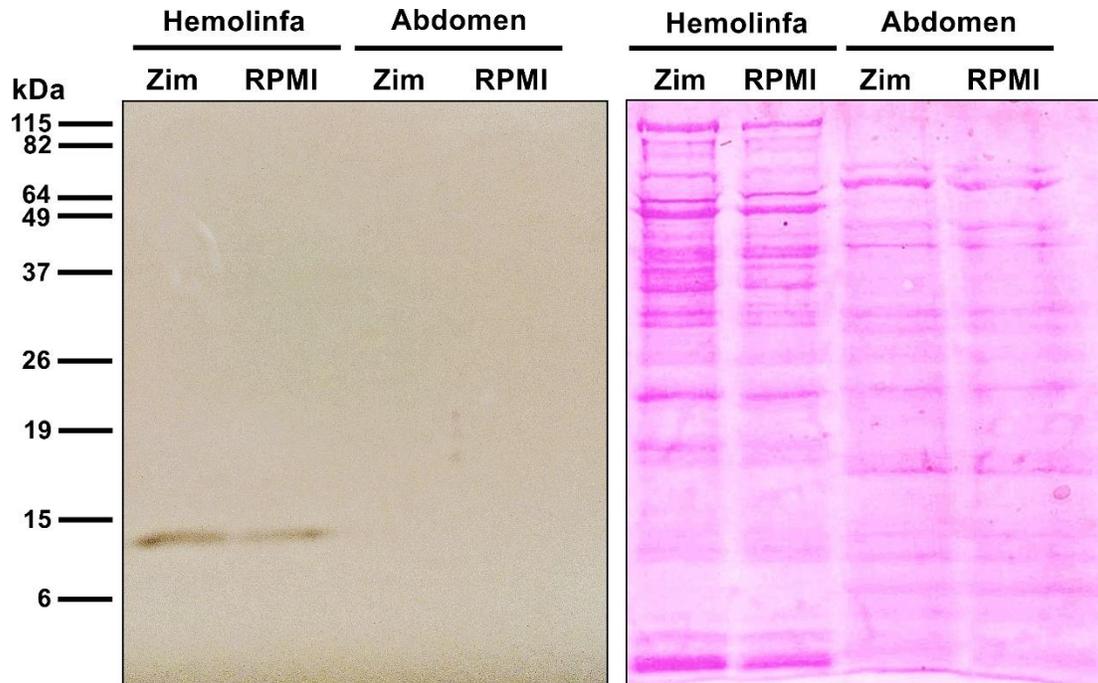
El  $\beta$ -1,3-glucano (zimosan) es solo uno de los componentes que conforman la pared celular de las levaduras, y a su vez las levaduras poseen componentes diferentes a los de la pared celular de otros microorganismos como las bacterias. Por consiguiente, es importante evaluar si la expresión de AALB006666 se puede modificar con un reto inmune usando inductores diferentes al zimosan. En primer lugar se evaluó la expresión por qRT-PCR, en corazones de mosquitos inoculados con *S. cerevisiae*, *E. coli*, y *M. luteus* a las 12hpi, sin embargo, no se observaron cambios en la expresión (**Figura 38**), sugiriendo que AALB006666 posiblemente no cambia su expresión transcripcional durante un reto inmune. Adicionalmente, se evaluó la expresión de la proteína AALB006666 por WB en extracto de proteína de mosquitos retados con *S. cerevisiae*, *E. coli*, y *M. luteus* a las 12hpi. Sorprendentemente, se encontraron cambios aparentes en los mosquitos que fueron retados con *M. luteus*, en donde se logró observar una sobre-expresión con respecto al control (mosquitos inoculados con RPMI) (**Figura 39**), sugiriendo que posiblemente AALB006666 se expresa transcripcionalmente de manera constitutiva, pero que incrementa su abundancia a nivel de proteína y que se acumula en el corazón durante un reto inmune. Sin embargo, algunos de estos datos son obtenidos de ensayos únicos, y hacen falta réplicas y más experimentos para respaldar esta hipótesis.



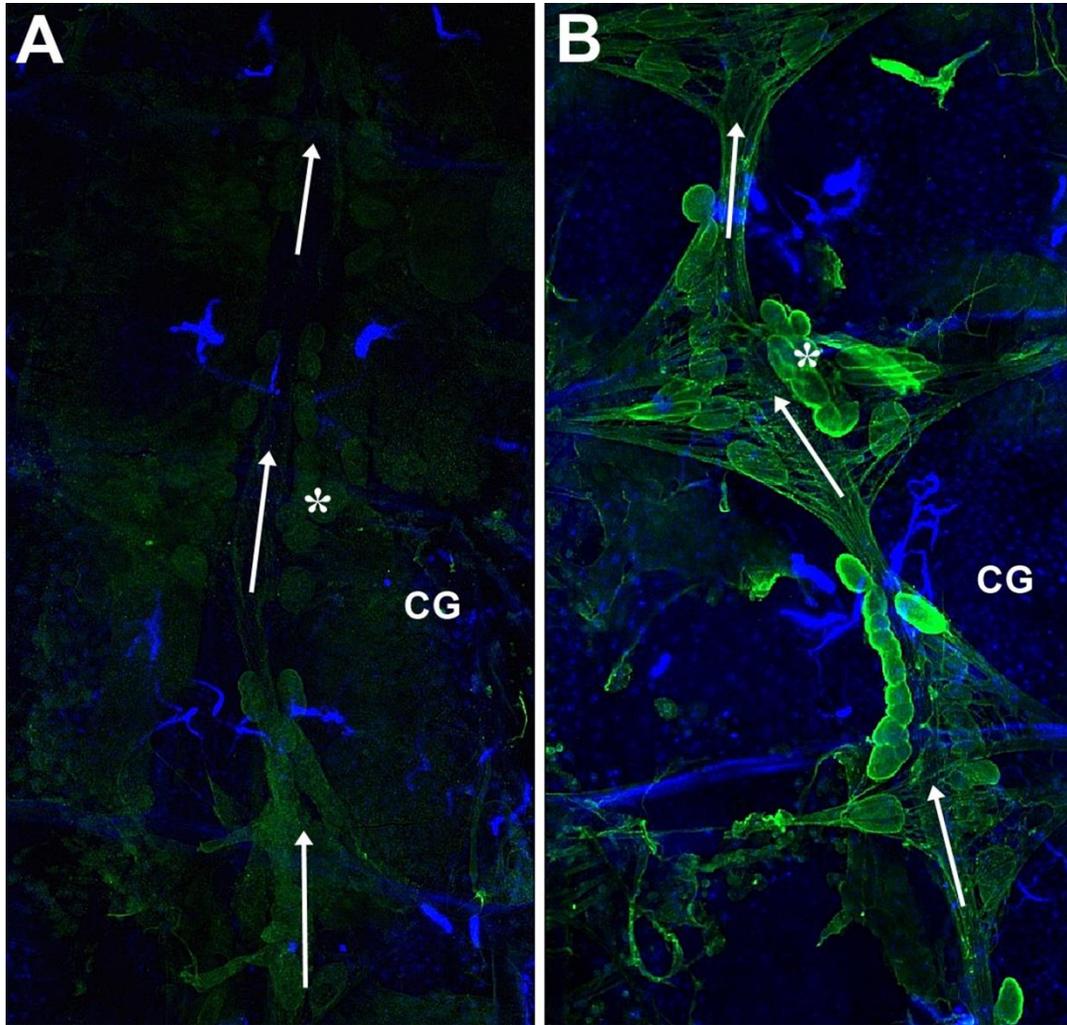
**Figura 34. El gen AALB006666 se expresa fuertemente en CPs y hemocitos.** Abdomenes de mosquitos hembra fueron utilizados para probar la inmunoreactividad el anticuerpo anti AALB006666. El anticuerpo mostró reactividad específica en **A)** CPs y **B)** hemocitos. Adicionalmente se observó señal tenue en cuerpo grasso, como se muestra en el panel **C**. La expresión transcripcional de AALB006666 fue evaluada en diferentes partes y órganos del mosquito. El panel **D** muestra el gel de agarosa de los productos de PCR, en donde se puede observar que el corazón es el órgano en donde se expresa más intensamente el gen AALB006666. Abreviaturas y símbolos de los paneles **A** y **B**: (CP) célula pericárdica, (Hc) hemocito, la flecha de doble cabeza indica los músculos alares del corazón. Abreviaturas del panel **C**: (CG) cuerpo grasso, (\*) CPs, las flechas indican el corazón en dirección hacia la partes anterior del mosquito. El color verde indica la presencia de AALB006666 (FITC), y en azul se muestran los núcleos de todos los tipos celulares del abdomen teñido con DAPI. Las imágenes son áreas representativas de 5 muestras diferentes. Las imágenes se obtuvieron en un microscopio confocal y son presentadas en un solo plano del z-stack,



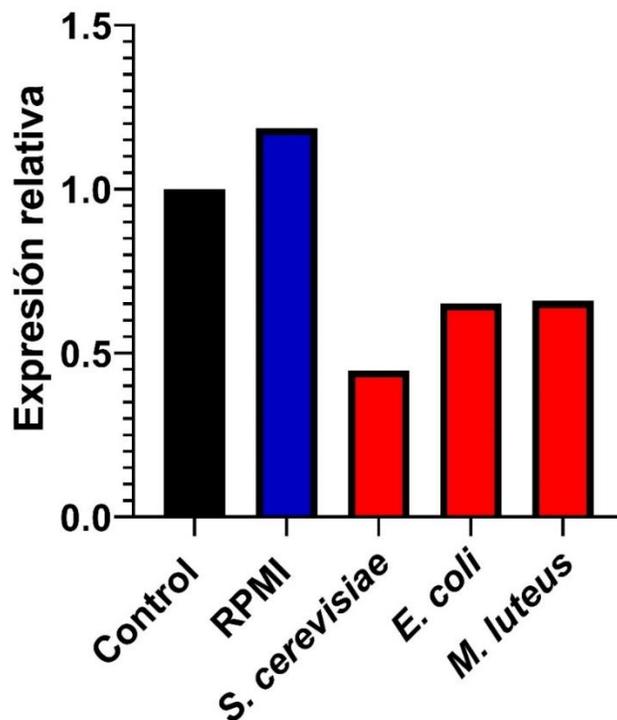
**Figura 35. Evaluación de la expresión del gen AALB006666 durante un reto inmune con zimosan.** Se evaluó la expresión transcripcional y proteica del gen AALB006666 en mosquitos hembra de 3 dpe (n=10) a diferentes horas post-inoculación (hpi) con RPMI (vehículo) o zimosan (RPMI + zimosan 10 µg/mL). **A)** Expresión relativa de AALB006666 obtenida por qRT-PCR; la expresión fue evaluada en corazones de mosquito (n=20) a las 6 h, 12, y 18 h post-reto con zimosan. Los datos fueron normalizados usando a GAPDH como gen de referencia, y la condición control (sin inocular) fue tomada como condición referencia. **B)** Western Blot de la proteína AALB006666 en mosquitos hembra a diferentes horas post-inoculación. La detección de AALB006666 se hizo usando el suero de conejo anti AALB006666 (dilución 1:1500) y actina se usó como control de carga, la cual se detectó usando un anticuerpo monoclonal de ratón comercial anti β-actina de humano (santa cruz) (dilución 1:1500). Los anticuerpos primarios fueron detectados usando anticuerpos de cabra anti ratón o anti conejo acoplado a peroxidasa de rábano. Ambos ensayos no mostraron cambios aparentes. Los resultados fueron obtenidos de experimentos únicos.



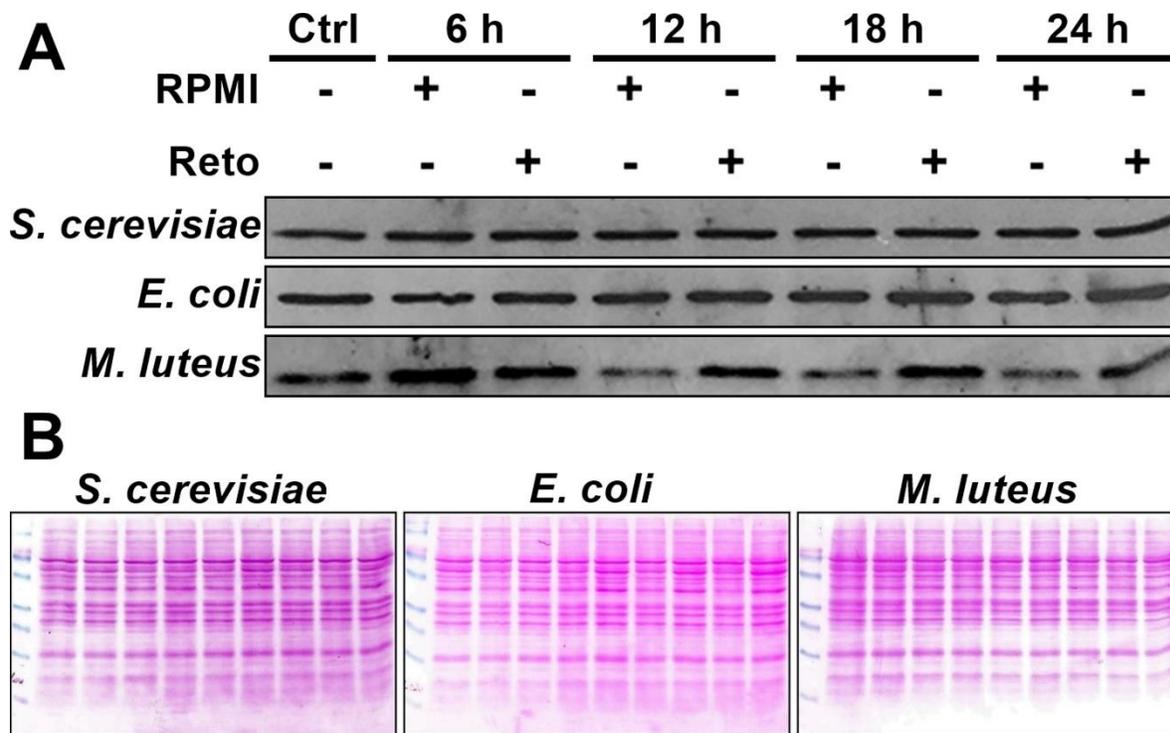
**Figura 36. La proteína AALB006666 se encuentra en altas concentraciones en la hemolinfa.** Extracto de proteína de hemolinfa de 30 mosquitos hembra o de 10 abdómenes (sin intestinos ni ovarios) fueron usados para comparar la abundancia de la proteína AALB006666 a las 18 hpi con zimosan. En el panel de la izquierda se muestra en WB el cual fue revelado usando el suero de conejo anti AALB006666 (1:1500), un anticuerpo de cabra anti conejo acoplado a peroxidasa de rábano (1:80,000), reactivo quimiolumincente ECL, y placas auto-radiográficas. El tiempo de exposición de la placa fue de 1 segundo, y se puede observar una señal muy intensa en los extractos de hemolinfa (carriles 1,2), sin cambios aparentes entre la condición control (inoculados con RPMI) y experimental (inoculados con zimosan 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Adicionalmente, se probaron 5 y 10 minutos de exposición de la placa auto-radiográficas, sin embargo no se logró apreciar señal en los extractos de abdómenes (carriles 3,4). En el panel de la derecha se muestra la membrana del ensayo, usada como control d carga debido a que las muestras de hemolinfa no poseen cantidades importantes de actina comparables a la de abdomen.



**Figura 37. La proteína AALB006666 es acumulada en las CPs después de un reto inmune con zimosan.** La expresión de la proteína AALB006666 fue analizada en abdómenes de mosquitos inoculados con RPMI (control vehículo) o zimosan (RPMI + zimosan 10 $\mu$ g/mL) a las 18 hpi. **A)** Abdomen de mosquito inyectado con RPMI, **B)** abdomen de mosquito inyectado con zimosan. En azul se muestran los núcleos de los distintos tipos celulares del abdomen teñidos con DAPI. En verde se muestra la señal de la proteína AALB006666 detectada con suero de conejo anti AALB006666 y anticuerpo secundario de cabra anti conejo acoplado a FITC. (CG) Cuerpo graso, (\*) CPs, las flechas están situadas en el vaso dorsal y apuntan hacia la parte anterior del mosquito. Las imágenes son áreas representativas de 5 muestras obtenidas por cada condición. Las imágenes fueron obtenidas en un microscopio confocal y se obtuvo la proyección en un solo plano del z-stack.



**Figura 38. Análisis de la expresión transcripcional del gen AALB006666 en mosquitos retados con diferentes microorganismos.** Se analizó la expresión transcripcional por qRT-PCR de AALB006666 en grupos de 10 mosquitos control (no inoculados), inoculados con RPMI (vehículo), inoculados con *S. cerevisiae*, *E. coli*, o *M. luteus*. El análisis de la expresión se realizó a las 12 hpi, GAPDH fue usado como gen de referencia, la condición control fue usada como condición referencia, y el análisis de la expresión fue realizado mediante el método de  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . Los resultados fueron obtenidos de un único ensayo.



**Figura 39. Análisis de la expresión de la proteína AALB006666 en mosquitos retados con diferentes microorganismos.** El análisis de la expresión de la proteína AALB006666 fue realizada en extractos de proteína obtenidos de grupos de 10 mosquitos previamente inoculados con *S. cerevisiae*, *E. coli*, o *M. luteus*. **A)** Western blot de la proteína AALB006666 a las 6, 12, 18 y 24 hpi y en mosquitos sin inóculo (Ctrl). **B)** Membranas teñidas con rojo de ponceau con las cuales se obtuvieron los WB, y son usadas como control de carga. El ensayo se realizó cargando 30µg de extracto de proteína por condición, y la detección se hizo usando suero de conejo anti AALB006666 (1: 1500), un anticuerpo secundario cabra anti conejo acoplado a peroxidasa de rábano (1: 80,000), reactivo quimioluminisciente ECL y placas auto-radiográficas. Las imágenes se obtuvieron con 5 minutos de exposición. Los resultados se obtuvieron de un ensayo único, en donde se puede observar un incremento en la expresión de AALB006666 en mosquitos retado con *M. luteus* a partir de las 12 h.

## 10. Discusión

Los insectos tienen un sistema circulatorio abierto, lo que significa que la hemolinfa fluye libremente alrededor de sus órganos de los insectos, los cuales están dentro de la cavidad hemocélica. La hemolinfa está compuesta de plasma y hemocitos; el plasma entre otras cosas contiene factores inmunes humorales y hemocitos que son los principales efectores de la respuesta inmunitaria celular. La hemolinfa transporta todos los componentes necesarios para el mantenimiento y la supervivencia de los tejidos, así como las moléculas de desecho. Sin embargo, la hemolinfa también es utilizada por diferentes patógenos para su diseminación a otros tejidos del insecto (por ejemplo, parásitos de la malaria), debido al flujo continuo de la hemolinfa que produce el vaso dorsal. Por esta razón, recientemente varios reportes han señalado la importancia del estudio de la interacción entre los sistemas inmunitario y circulatorio de los mosquitos (95,96,100).

El corazón tiene válvulas (ostias) que permiten que la hemolinfa fluya hacia la luz del vaso dorsal, convirtiéndose en un sitio de alto flujo de hemolinfa. Por lo anterior, las regiones periostiales son sitios estratégicos para la eliminación de patógenos que llegan a la cavidad hemocélica (que contiene la hemolinfa). Lo anterior se ha propuesto debido a que durante una infección, en *An. gambiae*, se ha observado la acumulación de hemocitos periostiales sésiles (hemocitos adheridos en las regiones periostiales), los cuales participaron activamente en la eliminación de bacterias mediante fagocitosis (96,97). Resultados similares fueron obtenidos en *An. albimanus* inyectados vía intra-hemocélica con *S. cerevisiae*, donde la mayoría de las levaduras melanizadas y no melanizadas fueron aglutinadas en las regiones periostiales. Sin embargo, estas no fueron fagocitadas, y sólo se observaron en las proximidades de las CPs (100), sugiriendo que la fagocitosis no es el principal mecanismo por el cual las levaduras son eliminadas en dichas áreas. En adición, se ha reportado que los esporozoítos de *Plasmodium* liberados en la hemolinfa del mosquito, son transportados por el flujo de la misma a la luz del vaso dorsal para llegar a las glándulas salivales. De manera interesante, muchos de estos esporozoítos son capturados y eliminados en las regiones del periostiales del corazón (95). No obstante, al igual que las levaduras acumuladas en el corazón de *An. albimanus*, estos esporozoítos raramente son fagocitados por los hemocitos (95,100), haciendo posible la idea de que ciertos microorganismos son eliminados de una

manera más eficiente por una respuesta inmune humoral local en la cual participan los hemocitos periestiales sésiles. En adición, estos hemocitos coincide con la localización de las CPs, las cuales presentan una importante actividad lítica contra *M. luteus* (100), lo sugiere la posible comunicación y cooperación entre hemocitos y CPs, para eliminar de manera más eficiente a los patógenos que invaden el hemocele.

Los hemocitos periestiales al igual que las CPs se encuentran posicionados en un lugar privilegiado para el sistema inmunológico, debido a que se encuentran flanqueando las ostias (zonas de alto flujo de hemolinfa), lo que permite una fácil interacción entre hemocitos, CPs y todo lo que se transportado por la hemolinfa, incluyendo patógenos. Curiosamente en *D. melanogaster* se ha descrito que las CPs y los hemocitos tienen el mismo origen embrionario, y es en el vaso dorsal, entre las CPs donde los hemocitos se diferencian y maduran en la etapa larvaria del insecto (82,159,160). Lo anterior hace posible la idea de que los marcadores inmunes previamente reportados en hemocitos y CPs (88–90,92,94), indiquen que las CPs sean un tipo celular inmunocompetente, con funciones similares a los hemocitos (con excepción de la fagocitos), sin embargo, esta posibilidad requiere de mayores estudios.

Previamente se obtuvo un transcriptoma de corazones de *An. albimanus* retados con zimosan (120), sin embargo, el ensamble original fue hecho utilizando como referencia el genoma de *An. gambiae*, limitando así la exploración de nuevos genes, o genes que se expresaran solo en *An. albimanus* y no en *An. gambiae*. Por lo anterior, se decidió hacer una validación de la presencia e identificación correcta de estos genes, usando la base de datos del genoma de *An. albimanus* de VectorBase, la cual ahora contiene los genomas de 16 mosquitos del género *Anopheles* (128). En esta nueva búsqueda se encontraron 43 genes asociados a inmunidad; la gran mayoría de estos genes coincidieron con la nueva búsqueda, sin embargo, hubo otros genes que desaparecieron como la *lisozima c-7*, que previamente había sido propuesto como un gen posiblemente expresado en las CPs (100). Por otro lado, en esta nueva búsqueda, no encontramos la presencia del gen de *Cec3* en la base de datos del VectorBase, sin embargo, este gen ha sido previamente reportado en *An. albimanus* (31,46,136). En una búsqueda más rigurosa, se encontró que la predicción del VectorBase para el transcrito de *Cec3* tiene recorrido el marco de lectura, lo que tiene como consecuencia una transducción *in silico* errónea cuyo producto es un gen con función desconocida y no *Cec3* como previamente fue

reportado. El ID<sub>VB</sub> de esta *Cec3* es AALB006949, y haciendo la búsqueda de este gen en la base de datos del transcriptoma se encontró que es uno de los genes más sobre-expresados en los corazones de mosquitos retado con zimosan. Sugiriendo que al igual que *Cec1*, *Cec3* podría estar jugando un papel importante en la respuesta inmune de las CPs, sin embargo, hacen falta más evidencias para poder demostrarlo.

Adicionalmente, a *Cec1* y *albLys c-1*, otros genes asociados a inmunidad fueron encontrados en el transcriptoma de corazones. Por ejemplo, genes de la familia de las proteínas con repetidos ricos en leucina llamadas LRIMs (entre ellos está LRIM1), los cuales han sido descritos como una de las familias más grandes e importante de los PRRs en mosquitos (161). Adicionalmente, 4 genes de la familia de las lectinas tipos c (CTL1, CTL4, CTLMA3, CTLGA3) y un gen de la familias de las TEPs (TEP15), fueron encontrados. De manera interesante, TEPs, CTLs y LRIMs han sido reportadas como proteínas que interactúan entre sí, para regular el reconocimiento, melanización y fagocitosis de microorganismos (161–163). Recientemente se ha reportado la agregación de hemocitos con el corazón de los mosquitos después de un reto inmune, la cual en parte es mediada por TEP1, TEP3 y TEP4 (164). Los hemocitos han sido los únicos reportados como productores de TEP1, no obstante, también se ha observado la presencia de esta proteína en las CPs de *An. gambiae* (94), sugiriendo que las CPs podrían estar participando en la regulación de la agregación de hemocitos en el corazón. Adicionalmente, en estos trabajos se evidenció que un knockdown de TEP1, 3, y 4 disminuye la agregación de hemocitos, acumulación de bacterias y capsulas melanóticas en las regiones periostiales (164). El complejo TEP1, CTL4 y LRIM1 interactúan entre sí para regular el proceso de melanización y evitar la auto-melanización durante la respuesta inmune, regulando la agregación de bacterias (163,165). Sorprendentemente, estos genes se encuentran presentes en el transcriptoma de los corazones de mosquito, sugiriendo fuertemente que el corazón y muy posiblemente mediante las CPs participa activamente en la respuesta inmune de las regiones periostiales.

Las especies reactivas de oxígeno juegan un papel muy importante en la respuesta inmune del mosquito (44), y se han asociado como un componente clave de la susceptibilidad de infecciones por *Plasmodium* en mosquitos (45). Por otro lado, altas concentraciones de especies reactivas de oxígeno son tóxicas, por lo que se regulan por enzimas como la

superóxido dismutasa (SOD) (166,167) y la glutatión S transferasa (168). De manera interesante, en el transcriptoma fueron encontrados los genes CuSOD2, CuSOD3 y GSTU1; además, previamente se ha reportado que las CPs de *An. gambiae* juegan un papel importante en la homeostasis de las especies reactivas de oxígeno en el mosquito, y que son un componente clave de la susceptibilidad a la infección por *Plasmodium* (45), lo que sugiere que las CPs podrían jugar un papel importante en la regulación de la respuesta inmune sistémica.

Otra de las familias más representadas en el transcriptoma fue la de las serpinas, las cuales participan de manera importante en la regulación de la respuesta inmune (169–171). La *SRPN10* fue uno de los genes más expresados en el transcriptoma, y cuya expresión en el corazón de *An. albimanus* fue confirmada por PCR. Este resultado, concuerda con lo reportados en *An. gambiae* y *An. stephensi*, donde solo los hemocitos y las CPs sobreexpresan *SRPN10* durante un reto inmune (88,89). Al igual que las serpinas, existe la posibilidad de que el corazón de los mosquitos exprese otras familias de genes como los receptores scavenger, los cuales están asociados al reconocimiento de PAMPs y homeostasis de la respuesta inmune (172–175). No obstante, las funciones de todos estos genes han sido poco estudiadas, y en el presente estudio solo se decidió evaluar la expresión de *albLys c-1* y *CecI* debido a que son genes efectores de la respuesta inmune cuyas funciones han sido ampliamente descritas. Genes adicionales identificados en el transcriptoma de los corazones, que forman parte de las vías de señalización Toll, IMD y JAK/STAT, son candidatos muy interesantes para estudios futuros.

Las lisozimas se consideran componentes esenciales del sistema inmunológico de los mosquitos (176). En el mosquito africano *An. gambiae*, la familia de lisozimas de tipo c está compuesta por ocho lisozimas (c-1 a c-8); la mayoría de ellas con funciones que no han sido suficientemente estudiadas (130). En el presente estudio, los análisis bioinformáticos permitieron identificar tres genes de lisozima en *An. albimanus*: AALB004163 que es el ortólogo de la secuencia de lisozima c-6 de *An. gambiae*; AALB005752 es el ortólogo de la lisozima c-7 *An. gambiae* y lisozima c-7B de *Ae. aegypti*; y AALB004517 se agrupa con la lisozima con ID<sub>VB</sub> ADAC005092 de *An. darlingi* (lisozima c-1) y con las lisozimas c-1 y c-2 de *An. gambiae*. La estrecha relación de las lisozimas tipo c de *An. albimanus* y *An. darlingi*

no fue sorprendente (**Figura 8**), debido a que se trata de mosquitos americanos que divergieron de los mosquitos africanos (*An. gambiae*) hace millones de años (128). No obstante, a pesar de que cada especie tiene un número distinto de lisozimas, las lisozimas c-1 están altamente conservadas, posiblemente por que cumplen funciones esenciales en la respuesta inmune de los mosquitos.

Inicialmente, se intentó identificar la presencia de albLys c-1 mediante el uso de un anticuerpo comercial anti-lisozima de clara de huevo de gallina por ensayos de inmunofluorescencia. Curiosamente, fue observada una señal fuerte y específica solo en las CPs, pero cuando se realizó un Western blot, solo se detectó una banda de aproximadamente 90 kDa (**Figura 21**). De manera interesante, la lisozima c-6 de *An. gambiae* tiene un peso molecular de 100.62 kDa (130), del cual el ortólogo en *An. albimanus* es la proteína con ID<sub>VB</sub> AALB004163 con un peso molecular putativo de 106,21 kDa, sugiriendo que posiblemente el anticuerpo está reconociendo la lisozima c-6 de *An. albimanus*. Adicionalmente, los ensayos de inmunofluorescencia mostraron una señal constitutiva que no cambió bajo ninguna condición experimental (mosquitos no inyectado, e inyectados con RPMI o *M. luteus*), lo cual correlaciona con lo reportado en la lisozima c-6 de *An. gambiae* (130). Como indicamos anteriormente, la proteína predicha de lisozima c-6 carece de péptido señal, sugiriendo que podría almacenarse en las CPs y posiblemente desempeñar funciones de degradación en los lisosomas, no obstante, esta posibilidad requiere de mayores estudios.

En adición a lo anterior, el análisis de la secuencia indica que esta lisozima c-6 es la única de las tres lisozimas de *An. albimanus* que tiene sitios de unión a calcio, y tiene conservados 3 dominios con sus centros catalíticos característicos de las lisozimas, sugiriendo que esta lisozima podría realizar funciones como muramidasa. Curiosamente, las lisozimas con funciones digestivas poseen sitios de unión a calcio, los cuales les brindan estabilidad a bajo pH, a altas temperaturas y a degradación por proteasas (131–134,177–181). De manera interesante, estas condiciones son las mismas que ocurren en los lisosomas, donde se sugiere que se puede localizar la lisozima c-6 de *An. albimanus*, lo que indica que esta lisozima podría jugar un papel en la degradación de desechos celulares, posiblemente provenientes de la destrucción de bacterias durante la respuesta inmune del mosquito. Recientemente, se ha reportado que la depleción de CPs en *D. melanogaster*, produce una desregulación de la

respuesta inmune por un incremento en los niveles de peptidoglicano en hemolinfa producidos por la eliminación de bacterias en el hemocele (182). En este trabajo los autores sugieren que las CPs remueven el peptidoglicano de la hemolinfa, y lo eliminan en los lisosomas, lo que posiblemente podría ser realizado por una lisozima de *D. melanogaster*. De manera interesante, estos datos correlacionan con las evidencias mostradas en este trabajo, sin embargo, para probar esta hipótesis son necesarios más análisis.

En los insectos, incluidos los mosquitos, las lisozimas se sobre-expresan después de una exposición a bacterias Gram positivas y Gram negativas (130,151,154,183–187), lo cual correlaciona con los resultados en el corazón de *An. albimanus*, en donde tanto *E. coli* como *M. luteus* indujeron una fuerte sobre-expresión de *albLys c-1* en muestras de corazón (aproximadamente, doce y diecisiete veces, respectivamente) (**Figura 15**). En cuanto a si los hongos pueden inducir la expresión de lisozima en mosquitos, hasta la fecha no se dispone de información. En este trabajo, a pesar de presentar una diferencia significativa con las muestras de control ( $P > 0.05$ ), la sobre-expresión de *albLys c-1* en corazones de mosquitos retados con *S. cerevisiae* fue particularmente baja (aproximadamente tres veces), lo que sugiere que las levaduras no son un inductor eficaz de la expresión del gen de la lisozima bajo estas condiciones experimentales. Sin embargo, además de la actividad muramidasa, la lisozima de clara de huevo de gallina también presenta una actividad quitinolítica bastante fuerte al hidrolizar enlaces  $\beta$ -1,4 de quitodextrinas entre residuos de N-acetil-D-glucosamina (188). La masa seca de la pared celular en *S. cerevisiae* contiene solo un 2% de N-acetil-glucosamina (quitina) (189), por lo tanto, esta baja cantidad de quitina posiblemente es insuficiente para inducir una mayor expresión de *albLys c-1*. En este contexto, será necesario realizar más estudios utilizando diferentes cantidades de N-acetil-glucosamina u hongos, con el objetivo de determinar la posible participación de la lisozima durante la respuesta inmune a los hongos.

Durante la respuesta inmune humoral del mosquito, diferentes componentes participan en la lisis de un amplio número de patógenos (48,184,190). Previamente, ha sido reportada la actividad lítica en extracto de corazones de *An. albimanus* contra *M. luteus* (100), la cual en gran parte podrían estar mediada por *albLys c-1*, en cooperación con otros componentes como los AMP (191). Para demostrar la participación específica de la lisozima (*albLys c-1*)

en el proceso lítico, fueron realizados zimogramas que permitieron separar proteínas y detectar solo aquellas que tienen actividad hidrolasa contra enlaces  $\beta$ -1,4-glicosídicos en el PGN (111,112,192). El genoma de *An. albimanus* contiene tres genes para las lisozimas de tipo c: lisozima c-1 (AALB004517), lisozima c-6 (AALB004163) y lisozima c-7 (AALB005752), con una peso molecular putativo (proteínas maduras sin péptido señal) de 13,41 kDa, 106,21 kDa y 27,24 kDa respectivamente. En el zimograma solo se observó una proteína con tal característica, la cual correspondía al peso molecular esperado para albLys c-1, sugiriendo su participación en el proceso lítico de bacterias Gram-positivas, y comprobando lo sugerido por Hernández-Martínez et al., 2013 (100). Adicionalmente, se observó una mayor actividad lítica (en zimogramas) en los extractos de corazones procedentes de mosquitos inyectados con *M. luteus*, que correlaciona con la sobre-expresión transcripcional de *albLys c-1* en condiciones similares. Estos resultados sugieren fuertemente la participación del corazón del mosquito durante la respuesta inmune, a través de albLys c-1 como factor bacteriolítico.

Adicionalmente, fueron hechos zimogramas con *S. cerevisiae* y *E. coli* para probar la especificidad de la actividad lítica de albLys c-1. Las muestras fueron obtenidas de intestinos, debido a que es un órgano que expresa lisozimas (193) y es más fácil de obtener que los corazones. Tal y como se esperaba, albLys c-1 solo presenta actividad lítica contra *M. luteus*, sin embargo, en el zimograma hecho con *E. coli* se logró observar actividad lítica en una proteína con peso molecular cercano a los 24 kDa (**Figura 19**). Este peso molecular coincide con el de la proteína PGRP-LB (23.3 kDa, ID<sub>VB</sub>: AALB009363), la cual se ha reportado como un receptor con actividad de muramidasa contra bacterias Gram (-) que puede limitar la infección por *Plasmodium* (194–202). De manera interesante, este es uno de los genes de inmunidad encontrados en el transcriptoma, sugiriendo que podría estar expresado en corazones, no obstante hacen falta más estudios para demostrarlo.

Reportes previos, han sugerido la presencia de lisozima en las CPs de *Calliphora erythrocephala*, *Manduca sexta* y *Leiobunum rotundum* (80,203,204). Sin embargo, las evidencias se obtuvieron mediante ensayos inmunocitoquímicos, y ensayos líticos clásicos, que no permiten distinguir si las CPs sintetizan la lisozima o la toman de la hemolinfa. En el presente trabajo se demostró que las CPs de *An. albimanus* expresan un gen de lisozima

(*albLys c-1*) por el RNA-FISH, evidenciando por primera vez la expresión de un gen relacionado con la inmunidad en las CPs de este mosquito. Por otro lado, reportes previos en diferentes insectos indican que las CPs aumentan los niveles de lisozima intracelular después de un reto inmune (80,203,204), y en *An. gambiae* se evidenció la sobre-expresión de las *lisozimas c-1* y *c-2* después de un reto inmune (130). Estas evidencias correlacionan con los resultados obtenidos en este trabajo, en donde se observó una sobre-expresión de *albLys c-1* en las CPs, sugiriendo que estas células participan en la respuesta inmune mediante la sobre-expresión de *albLys c-1*. Curiosamente, en *C. erythrocephala* se reportó que las CPs sintetizan y liberan lisozima en respuesta a patógenos que invaden el hemocele (80). Debido a que *albLys c-1* tiene péptido señal, cabe la posibilidad de que sea secretada para participar en la lisis de patógenos atrapados en el corazón, no obstante, son necesarios más estudios para abordar esta hipótesis.

Las cecropina fue el primer péptido antimicrobiano descrito (142,205,206), desde entonces las cecropinas se han encontrado en muchas especies, siendo uno de los AMPs más abundante en los insectos (207). En el análisis del transcriptoma, se encontró la expresión de *Cec1*, *Cec3* y *Cec4*, sin embargo, *Cec1* fue el gen más sobre-expresado, sugiriendo que es un gen importante para la respuesta inmune del corazón de *An. albimanus*. Los resultados obtenidos validaron su expresión, y demostraron que *Cec1* es expresada de manera constitutiva en el corazón de *An. albimanus*, cuyo nivel de expresión fue de 0.5 veces más alto que en el cuerpo completo de mosquito. Curiosamente, se ha reportados que el cuerpo graso es el principal productor de cecropinas (157), de tal manera que gran parte del mRNA del mosquito completo pertenece al cuerpo graso del mosquito, entonces los niveles de expresión de *Cec1* observados corresponden en gran medida a la expresión basal del cuerpo graso. Lo anterior sugiere que el corazón de *An. albimanus* puede ser un productor importante de *Cec1*.

Las cecropinas de insectos presentan actividad antimicrobiana contra un gran número de microorganismos (bacterias Gram (+), (-), y hongos), y son sobre-expresadas en presencia de los mismos (157,205,208,209). Los resultados presentados aquí correlacionan con lo previamente descrito, y en adición se observó que *S. cerevisiae* (levadura) es el inductor más eficiente de *Cec1*. Esto tiene congruencia con el transcriptoma, debido a que fue obtenido de corazones de mosquitos retados con zimosan, que es el principal componente de la pared de

levaduras (100). Reportes previos indican que las cecropinas presentan actividad eficiente contra levaduras (208,209), sugiriendo que *Cec1* puede tener funciones similares. Adicionalmente, se ha observado que *Cec3* es sobre-expresada durante la infección con *Plasmodium* (31,46), y además se ha demostrado que las cecropinas tienen actividad anti-*Plasmodium* (210–214). De manera interesante, se ha descrito que esporozoítos de *Plasmodium* son acumulados y posteriormente destruidos en las regiones periostiales del corazón de *An. gambiae* (95,96). El mismo fenómeno ha sido observado en *An. albimanus* (Datos no publicados) (**Figura 3**), sugiriendo que un componente anti-*Plasmodium* como la cecropina, podría estar mediando este proceso de eliminación del parásito, por lo que será de suma importancia realizar análisis más detallados en estudios futuros.

Los péptidos antimicrobianos presentan un tamaño menor a 50 aminoácidos (215), y por consiguiente el mRNA que los codifica poseen un tamaño promedio de 150 nt. Esto sugiere un problema cuando se quiere detectar la expresión *in situ* por RNA-FISH, debido a que muchas metodologías requieren de mRNAs de alrededor de 500 nt, o requieren de un múltiple etiquetado de las sondas para amplificar la señal, lo cual es costoso (216). El tamaño del mRNA maduro de *Cec1* es de 224 nt, por lo que no es posible detectarlo por RNA-FISH con múltiples sondas (110). Por lo anterior, se decidió utilizar RNA FISH-STICs, una variante del RNA-FISH que permite la amplificación de la señal y la detección de mRNA de tamaño pequeño como el de *Cec1* (156). Para demostrar que el RNA FISH-STICs puede detectar mRNA de tamaño pequeños como el de *Cec1* y posiblemente como el otros AMPs, se decidió utilizar abdómenes de mosquitos, debido a que el cuerpo graso es el principal productor de cecropina (157,217). Los resultados obtenidos demuestran una señal intensa en cuerpo graso (control positivo) y en CPs, indicando que el RNA FISH-STICs es una técnica que funciona para detectar mRNAs de tamaños pequeño. Adicionalmente, se realizó un experimento en corazones aislados, en donde no fue adicionada la sonda primaria al ensayo. El resultado obtenido muestra que solo existe señal cuando se agrega la sonda primaria, la cual es la que hibrida directamente con el mRNA, sugiriendo que el ensayo es específico.

Los resultados anteriores demuestran que las CPs expresan *Cec1* de manera constitutiva, sin embargo, los ensayos de qRT-PCR demuestran que el corazón puede sobre-expresar *Cec1* después de un reto inmune. De manera similar esto se observó en los ensayos de RNA FISH-

STICs, en donde se puede observar un fuerte incremento de la expresión de *Cec1* en las CPs después de un reto inmune. Adicionalmente, se observó un incremento en la señal en cuerpo graso, lo cual previamente ha sido reportado en *An. gambiae* y *An. stephensi* (140,157), sugiriendo que las CPs al igual que el cuerpo graso, son importantes productores de *Cec1* y son un tipo celular inmunocompetente. En *An. gambiae* se ha observado que cuando hay una sobre-expresión de *Cec1* a la par existe la sobre-expresión de otras cecropinas como la *Cec3*; esto debido a que ambas están reguladas por un mismo promotor (137). En *An. albimanus*, *Cec1*, *Cec3*, y *Cec4* se encuentran localizadas de manera similar que en *An. gambiae*, sugiriendo que las CPs podrían expresar otras cecropinas, sin embargo, esto es algo que tendrá que ser validado.

Por otro lado, el elemento más sobre-expresado del transcriptoma fue el gen con ID<sub>VB</sub> AALB006666. Inicialmente se consideró a AALB006666 como un posible péptido rico en cisteínas como las defencinas y drosomicinas (218), sin embargo, la secuencia peptídica no presenta características de un péptido antimicrobiano, pero sí contiene 6 residuos de cisteína característicos del dominio del factor VWC y una homología estructural con la colágena  $\alpha$  tipo II. De manera interesante las proteínas que contienen este dominio están relacionadas con funciones de coagulación, señalización, y estructura (219). Recientemente, en vertebrados se ha evidenciado que el factor de VWC puede participar en procesos de adhesión de plaquetas, reclutamiento de leucocitos, activación del complemento, etc (220). Adicionalmente, en varias especies de invertebrados se ha reportado que proteínas que contienen el dominio de VWC pueden participar en opsonización, coagulación, y otros procesos de la respuesta inmune, contra bacterias, virus y parásitos (221–223). Estas evidencias y la sobre-expresión de este gen en el transcriptoma (cuando los mosquitos son retos con zimosan), sugieren que AALB006666 podría participar en la respuesta inmune, por lo cual se decidió evaluar su expresión espacio temporal en condiciones basales y durante un reto inmune.

Un análisis de la expresión de AALB006666 durante la ontogenia del mosquito, demostró que el gen se expresa durante toda la vida del mosquito. En adición, se observó que el corazón los hemocitos son los principales productores de AALB006666, sin embargo, la mayor parte de la proteína se encuentra en la hemolinfa, sugiriendo que AALB006666 es secretada por

estas células. Esta observación correlaciona con lo reportado en mamíferos, en donde las proteínas con dominio del factor de VWC, son producidas y secretadas por células endoteliales y plaquetas (224,225), cuyos homólogos en los mosquitos son el corazón y los hemocitos, respectivamente, sugiriendo que AALB006666 podría tener funciones similares a las del factor de VWC.

El transcriptoma fue obtenido de corazones de mosquitos retados con zimosan, por lo cual se decidió validar la expresión de AALB006666 bajo las mismas condiciones, no obstante no se encontraron cambios en la expresión de mRNA y proteína. Lo que sugiere que lo observado en el transcriptoma puede deberse a causas ajenas al estímulo (zimosan). Por otro lado, también se decidió evaluar si microorganismos como *E. coli*, *M. luteus* y *S. cerevisiae* podrían inducir un cambio en la expresión de AALB006666. Los resultados preliminares demuestran que no existe ningún cambio a nivel transcripcional, sin embargo, si se observó una mayor cantidad de proteína en los mosquitos retados con *M. luteus*, lo que sugiere una regulación en la traducción y no en la transcripción. Los resultados hacen necesaria la realización de réplicas, utilizar concentraciones distintas de microorganismos y en general de mayores estudios para poder dilucidar este comportamiento.

Por último, los ensayos de inmunofluorescencia mostraron un incremento de la presencia de AALB006666 en el corazón, y una disminución en la señal del cuerpo graso de mosquitos que previamente fueron retados con zimosan. Este resultado sugiere que AALB006666 cambia de localización después de un reto inmune, debido a que no se encontraron cambios en los niveles de mRNA y proteína. Estas evidencias indican que AALB006666 podría jugar un papel importante en la respuesta inmune local del corazón.

Recientemente, se ha evidenciado que la acumulación de bacterias y hemocitos en el corazón de los mosquitos podría estar mediada por proteínas TEP (proteína reactiva C3-like) (97,164). Por otro lado, en mamíferos las proteínas tipo factor VWC interactúan con la proteína C3 reactiva para mediar la adhesión de plaquetas al endotelio (226). En el caso de los hemocitos y bacterias que se acumula en el corazón, estos requieren de múltiples componentes de adhesión que permitan resistir la fuerza generada por el alto flujo de hemolinfa generada por el corazón. En mamíferos, las plaquetas se adhieren de manera similar al endotelio, y requieren de proteínas de adhesión, dentro de las cuales está el factor

de VWC (227). En *B. mori*, una proteína con dominio del factor de VWC puede mediar la agregación de hemocitos para la formación de nódulos (228). Por último, los resultados del presente trabajo indican que la proteína AALB006666 es más abundante en los mosquitos retados con *M. luteus*. Esto correlaciona, con lo reportado previamente en humanos e invertebrados, en donde la presencia de bacterias Gram (+) o parásitos induce una sobreexpresión del factor de VWC, el cual actúa como opsonina o proteína de adhesión (229,230). Todas estas observaciones sugieren que AALB006666 posiblemente participe la adhesión de hemocitos y bacterias al corazón, sin embargo, se requerirá de más experimentos dirigidos a comprobar la liberación de este factor a la hemolinfa, y su verificación de que participa durante la agregación de hemocitos y/o bacterias en las vecindades del corazón.

## 11. Conclusiones

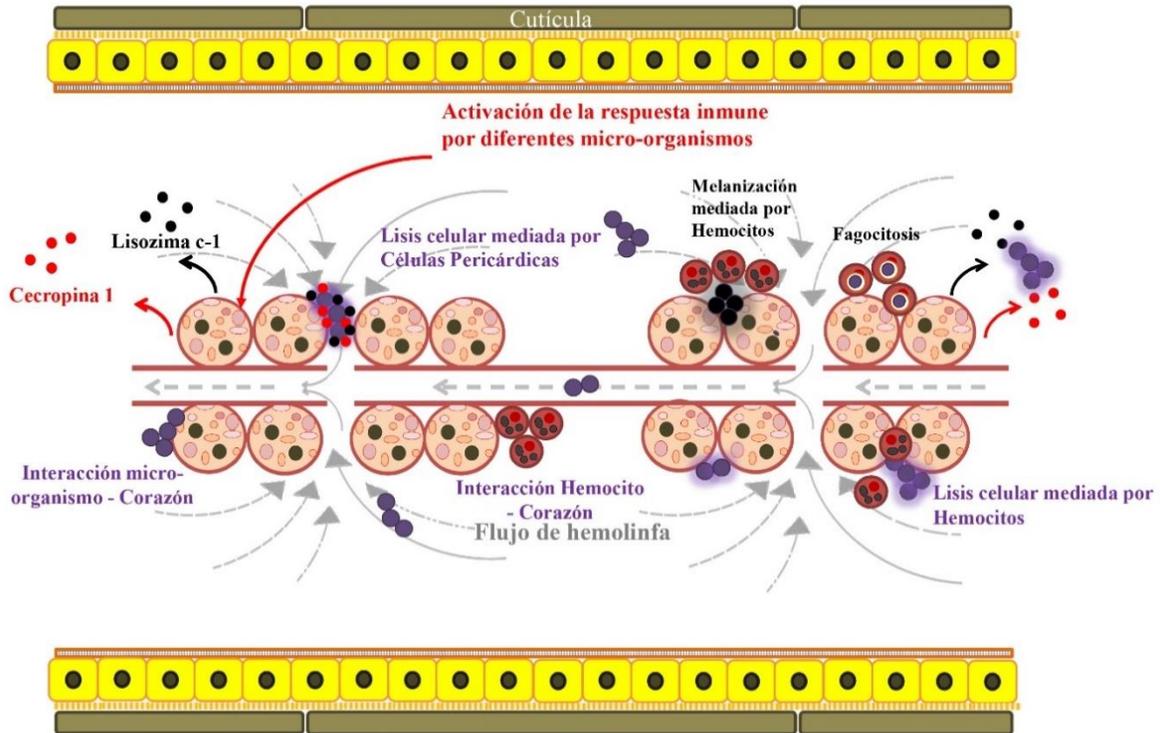
Las células pericárdicas se encuentran localizadas en un lugar privilegiado para la respuesta inmune. Varias evidencias sugieren que las CPs podrían expresar genes de respuesta inmune, sin embargo, no habían sido consideradas como un tipo celular inmunocompetente. En el presente trabajo se evidenció por primera vez que las CPs expresan dos genes efectores de la respuesta inmune, la *lisozima c-1* y la *cecropina 1*, las cuales incrementan su expresión después de un reto inmune.

El presente trabajo se centró en la evaluación de la expresión de dos genes en las CPs, sin embargo, otros genes como *attacina* y *serpina 10* también son expresados en el corazón. Adicionalmente, en el transcriptoma se identificaron otros genes como la *defensina 1*, *cecropina 3*, varios PRRs, y componentes de las vías TOLL, IMD, y JAK/STAT, lo que sugiere que las CPs expresan todos los componentes necesarios para iniciar, regular y efectuar una respuesta inmune.

En adición, se demostró que las CPs pueden responder ante la presencia de un microorganismo. Las evidencias mostradas aquí indican que esta respuesta puede ser específica, debido a que *lisozima c-1* y *cecropina 1* responden de diferente manera ante un mismo estímulo, y por otro lado, la *attacina* no presenta cambios aparentes en ninguna condición.

Por otro lado, se evidenció que las CPs presentan actividad lítica contra *M. luteus*, la cual posiblemente es en parte mediada por la lisozima c-1. Esta actividad lítica presentó un incremento durante un reto inmune, indicando que las CPs pueden participar directamente en la eliminación de patógenos, mediante la producción de componentes humorales de la respuesta inmune.

En conjunto, los resultados obtenidos aportan evidencias claras sobre la estrecha relación entre los sistemas circulatorio e inmune, en donde el corazón estaría participando de manera directa en la eliminación de los patógenos, y actuando como un andamio para el posicionamiento estratégico de los hemocitos (**Figura 40**). En conclusión, se puede afirmar que el corazón de los mosquitos, es uno de los sitios más eficientes en la eliminación de patógenos que invaden el hemocele.



**Figura 40. Modelo propuesto de la respuesta inmune mediada por la interacción entre los sistemas circulatorio e inmune.** El corazón puede funcionar como andamio para que los hemocitos puedan fagocitar, melanizar, o lisar de manera más eficiente a los microorganismos que pasan por las ostias (regiones de alto flujo de hemolinfa). En conjunto con los hemocitos, las CPs pueden sintetizar factores humorales como la lisozima c-1 y la cecropina 1, convirtiendo al corazón en una de las zonas más importantes para la eliminación de patógenos que invaden el hemocele. CPs (células anaranjadas binucleadas [núcleos cafés]), vaso dorsal (líneas rojas paralelas), flujo de hemolinfa (líneas grises punteadas), hemocitos (células marrón con núcleos rojos), microorganismos (círculos morados), microorganismos lisados (círculos morados con resplandor morado), microorganismos melanizados (círculos negros), hemocitos fagocíticos (células rojas con un microorganismo dentro), lisozima c-1 (círculos negros pequeños), cecropina 1 (círculos rojos pequeños), cuerpo grasso (células amarillas), cutícula (barras café).

## 12. Perspectivas

Los resultados presentados demuestran que las CPs expresan genes de respuesta inmune. No obstante, se desconoce si las CPs pueden reconocer directamente a los microorganismos, o requieren de componentes celulares (hemocitos) o humorales (PRRs) para hacerlo. Para evaluar lo anterior, sería necesario realizar ensayos *in vitro*, en donde corazones en cultivo primario sean estimulados (en ausencia de hemolinfa o hemocitos y adicionando estos, junto o separados) con diferentes microorganismos o componentes de la pared celular de los mismos (LPS, PGN, zimosan) para evaluar la expresión de algunos genes como *lisozima c-1* o *cecropina 1*. Los resultados obtenidos indicarían si las CPs son capaces de responder por si mismas ante la presencia de un microorganismo o requieren de factores adicionales, los que en dado caso tendrían que ser identificados.

Por otro lado, los análisis bioinformáticos sugieren que la lisozima c-1 podría ser secretada por las CPs, no obstante, las evidencias aportadas aquí no son suficientes para demostrarlo. Posiblemente un análisis de la proteómica del sobrenadante de corazones en cultivo primario, brindaría evidencia de que componentes son secretados por las CPs, entre los cuales posiblemente estén la lisozima c-1 y la cecropina 1.

En adición, sería conveniente validar la expresión de otros genes de respuesta inmune en los corazones del mosquito, debido a que en el presente trabajo solo se optó por evaluar los genes de mayor expresión en el transcriptoma. Otros candidatos como *cecropina 3*, *defensina 1*, *IMD*, *HOME*, *PELL1*, etc., podrían estar expresándose en el corazón. Por último, será continuar la caracterización de la expresión espacio-temporal y tratar de entender las posibles funciones del gen AALB00666, así como también de evaluar su posible participación como un componente mediador de la adhesión de las bacterias/hemocitos al corazón.

## 13. Apéndices

### 13.1. PBS (1X)

140 mM de NaCl

2.6 mM de KCl

1.5 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

20.4 mM de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

pH 7.4.

### 13.2. Acrilamida linear

a) Preparar una solución de acrilamida al 5% de la siguiente manera:

40 mM de Tris-HCl

20 mM de Na-Acetato

1 mM de EDTA

Ajustar el pH a 7.8.

b) Adicionar 1:100 Vol. de Persulfato de Amonio al 10% y 1:1000 Vol. de TEMED.  
Dejar polimerizar por 30 min.

c) Precipitar con 2.5 Vol. de Etanol (grado biología molecular).

d) Centrifugar 13, 000 g durante 10min.

e) Descartar el sobrenadante y secar la pastilla a T.A.

f) Resuspender la pastilla en 10 Vol. (del volumen inicial) de agua desionizada tratada con DEPC, en agitación, durante toda la noche a T.A.

- La solución final contiene 5 mg/mL de poliacrilamida.

### 13.3. Secuencias de los oligonucleótidos usados para los ensayos de PCR (Punto final y qRT-PCR)

Los oligonucleótidos fueron comprados a T4 Oligo. Y fueron resuspendidos y almacenados como lo indica el fabricante.

#### Secuencia de oligonucleótidos usados para los ensayos de PCR

Gen	ID de Vectorbase	Oligo	Secuencia
<i>40SRpS7</i>	AALB010399	Fw	GCGATCTGTACATCACCCG
		Rv	CATGTTTGCCCGAGAACTTC
<i>GAPDH</i>	AALB000739	Fw	ATGCCATCAAGGAGAAGGT
		Rv	TTCACGAAGGTATCGCTCAG
<i>Cecropina 1</i>	AALB006948	Fw	AGTGGACGCTGGTTTTCTCAA
		Rv	ATTTGCCAAGTGCCTTCACG
<i>Attacina</i>	AALB015538	Fw	AGATGAACGGCAAACGAAAGG
		Rv	ACTCTTCCACAGATTGCGCA
<i>Gambicina</i>	AALB000900	Fw	CGCTTATGCTTCGACTTGC
		Rv	AATCATCGTCTGACCATCGC
<i>albLys c-1</i>	AALB004517	Fw	GGACAAGGGTATCGCCAAGA
		Rv	TCGGTGGATCCGTTCTTGTT
<i>PPO1</i>	AALB002317	Fw	GCGGACCAAATCAAGCAG
		Rv	CGATTGCCCGATTTCGTCAAC
<i>GNBPB4</i>	AALB002296	Fw	GATGGTATCTTCTTCATTCGCCC
		Rv	CGGATTGGTACAGTAATCGTATGG
<i>Serpina 10</i>	AALB004329	Fw	CAAGGCGTTCATTGAGGTGAA
		Rv	GTCGGCCGTGAAGTAAGGAT
AALB006666	AALB006666	Fw	CAAGAGCCCAGATCAGGAC
		Rv	GCAGCCCATAATGCTGATG

### 13.4. Load buffer 6X (Dual color)

0.25% (W/V) de azul de bromofenol.

0.25% (W/V) de Xileno cianol.

30% de Glicerol al 30% en agua.

### 13.5. Buffer TAE

40 mM de Tris-Acetato,

1 mM de EDTA.

### 13.6. Secuencias de las sondas usadas para el RNA-FISH de *albLys c-1*

Sonda	Secuencia de la sonda (3' to 5')
albLys c-1_1	gcgcatggcaagtaca
albLys c-1_2	gcaactggcgccaagaatg
albLys c-1_3	ctttccgctaacgacggt
albLys c-1_4	gtcacacttgccaaagg
albLys c-1_5	gtccaccagaatcttggc
albLys c-1_6	actcttggcgataccctt
albLys c-1_7	agatccaatcggggaccg
albLys c-1_8	tctcatgctgcaccagac
albLys c-1_9	gttgccgtgctgctgaag
albLys c-1_10	ccgttctgtttttgtc
albLys c-1_11	caatccgtaatcgggtgga
albLys c-1_12	cgcaccagtacttgttgt
albLys c-1_13	attcgtaccgtagcccga
albLys c-1_14	gcaggcgattttgcaatc
albLys c-1_15	gtcgttgatcaggctttt
albLys c-1_16	gatgtcatccgtgatac
albLys c-1_17	cacgagctggcgcaactt
albLys c-1_18	cacgcgttgaagccatgc
albLys c-1_19	tgattcagccagccgtac
albLys c-1_20	agcgtctttcccttgcag
albLys c-1_21	cagaagcactcggcgaca

**Fluoróforo:** Quasar® 570

**Blanco:** Lisozima c-1 de *Anopheles albimanus*  
(VB ID: AALB004517)

## **13.7. Soluciones para RNA FISH**

### **13.7.1. Buffer de fijación**

1X PBS (tratado con DEPC 0.1%, inactivado por calor).

4% de formaldehído grado microscopía electrónica.

Filtrar en esterilidad y almacenar alícuotas a -20°C, protegidas de la luz.

### **13.7.2. PBST**

1X PBS (tratado con DEPC 0.1%, inactivado por calor).

0.1% de Tween 20.

### **13.7.3. Buffer de lavado**

4X de SSC.

35% de formamida desionizada.

0.1% de Tween 20.

\*El volumen de la solución es ajustada con agua desionizada (tratado con DEPC 0.1%, inactivado por calor).

### **13.7.4. Buffer de hibridación**

4X de solución salina de citrato (SSC).

35% de formamida desionizada.

0.1% de Tween 20.

2 mM de Vanadyl ribonucleosido.

1 mg/mL de DNA de esperma de Salmon.

100 mg/ml de dextran sulfato de sodio.

20 µg/mL de BSA.

\*El volumen de la solución es ajustada con agua desionizada (tratado con DEPC 0.1%, inactivado por calor), y todos los reactivos son grado biología molecular libre de DNA/RNAasas.

### 13.8. Secuencias de las sondas para el RNA FISH-STICs de *CecI*

Nombre de la sonda	Secuencia de las sondas
Sonda primaria 1	AGCAGGAGCGCAGCGACCACGACCAGGACCAGAA CCTTGTTGAAGTTCATTCGTTGGCCCCGACCGTTA CAGACTGTTCTCAGTtcgttggccccgaccgttacagactgttctcagt TCGTTGGCCCCGACCGTTACAGACTGTTCTCAGT
Sonda primaria 2	CGTTAAACACGCGCTTCCCAGCTCCTTCGATCTTTT TGCCAAGCTTTTTGTCGTTGGCCCCGACCGTTACA GACTGTTCTCAGTtcgttggccccgaccgttacagactgttctcagtTC GTTGGCCCCGACCGTTACAGACTGTTCTCAGT
Sonda secundaria	ACTGAGAACAGTCTGTAACGGTCGGGGGCCAACGA acgcgattgactaccagactatacACGCGATTGACTACCAGACT ATACGacgcgattgactaccagactatacACGCGATTGACTACC AGACTATACGacgcgattgactaccagactatac
/TAMRA/Sonda terciaria	CGTATAGTCTGGTAGTCAATCGCGT

### 13.9. Soluciones para SDS-PAGE y Western Blot

#### 13.9.1. RIPA (Bolen RIPA modificado)

20 mM de Mops.

150 mM de NaCl.

1 mM de EDTA.

1 % de de NonidetP-40.

1 % de Na-Deoxicolato.

0.1% de SDS.

Ajustar el pH a 7.4.

### **13.9.2. Laemmli Load Buffer 4X**

40% de glicerol.

8% de SDS.

0.004% de Azul de bromofenol.

25% de SGB 4X.

\*Para condiciones desnaturalizantes agregar 20% de  $\beta$ -Mercaptoetanol.

\*Preparar en agua desionizada.

### **13.9.3. Gel de poliacrilamida al 13%.**

Para hacer los geles de poliacrilamida al 13% utilizados para hacer SDS-PAGE y WB, se emplearon las siguientes soluciones:

#### **13.9.3.1. RGB 4X**

1500 mM de Tris Base.

0.4 % de SDS.

Ajustar a pH 8.8.

Preparar en agua desionizada.

#### **13.9.3.2. SGB 4X**

500 mM de Tris Base.

0.4 % de SDS.

Ajustar a pH 6.8.

\*Preparar en agua desionizada.

### **13.9.3.3. Solución de acrilamida:bis-acrilamida (29:1)**

29% de acrilamida.

1% de bis-acrilamida.

\*Preparar en agua desionizada, y filtrar en una membrana de tamaño de poro de 0.22  $\mu$ M.

### **13.9.3.4. Gel separador (5 mL).**

1, 529  $\mu$ L de agua desionizada.

2, 166  $\mu$ L de solución de acrilamida:bis-acrilamida (29:1).

1, 250  $\mu$ L de RGB 4X.

50  $\mu$ L de Persulfato de Amonio al 10%.

5  $\mu$ L de TEMED.

\*Agitar vigorosamente e inmediatamente cargar 4 mL de la mezcla en un gel de 1 mm de espesor, y alinear la superficie con isopropanol. Dejar polimerizar al menos 10 min, posteriormente retirar el isopropanol y lavar con agua.

### **13.9.3.5. Gel empaquetador (2 mL)**

1, 145  $\mu$ L de agua desionizada.

333  $\mu$ L de de solución de acrilamida:bis-acrilamida (29:1).

500  $\mu$ L de SGB 4X.

20  $\mu$ L de Persulfato de Amonio al 10%.

2  $\mu$ L de TEMED.

\* Agitar vigorosamente e inmediatamente depositar la mezcla hasta que se llene el faltante del molde del gel, y colocar el peine. Dejar polimerizar por al menos 10 min.

#### **13.9.4. Buffer Laemmli de corrida**

191.8 mM de Glicina.

24.7 mM de Tris Base.

0.1% de SDS.

\*Preparar en agua desionizada.

#### **13.9.5. Buffer de transferencia**

191.8 mM de Glicina.

24.7 mM de Tris Base.

20% de Metanol.

#### **13.10. Gel de Zimograma**

El gel para detectar la actividad lítica de lisozima, se hace igual que un gel para SDS-PAGE, sin embargo, el gel separador contiene 20% de solución de RBB-Microorganismos.

##### **13.10.1. Gel separador (5 mL)**

529  $\mu$ L de agua desionizada.

1, 000  $\mu$ L de RBB-Microorganismo.

2, 166  $\mu$ L de solución de acrilamida:bis-acrilamida (29:1).

1, 250  $\mu$ L de RGB 4X.

50  $\mu$ L de Persulfato de Amonio al 10%.

5  $\mu$ L de TEMED.

\*Agitar vigorosamente e inmediatamente cargar 4 mL de la mezcla en un gel de 1 mm de espesor, y alinear la superficie con isopropanol. Dejar polimerizar al menos 10 min, posteriormente retirar el isopropanol y lavar con agua.

### 13.11. Buffer de reacción de lisozima

67  $\mu$ M de Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>.

50  $\mu$ M de NaCl.

Ajustar el pH a 6.0..

### 13.12. IDs de las secuencias usadas para la construcción del árbol filogenético de las lisozimas (Figura 8)

ID de VectorBase	Nombre en el árbol filogenético
AALB004163	AALB004163 <i>An. albimanus</i>
AALB004517	AALB004517 <i>An. albimanus</i>
AALB005752	AALB005752 <i>An. albimanus</i>
AAEL019435	AAEL019435 <i>Ae. aegypti</i>
AAEL015404	Lys c-7B <i>Ae. aegypti</i>
AAEL017132	Lys c-4C <i>Ae. aegypti</i>
AAEL003712	Lys c-10E <i>Ae. aegypti</i>
AAEL003723	Lys c-11A <i>Ae. aegypti</i>
AGAP007347	Lys c-1 <i>An. gambiae</i>
AGAP007343	Lys c-2 <i>An. gambiae</i>
AGAP007345	Lys c-3 <i>An. gambiae</i>
AGAP007385	Lys c-4 <i>An. gambiae</i>
AGAP007346	Lys c-5 <i>An. gambiae</i>
AGAP005717	Lys c-6 <i>An. gambiae</i>
AGAP007386	Lys c-7 <i>An. gambiae</i>
AGAP007344	Lys c-8 <i>An. gambiae</i>
ADAC005092	ADAC005092 <i>An. darlingi</i>
ADAC005629	Lys P <i>An. darlingi</i>
ADAC005089	Lys i-1 <i>An. darlingi</i>
ADAC004530	ADAC004530 <i>An. darlingi</i>
UniProtID: A5A143	Lys c <i>Bombyx mori</i>
UniProtID: P00698	Lys c <i>Gallus gallus</i>

**13.13. IDs de las secuencias usadas para la construcción del árbol filogenético y el alineamiento de las cecropinas (Figuras 13 y 14)**

Nombre en el árbol filogenético	ID de VectorBase	ID de Uniprot
Cec1_An._albimanus	AALB006948	-
Cec2_An._albimanus	AALB014625	-
Cec3_An._albimanus	AALB006949	-
Cec4_An._albimanus	AALB005383	-
Cec1_An._stephensi	ASTE007107	-
Cec2_An._stephensi	ASTE007106	-
Cec3_An._stephensi	ASTE007108	-
Cec4_An._stephensi	ASTE010339	-
Cec1_An._gambiae	AGAP000693	-
Cec2_An._gambiae	AGAP000692	-
Cec3_An._gambiae	AGAP000694	-
Cec4_An._gambiae	AGAP006722	-
CecA_Hy._cecropia	-	P01507
CecB_Hy._cecropia	-	P01508
CecD_Hy._cecropia	-	P01510
CecA_Ae._aegypti	AAEL000627	P82592
CecB_Ae._aegypti	AAEL004223	Q17DH4
CecN_Ae._aegypti	AAEL000621	Q17NR4
CecI_Ae._aegypti	AAEL000775	Q17N75
CecF_Ae._aegypti	AAEL000625	Q17NR0
A0A1S4G893_Ae._aegypti	-	A0A1S4G893
CecD_Ae._aegypti	AAEL000598	Q17NR1
CecJ_Ae._aegypti	AAEL000777	Q17N74
CecG_Ae._aegypti	AAEL015515	Q1DGS1
CecE_Ae._aegypti	AAEL000611	Q17NR2
CecH_Ae._aegypti	AAEL017211	J9HSD6

**13.14. IDs de VectorBase de las secuencias de los genes ortólogos del gen AALB006666 usadas para el alineamiento de las secuencias (Figura 29).**

ID de VectorBase	Especie
AEPI011303-PA	<i>Anopheles epiroticus</i>
AALB006666-PA	<i>Anopheles albimanus</i>
AARA003729-PA	<i>Anopheles arabiensis</i>
AARA003730-PA	<i>Anopheles arabiensis</i>
AARA003731-PA	<i>Anopheles arabiensis</i>
AATE014945-PA	<i>Anopheles atroparvus</i>
ADAC008390-PA	<i>Anopheles darlingi</i>
ADIR000883-PA	<i>Anopheles dirus</i>
AFAF016008-PA	<i>Anopheles farauti</i>
AFUN000569-PA	<i>Anopheles funestus</i>
AGAP010046-PA	<i>Anopheles gambiae</i>
AGAP010047-PA	<i>Anopheles gambiae</i>
AMAM010411-PA	<i>Anopheles maculatus</i>
AMIN005741-PA	<i>Anopheles minimus</i>
AQUA009232-PA	<i>Anopheles quadriannulatus</i>
AQUA009233-PA	<i>Anopheles quadriannulatus</i>
AQUA009234-PA	<i>Anopheles quadriannulatus</i>
AQUA011960-PA	<i>Anopheles quadriannulatus</i>
ASIS006165-PA	<i>Anopheles sinensis</i>
ASTE001335-PA	<i>Anopheles stephensi</i>
CPIJ012666-PA	<i>Culex quinquefasciatus</i>
CPIJ006227-PA	<i>Culex quinquefasciatus</i>
CPIJ009658-PA	<i>Culex quinquefasciatus</i>
LLOJ001109-PA	<i>Lutzomyia longipalpis</i>
LLOJ001110-PA	<i>Lutzomyia longipalpis</i>
PPAI003194-PA	<i>Phlebotomus papatasi</i>
PPAI003195-PA	<i>Phlebotomus papatasi</i>

**13.15. IDs de los genes de inmunidad encontrados en el transcriptoma de los corazones de mosquito (Figura 5)**

<b>Gene</b>	<b>ID de VectorBase</b>	<b>Gene</b>	<b>ID de VectorBase</b>
TEP15	AALB001481	ECSIT	AALB004383
CTL1	AALB003232	TOLLIP	AALB009280
CTLA4	AALB014534	IMD	AALB003691
CTLMA3	AALB005978	FADD	AALB005663
CTLGA3	AALB008783	Ikk1	AALB000355
LRIM5	AALB005014	HOME	AALB007942
LRIM3	AALB005026	CuSOD3	AALB001256
LRIM3	AALB005024	CuSOD2	AALB004345
LRIM8B	AALB005120	GSTU1	AALB006654
LRIM7	AALB005121	LYSC1	AALB004517
LRRC40	AALB005560	DEF1	AALB007417
Internalin A	AALB003152	CECD	AALB005383
LRIM1	AALB005865	CECA	AALB006948
GALE5	AALB007425	SRPN4	AALB000564
SCRB9	AALB004310	SRPN9	AALB007277
SCRBQ1	AALB007920	SRPN10	AALB004329
SCRAC1	AALB000640	SRPN11	AALB002998
GNBP4B	AALB002296	SRPN12	AALB004911
PGRPLB	AALB009363	SRPN18	AALB005521
MYD88	AALB004323	LAMB	AALB003547
PELL1	AALB008154	VWFL	AALB006666

**13.16. Genes homólogos de AALB006666 y sus funciones (Datos obtenidos del análisis en I-TASSER).**

<b>Rank</b>	<b>PDB HIT</b>	<b>Nombre de la proteína</b>	<b>Función</b>	<b>Organismo</b>
1	5NB8	Protein NOV homolog	Proteína de señalización	<i>Rattus norvegicus</i>
2	2CG7	Fibronectin	Proteína de señalización	<i>Homo sapiens</i>
3	1U5M	alpha 1 type II collagen isoform 1	Proteína estructural	<i>Homo sapiens</i>
4	1U5M	alpha 1 type II collagen isoform 2	Proteína estructural	<i>Homo sapiens</i>
5	1O9A	Fibronectin	Proteína de adhesión	<i>Homo sapiens</i> <i>/Streptococcus dysgalactie</i>
6	3IX0	Beta-microseminoprotein	Proteína apoptotica antitumor	<i>Homo sapiens</i>
7	1U5M	alpha 1 type II collagen isoform 2	Proteína estructural	<i>Homo sapiens</i>
8	5NB8	Protein NOV homolog	Proteína de señalización	<i>Rattus norvegicus</i>
9	2MK0	HEP200 protein	Proteína estructural	<i>Cylindrotheca fusiformis</i>
10	1U5M	alpha 1 type II collagen isoform 2	Proteína estructural	<i>Homo sapiens</i>

## 14. Bibliografía

1. Jolivet P. Fascinating Insects : Some Aspects of Insect Life. Book. 2005. 1–311 p.
2. Engel MS, David A. Grimaldi. New light shed on the oldest insect. *Nature*. 2004;427(February):627–30.
3. Gillott C. Entomology. 3rd ed. *Journal of Chemical Information and Modeling*. Saskatoon, Saskatchewan, Canada; 2005. 1–776 p.
4. Rosenberg DM, Danks H V., Lehmkuhl DM. Importance of insects in environmental impact assessment. *Environ Manage*. 1986;10(6):773–83.
5. Nicholls CI, Altieri MA. Plant biodiversity enhances bees and other insect pollinators in agroecosystems. A review. *Agron Sustain Dev*. 2013;33(2):257–74.
6. TDR. Report of the Scientific Working Group meeting in Insect Vectors and Human Health. *Rep Insect vectors Hum Heal*. 2002;
7. WHO. Vector-Borne Diseases. 2016.
8. WHO. World Malaria Report 2015. 2015.
9. World Health Organization. A global brief on vector-borne diseases. *World Heal Organ*. 2014;9.
10. Ananias A., Escalante; Eladio, Barrio; Francisco J., Ayala (Departament of Ecology and Evolutionary Biology, University of California I. Evolutionary Origin of Human and Primate Malaria: Evidence from the Circumsporozoite Protein Gene. Intergovernmental Panel on Climate Change, editor. *Mol Biol Evol*. 1995;12(04):616–26.
11. White NJ. *Plasmodium knowlesi*: the fifth human malaria parasite. *ClinInfectDis*. 2008;46(1537-6591 (Electronic)):172–3.
12. Meissner M. The asexual cycle of apicomplexan parasites: New findings that raise new questions. *Curr Opin Microbiol*. 2013;16(4):421–3.

13. Igweh JC. Biology of Malaria Parasites. In: Malaria Parasites. Rijeka, Croatia; 2012. p. 27.
14. Crompton PD, Moebius J, Portugal S, Waisberg M, Hart G, Garver LS, et al. Malaria immunity in man and mosquito: insights into unsolved mysteries of a deadly infectious disease. *Annu Rev Immunol.* 2014;32:157–87.
15. Markus MB. The hypnozoite concept, with particular reference to malaria. *Parasitol Res.* 2011;108(1):247–52.
16. Smith RC, Vega-Rodriguez J, Jacobs-Lorena M. The Plasmodium bottleneck: Malaria parasite losses in the mosquito vector. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2014;109(5):644–61.
17. Matuschewski K. Getting infectious: Formation and maturation of plasmodium sporozoites in the Anopheles vector. *Cell Microbiol.* 2006;8(10):1547–56.
18. Douglas RG, Amino R, Sinnis P, Frischknecht F. Active migration and passive transport of malaria parasites. *Trends Parasitol.* 2015;31(8):357–62.
19. Lopéz Trincas J. CICLO VITAL DEL PARÁSITO DE LA MALARIA [Internet]. 2012. Available from: <http://www.info-farmacia.com/microbiologia/ciclo-vital-del-parasito-de-la-malaria>
20. CDC. Anopheles Mosquitoes [Internet]. 2015. Available from: <http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/mosquitoes/>
21. Fuller DO, Ahumada ML, Quiñones ML, Herrera S, Beier JC. Near-present and future distribution of Anopheles albimanus in Mesoamerica and the Caribbean Basin modeled with climate and topographic data. *Int J Health Geogr.* 2012;11:13.
22. Casas Martínez M, Orozco Bonilla a. Diversidad y distribución geográfica del género Anopheles en el Sur de México. *Biodiversitas.* 2006;67:12–5.
23. Abbas, Abul K; Lichtman H, Andrew; Pillai S. Cellular and Molecular Immunology. 7th ed. 2012.
24. Medzhitov R, Janeway Jr. C. Innate immune recognition: mechanisms and pathways.

- Immunol Rev. 2000;173:89–97.
25. Jiravanichpaisal P, Lee BL, Söderhäll K. Cell-mediated immunity in arthropods: Hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. *Immunobiology*. 2006;211(4):213–36.
  26. Ruiz Reyes VM, Sousa GL, Sneed SD, Farrant K V., Christophides K, Michael P. Stimulation of a protease targeting the LRIM1 / APL1C complex reveals specificity in complement-like pathway activation in *Anopheles gambiae*. *Plos o*. 2019;14(4):e0214753.
  27. Hoffmann JA, Reichhart J-M. *Drosophila* innate immunity: an evolutionary perspective. *Nat Immunol*. 2002;3(2):121–6.
  28. King JG. Developmental and comparative perspectives on mosquito immunity. *Dev Comp Immunol*. 2020;103:103458.
  29. Rinkevich. Invertebrates versus Vertebrates Innate Immunity: In the Light of Evolution. *Scand J Immunol*. 1999;50(5):456–460.
  30. Quintin J, Cheng S-C, van der Meer JW, Netea MG. Innate immune memory: towards a better understanding of host defense mechanisms. *Curr Opin Immunol*. 2014;29C:1–7.
  31. Contreras-Garduño J, Rodríguez MC, Hernández-Martínez S, Martínez-Barnetche J, Alvarado-Delgado A, Izquierdo J, et al. *Plasmodium berghei* induced priming in *Anopheles albimanus* independently of bacterial co-infection. *Dev Comp Immunol*. 2015;52(2):172–81.
  32. Little TJ, Hultmark D, Read AF. Invertebrate immunity and the limits of mechanistic immunology. *Nat Immunol*. 2005;6(7):651–4.
  33. Vargas V, Moreno-García M, Duarte-Elguea E, Lanz-Mendoza H. Limited specificity in the injury and infection priming against bacteria in *Aedes aegypti* mosquitoes. *Front Microbiol*. 2016;7(JUN):1–10.

34. Kurtz J, Armitage SAO. Alternative adaptive immunity in invertebrates. *Trends Immunol.* 2006;27(11):493–6.
35. Hauton C, Smith VJ. Adaptive immunity in invertebrates: A straw house without a mechanistic foundation. *BioEssays.* 2007;29(11):1138–46.
36. Kimbrell D a., Beutler B. The evolution and genetics of innate immunity. *Nat Rev Genet.* 2001;2(April):256–67.
37. Rowley AF, Powell A. Invertebrate Immune Systems—Specific, Quasi-Specific, or Nonspecific? *J Immunol.* 2007;179(11):7209–14.
38. Davis MM, Engström Y. Immune response in the barrier epithelia: Lessons from the fruit fly *drosophila melanogaster*. *J Innate Immun.* 2012;4(3):273–83.
39. Theopold U, Schmidt O, Söderhäll K, Dushay MS. Coagulation in arthropods: Defence, wound closure and healing. *Trends Immunol.* 2004;25(6):289–94.
40. Loof TG, Schmidt O, Herwald H, Theopold U. Coagulation systems of invertebrates and vertebrates and their roles in innate immunity: The same side of two coins? *J Innate Immun.* 2011;3(1):34–40.
41. Bidla G, Lindgren M, Theopold U, Dushay MS. Hemolymph coagulation and phenoloxidase in *Drosophila* larvae. *Dev Comp Immunol.* 2005;29(8):669–79.
42. Rivero A. Nitric oxide: an antiparasitic molecule of invertebrates. *Trends Parasitol.* 2006;22(5):219–25.
43. Herrera-Ortíz A, Lanz-Mendoza H, Martínez-Barnette J, Hernández-Martínez S, Villarreal-Treviño C, Aguilar-Marcelino L, et al. *Plasmodium berghei* ookinetes induce nitric oxide production in *Anopheles pseudopunctipennis* midguts cultured in vitro. *Insect Biochem Mol Biol.* 2004;34(9):893–901.
44. Lanz-Mendoza H, Hernández-Martínez S, Ku-López M, Rodríguez MDC, Herrera-Ortiz A, Rodríguez MH. Superoxide anion in *Anopheles albimanus* hemolymph and midgut is toxic to *Plasmodium berghei* ookinetes. *J Parasitol.* 2002;88(4):702–6.

45. Kumar S, Christophides GK, Cantera R, Charles B, Han YS, Meister S, et al. The role of reactive oxygen species on Plasmodium melanotic encapsulation in Anopheles gambiae. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100(24):14139–44.
46. Herrera-Ortiz A, Martínez-Barnette J, Smit N, Rodriguez MH, Lanz-Mendoza H. The effect of nitric oxide and hydrogen peroxide in the activation of the systemic immune response of Anopheles albimanus infected with Plasmodium berghei. Dev Comp Immunol. 2011;35(1):44–50.
47. Mylonakis E, Podsiadlowski L, Muhammed M, Vilcinskas A. Diversity, evolution and medical applications of insect antimicrobial peptides. Philos Trans R Soc B. 2016;in press.
48. Hillyer JF. Mosquito Immunity. In: Söderhäll K, editor. Invertebrate Immunity. Springer, Boston, MA; 2010. p. 218–38.
49. Dimopoulos G. Insect immunity and its implication in mosquito – malaria. Cell Microbiol. 2003;5(1):3–14.
50. Ravi C, Jeyashree A, Devi KR. Antimicrobial Peptides from Insects: An Overview. Res Biotechnol. 2011;2(5):1–7.
51. Clements A. The biology of Mosquitoes Volume 3, Viral and bacterial pathogens and baceterial symbionts. 2012. 571 p.
52. Kajla MK, Shi L, Li B, Luckhart S, Li J, Paskewitz SM. A new role for an old antimicrobial: Lysozyme c-1 can function to protect malaria parasites in Anopheles mosquitoes. PLoS One. 2011;6(5):e19649.
53. Yi HY, Chowdhury M, Huang YD, Yu XQ. Insect antimicrobial peptides and their applications. Appl Microbiol Biotechnol. 2014;98(13):5807–22.
54. Strand MR. Insect Hemocytes and Their Role in Immunity. Insect Immunol. 2008;32:25–47.
55. Hillyer JF, Strand MR. Mosquito hemocyte-mediated immune responses. Curr Opin

Insect Sci. 2014;3:14–21.

56. Hernández-Martínez S, Lanz H, Rodríguez MH, González-Ceron L, Tsutsumi V. Cellular-mediated reactions to foreign organisms inoculated into the hemocoel of *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol.* 2002;39(1):61–9.
57. Hernández-Martínez S, Lanz H, Rodríguez MH, Torres JA, Martínez-Palomo A, Tsutsumi V. Morphological and cytochemical characterization of female *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae) hemocytes. *J Med Entomol.* 1999;36(4):426–34.
58. Castillo JC, Robertson AE, Strand MR. Characterization of hemocytes from the mosquitoes *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol.* 2006;36(12):891–903.
59. Marmaras VJ, Lampropoulou M. Regulators and signalling in insect haemocyte immunity. *Cell Signal.* 2009;21(2):186–95.
60. Vlisidou I, Wood W. *Drosophila* blood cells and their role in immune responses. *FEBS J.* 2015;282(8):1368–82.
61. Hillyer JF. Insect immunology and hematopoiesis. *Dev Comp Immunol.* 2016;58:102–18.
62. Cerenius L, Lee BL, Söderhäll K. The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. *Trends Immunol.* 2008;29(6):263–71.
63. González-Santoyo I, Córdoba-Aguilar A. Phenoloxidase: A key component of the insect immune system. *Entomol Exp Appl.* 2012;142(1):1–16.
64. Hertel W, Pass G. An evolutionary treatment of the morphology and physiology of circulatory organs in insects. *Comp Biochem Physiol - A Mol Integr Physiol.* 2002;133(3):555–75.
65. Marc KJ. *Physiological system in insects*. 2nd ed. Academic Press in an of Elsevier. San Diego, California, USA; 2007. 1–661 p.
66. Jones JC. The heart and associated tissue of *Anopheles quadrimaculatus* say (Diptera:

- Culicidae). *J Morphol.* 1954;94:71–124.
67. Glenn JD, King JG, Hillyer JF. Structural mechanics of the mosquito heart and its function in bidirectional hemolymph transport. *J Exp Biol.* 2010;213:541–50.
  68. Leódidio ACM, Ramalho-Ortigão M, Martins GF. The ultrastructure of the *Aedes aegypti* heart. *Arthropod Struct Dev.* 2013;42:539–50.
  69. Andereck JW, King JG, Hillyer JF. Contraction of the ventral abdomen potentiates extracardiac retrograde hemolymph propulsion in the mosquito hemocoel. *PLoS One.* 2010;5(9):1–12.
  70. League GP, Onuh OC, Hillyer JF. Comparative structural and functional analysis of the larval and adult dorsal vessel and its role in hemolymph circulation in the mosquito *Anopheles gambiae*. *J Exp Biol.* 2015;218:370–80.
  71. Hillyer JF, Estévez-Lao TY, Funkhouser LJ, Aluoch VA. *Anopheles gambiae* corazonin: gene structure, expression and effect on mosquito heart physiology. *Insect Mol Biol.* 2012;21:343–55.
  72. Lim HY, Wang W, Chen J, Ocorr K, Bodmer R. ROS regulate cardiac function via a distinct paracrine mechanism. *Cell Rep.* 2014;7(1):35–44.
  73. Jones JC. Effects of salts on *Anopheles* heart rates. *J Exp Zool.* 1956;133(1):125–44.
  74. Miller T a. Control of circulation in insects. *Gen Pharmacol.* 1997;29(1):23–38.
  75. Weavers H, Prieto-Sánchez S, Grawe F, Garcia-López A, Artero R, Wilsch-Bräuninger M, et al. The insect nephrocyte is a podocyte-like cell with a filtration slit diaphragm. *Nature.* 2009;457(7227):322–6.
  76. Fife H, Palli S, Locke M. A function for pericardial cells in an insect. *Insect Biochem.* 1987;17(6):829–40.
  77. Na J, Cagan R. The *Drosophila* Nephrocyte: Back on Stage. *J Am Soc Nephrol.* 2013;24(2):161–3.

78. Mills RP, King RC. The Pericardial Cells of *Drosophila melanogaster*. *Q J Microsc Sci.* 1965;106(3):261–8.
79. Das D, Aradhya R, Ashoka D, Inamdar M. Macromolecular uptake in *Drosophila* pericardial cells requires *rudhira* function. *Exp Cell Res.* 2008;314(8):1804–10.
80. Crossley AC. The ultrastructure and function of pericardial cells and other nephrocytes in an insect: *Calliphora erythrocephala*. *Tissue Cell.* 1972;4(3):529–60.
81. Sørensen KK, McCourt P, Berg T, Crossley C, Le Couteur D, Wake K, et al. The scavenger endothelial cell: a new player in homeostasis and immunity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2012;303(12):R1217-30.
82. Mandal L, Banerjee U, Hartenstein V. Evidence for a fruit fly hemangioblast and similarities between lymph-gland hematopoiesis in fruit fly and mammal aorta-gonadal-mesonephros mesoderm. *Nat Genet.* 2004;36(9):1019–23.
83. Tao Y, Schulz R a. Heart development in *Drosophila*. *Semin Cell Dev Biol.* 2007;18(1):3–15.
84. Honti V, Csordás G, Mörkus R, Kurucz Z, Jankovics F, Andó I. Cell lineage tracing reveals the plasticity of the hemocyte lineages and of the hematopoietic compartments in *Drosophila melanogaster*. *Mol Immunol.* 2010;47(11–12):1997–2004.
85. Kimbrell D a, Hice C, Bolduc C, Kleinhesselink K, Beckingham K. The Dorothy enhancer has Tinman binding sites and drives hopscotch-induced tumor formation. *Genesis.* 2002;34(1–2):23–8.
86. Denholm B, Skaer H. Bringing together components of the fly renal system. *Curr Opin Genet Dev.* 2009;19(5):526–32.
87. Soukup SF, Culi J, Gubb D. Uptake of the necrotic serpin in *Drosophila melanogaster* via the lipophorin receptor-1. *PLoS Genet.* 2009;5(6).
88. Danielli A, Kafatos FC, Loukeris TG. Cloning and characterization of four *Anopheles*

*gambiae* serpin isoforms, differentially induced in the midgut by *Plasmodium berghei* invasion. *J Biol Chem*. 2003;278(6):4184–93.

89. Lycett GJ, Kafatos FC, Loukeris TG. Conditional expression in the malaria mosquito *Anopheles stephensi* with Tet-On and Tet-Off systems. *Genetics*. 2004;167(4):1781–90.
90. Danielli A, Loukeris TG, Lagueux M, Müller H-M, Richman A, Kafatos FC. A modular chitin-binding protease associated with hemocytes and hemolymph in the mosquito *Anopheles gambiae*. *Proc Natl Acad Sci*. 2000;97(13):7136–41.
91. Perrimon N. The roles of JAK / STAT signaling in *Drosophila* immune responses. 2004;198:72–82.
92. Barillas-Mury C, Han Y-S, Seeley D, Kafatos FC. *Anopheles gambiae* Ag-STAT, a new insect member of the STAT family, is activated in response to bacterial infection. *EMBO J*. 1999;18(4):959–67.
93. Lagueux M, Perrodou E, Levashina E a, Capovilla M, Hoffmann J a. Constitutive expression of a complement-like protein in toll and JAK gain-of-function mutants of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(21):11427–32.
94. Levashina EA, Moita LF, Blandin S, Vriend G, Lagueux M, Kafatos FC. Conserved role of a complement-like protein in phagocytosis revealed by dsRNA knockout in cultured cells of the mosquito, *Anopheles gambiae*. *Cell*. 2001;104:709–18.
95. Hillyer JF, Barreau C, Vernick KD. Hemocoel, efficiency of salivary gland invasion by malaria sporozoites is controlled by rapid sporozoite destruction in the mosquito. *Int J Parasitol*. 2007;37(6):673–81.
96. King JG, Hillyer JF. Infection-induced interaction between the mosquito circulatory and immune systems. *PLoS Pathog*. 2012;8(11):e1003058.
97. Sigle LT, Hillyer JF. Mosquito hemocytes preferentially aggregate and phagocytose pathogens in the peristial regions of the heart that experience the most hemolymph flow. *Dev Comp Immunol*. 2016;55:90–101.

98. Mccann F V. Physiology of Insect hearts. Physiology. 1970;
99. Gutierrez Huante, Maricela; Hernández Martínez S. Tesis de licenciatura. Facultad de Biología de la Universidad Autonoma del Estado de Morelos; 2010.
100. Hernández-Martínez S, Lanz-Mendoza H, Martínez-Barnette J, Rodríguez MH. Antimicrobial properties of *Anopheles albimanus* pericardial cells. Cell Tissue Res. 2013;351:127–37.
101. de Veylder L, Larkin JC, Schnittger A. Molecular control and function of endoreplication in development and physiology. Trends Plant Sci. 2011;16(11):624–34.
102. Lee HO, Davidson JM, Duronio RJ. Endoreplication : polyploidy with purpose. Genes Dev. 2010;24:61–77.
103. Edgar BA, Orr-Weaver TL. Endoreplication cell cycles: More for less. Cell. 2001;105(3):297–306.
104. Hernández-Martínez, Salvador; Román-Martínez, U; Martínez-Barnette, J; Garrido, E; Rodríguez, M.H.; Lanz-Mendoza H. Induction of DNA Synthesis in *Anopheles albimanus* Tissue Cultures in Response to a *Saccharomyces cerevisiae* Challenge. Arch Insect Biochem Physiol. 2006;63:147–58.
105. Hernández-Martínez S, Barradas-Bautista D, Rodríguez MH. DIFFERENTIAL DNA SYNTHESIS IN *Anopheles albimanus* TISSUES INDUCED BY IMMUNE CHALLENGE WITH DIFFERENT MICROORGANISMS. Arch Insect Biochem Physiol. 2013;84(1):1–14.
106. Barradas Bautista, Didier; Hernández Martínez S. Análisis de la inducción de amplificación genética después de un reto inmune en el mosquito *Anopheles albimanus*. Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México; 2011.
107. Chan AST, Rodríguez MH, Torres JA, Rodríguez M del C, Villarreal C. Susceptibility of three laboratory strains of *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae) to

- coindigenous *Plasmodium vivax* in southern Mexico. *J Med Entomol.* 1994;31(3):400–3.
108. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods.* 2001;25(4):402–8.
  109. Jr. AO, Johansson HE, Ruth JL. Stellaris™ fluorescence in situ hybridization ( FISH ) probes : a powerful tool for mRNA detection. *Nat Publ Gr.* 2011;8(10):i–ii.
  110. Abbaszadeh EK, Gavis ER. Fixed and live visualization of RNAs in *Drosophila* oocytes and embryos. *Methods.* 2016;98:34–41.
  111. Ito Y, Yamada H, Imoto T. Colorimetric assay for lysozyme using *Micrococcus luteus* labeled with a blue dye, Remazol brilliant blue R, as a substrate. *Chem Pharm Bull.* 1992;40(6):1523–6.
  112. Hardt M, Guo Y, Henderson G, Laine RA. Zymogram with Remazol brilliant blue-labeled *Micrococcus lysodeikticus* cells for the detection of lysozymes: example of a new lysozyme activity in Formosan termite defense secretions. *Anal Biochem.* 2003;312:73–6.
  113. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol.* 2013;30(12):2725–9.
  114. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 1987;4(4):406–25.
  115. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution (N Y).* 1985;39(4):783–91.
  116. Waterhouse AM, Procter JB, Martin DMA, Clamp M, Barton GJ. Jalview Version 2- A multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics.* 2009;25(9):1189–91.
  117. Robert X, Gouet P. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. 2014;42(April):320–4.

118. Yang J, Yan R, Roy A, Xu D, Poisson J, Zhang Y. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nat Methods*. 2015;12(1):7–8.
119. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, et al. UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*. 2004;25(13):1605–12.
120. Martínez-Barnette J, Gómez-Barreto RE, Ovilla-Muñoz M, Téllez-Sosa J, García López DE, Dinglasan RR, et al. Transcriptome of the adult female malaria mosquito vector *Anopheles albimanus*. *BMC Genomics*. 2012;13:207.
121. Cheadle C, Vawter MP, Freed WJ, Becker KG. Analysis of Microarray Data Using Z Score Transformation. *J Mol Diagnostic*. 2003;5(2):73–81.
122. Choi Y-J, Fuchs JF, Mayhew GF, Yu HE, Christensen BM. Tissue-enriched expression profiles in *Aedes aegypti* identify hemocyte-specific transcriptome response to infection. *Insect Biochem Mol Biol*. 2012;42(10):729–38.
123. Pinto SB, Lombardo F, Koutsos AC, Waterhouse RM, McKay K, An C, et al. Discovery of *Plasmodium* modulators by genome-wide analysis of circulating hemocytes in *Anopheles gambiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(50):21270–5.
124. Hernández-Martínez S, Sánchez-Zavaleta M, Brito K, Herrera-ortiz A, Ons S, Noriega FG. Allatotropin : A pleiotropic neuropeptide that elicits mosquito immune responses. *PLoS One*. 2017;12(4):e0175759.
125. Warr E, Das S, Dong Y, Dimopoulos G. The Gram-negative bacteria-binding protein gene family: its role in the innate immune system of *Anopheles gambiae* and in anti-*Plasmodium* defence. *Insect Mol Biol*. 2008;17(1):39–51.
126. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: Real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Nat Publ Gr*. 1993;11:1026–30.
127. Holt RA, Subramanian GM, Halpern A, Sutton GG, Charlab R, Nusskern DR, et al. The Genome Sequence of the Malaria Mosquito *Anopheles gambiae*. *Science*. 2002;298:129–49.

128. Neafsey DE, Waterhouse RM, Abai MR, Aganezov SS, Alekseyev MA, Allen JE, et al. "Highly evolvable malaria vectors: the genomes of 16 *Anopheles* mosquitoes." *Science*. 2015;347(6217):1258522.
129. Callewaert L, Michiels CW. Lysozymes in the animal kingdom. *J Biosci*. 2010;35(1):127–60.
130. Li B, Calvo E, Marinotti O, James AA, Paskewitz SM. Characterization of the c-type lysozyme gene family in *Anopheles gambiae*. *Gene*. 2005;360:131–9.
131. Matsuura A, Yao M, Aizawa T, Koganesawa N, Masaki K, Miyazawa M, et al. Structural analysis of an insect lysozyme exhibiting catalytic efficiency at low temperatures. *Biochemistry*. 2002;41(40):12086–92.
132. Tsuge H, Ago H, Noma M, Nitta K, Sugai S, Miyano M. Crystallographic studies of a Calcium binding lysozyme from equine milk at 2.5 Å resolution. *J Biochem*. 1992;111(2):141–3.
133. Nitta K, Tsuge H, Shimazaki K, Sugai S. Calcium-Binding Lysozymes. *Biol chemistry hoppe-Seyler*. 1988;369(August):671–5.
134. Kornegay JR, Schilling JW, Wilson AC. Molecular adaptation of a leaf-eating bird: stomach lysozyme of hoatzin. *Mol Cell Biol*. 1994;11(6):921–8.
135. Moreira-Ferro CK, Daffre S, James AA, Marinotti O. A lysozyme in the salivary glands of the malaria vector *Anopheles darlingi*. *Insect Mol Biol*. 1998;7(3):257–64.
136. Pavón N, Buelna-chontal M, Hernández-esquivel L, Hernández S. Mitochondrial inactivation by *Anopheles albimanus* cecropin 3: Molecular mechanisms. *Peptides*. 2013;53:202–9.
137. Zheng X-L, Zheng L. Genomic organization and regulation of three Cecropin genes in *Anopheles gambiae*. *Insect Mol Biol*. 2002;11(6):517–25.
138. Sun D, Fallon AM. Characterization of genomic DNA encoding cecropins from an *Aedes albopictus* mosquito cell line. *Insect Mol Biol*. 2002;11(1):21–30.

139. Bulet P, Stöcklin R. Insect antimicrobial peptides: structures, properties and gene regulation. *Protein Pept Lett.* 2005;12(1):3–11.
140. De T Das, Sharma P, Thomas T, Singla D, Tevatiya S, Kumari S, et al. Interorgan molecular communication strategies of “local” and “systemic” innate immune responses in mosquito *Anopheles stephensi*. *Front Immunol.* 2018;9(148):1–17.
141. Zhang R, Zhu Y, Pang X, Xiao X, Zhang R, Cheng G. Regulation of Antimicrobial Peptides in *Aedes aegypti* Aag2 Cells. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017;7(22):1–12.
142. Boman HG, Faye I, Hofsten P v., Kockum K, Lee J-Y, Xanthopoulos KG. On the primary structures of lysozyme, cecropins and attacins from *Hyalophora cecropia*. *Dev Comp Immunol.* 1985;9:551–8.
143. Bartholomay LC, Cho W, Rocheleau TA, Boyle JP, Beck ET, Fuchs JF, et al. Description of the Transcriptomes of Immune Response-Activated Hemocytes from the Mosquito Vectors *Aedes aegypti* and *Armigeres subalbatus*. 2004;72(7):4114–26.
144. Smith RC, King JG, Tao D, Zeleznik OA, Brando C, Thallinger GG, et al. Molecular Profiling of Phagocytic Immune Cells in *Anopheles gambiae* Reveals Integral Roles for Hemocytes in Mosquito Innate Immunity \* □. *Mol Cell Proteomics.* 2016;15(11):3373–87.
145. Kwon H, Smith RC. Chemical depletion of phagocytic immune cells in *Anopheles gambiae* reveals dual roles of mosquito hemocytes in anti- *Plasmodium* immunity. *Proc Natl Acad Sci.* 2019;116(28):14119–28.
146. Smith RC, Barillas-mury C, Jacobs-lorena M. Hemocyte differentiation mediates the mosquito late-phase immune response against *Plasmodium* in *Anopheles gambiae*. 2015;1–9.
147. Ragland SA, Criss AK. From bacterial killing to immune modulation: Recent insights into the functions of lysozyme. *PLoS Pathog.* 2017;13(9):1–22.
148. Kanost MR, Dai W, Dunn PE. Peptidoglycan fragments elicit antibacterial protein synthesis in larvae of *Manduca sexta*. *Arch insect Biochem Physiol.* 1988;8:147–64.

149. Liu YAN, Wang YIN, Yamakuchi M, Isowaki S, Nagata E, Kanmura Y, et al. Upregulation of Toll-Like Receptor 2 Gene Expression in Macrophage Response to Peptidoglycan and High Concentration of Lipopolysaccharide Is Involved in NF- $\kappa$ B Activation. 2001;69(5):2788–96.
150. Han F, Lu A, Yuan Y, Huang W, Beerntsen BT, Huang J, et al. Characterization of an entomopathogenic fungi target integument protein, *Bombyx mori* single domain von Willebrand factor type C, in the silkworm, *Bombyx mori*. Insect Mol Biol. 2017;26(3):308–16.
151. Kajla MK, Andreeva O, Gilbreath III TM, Paskewitz SM. Characterization of expression, activity and role in antibacterial immunity of Anopheles gambiae lysozyme c-1. Comp Biochem Physiol Part B Biochem Mol Biol. 2010;155(2):201–9.
152. Ito Y. Insect Lysozyme from House Fly ( *Musca domestica* ) Larvae : Possible Digestive Function Based on Sequence and Enzymatic Properties. 1995;551:546–51.
153. Kang D, Romans P, Lee J. Analysis of lysozyme gene from the malaria vector mosquito, Anopheles gambiae. Gene. 1996;174:239–44.
154. Gao Y, Fallon AM. Immune activation upregulates lysozyme gene expression in *Aedes aegypti* mosquito cell culture. Insect Mol Biol. 2000;9(6):553–8.
155. Kawasaki Y, Matsumoto A, Miyaki T, Kinoshita M, Kakuta S, Sakai T. Three-dimensional architecture of pericardial nephrocytes in *Drosophila melanogaster* revealed by FIB / SEM tomography. 2019;
156. Sinnamon JR, Czaplinski K. RNA detection in situ with FISH-STICs. RNA J. 2014;20(2):260–6.
157. Lowenberger C, Charlet M, Vizioli J, Kamal S, Richman A, Christensen BM, et al. Antimicrobial activity spectrum, cDNA cloning, and mRNA expression of a newly isolated member of the cecropin family from the mosquito vector *Aedes aegypti*. J Biol Chem. 1999;274(29):20092–7.

158. Vizioli J, Bulet P, Charlet M, Lowenberger C, Blass C, Müller H-M, et al. Cloning and analysis of a cecropin gene from the malaria vector mosquito , *Anopheles gambiae*. *Insect Mol Biol*. 2000;9(1):75–84.
159. Jung S, Evans CJ, Uemura C, Banerjee U. The *Drosophila* lymph gland as a developmental model of hematopoiesis. *Development*. 2005;132:2521–33.
160. Yu S, Luo F, Jin LH. The *Drosophila* lymph gland is an ideal model for studying hematopoiesis. *Dev Comp Immunol*. 2018;83:60–9.
161. Waterhouse RM, Povelones M, Christophides GK. Sequence-structure-function relations of the mosquito leucine-rich repeat immune proteins. 2010;1–10.
162. Povelones M, Upton LM, Sala KA, Christophides GK. Structure-Function Analysis of the *Anopheles gambiae* LRIM1 / APL1C Complex and its Interaction with Complement C3-Like Protein TEP1. 2011;7(4).
163. Simões ML, Mlambo G, Tripathi A, Dong Y, Dimopoulos G. Immune regulation of *Plasmodium* in *Anopheles* species specific and infection intensity dependent. *MBio*. 2017;8(5):1–13.
164. Yan Y, Hillyer JF. Complement-like proteins TEP1, TEP3 and TEP4 are positive regulators of periostial hemocyte aggregation in the mosquito *Anopheles gambiae*. *Insect Biochem Mol Biol*. 2019;107(January):1–9.
165. Bishnoi R, Sousa GL, Contet A, Day CJ, Hou CD, Profitt LA, et al. Solution structure , glycan specificity and of phenol oxidase inhibitory activity of *Anopheles* C-type lectins CTL4 and CTLMA2. *Sci Rep*. 2019;9(15191):1–14.
166. Pan X, Zhou G, Wu J, Bian G, Lu P, Raikhel AS, et al. *Wolbachia* induces reactive oxygen species ( ROS ) -dependent activation of the Toll pathway to control dengue virus in the mosquito *Aedes aegypti*. 2011;(May 2014).
167. García F, Calzada A, Rangel C, Castro G, Lanz H, del Río I, et al. Generación de anión superóxido O<sub>2</sub><sup>-</sup> en respuesta a zymosan (β, 1-3 glucanos), activador de la respuesta inmune en la cochinilla fina del nopal (*Dactylopius coccus*: Homóptera). *Fac Cienc y*

- Tecnol Investig Univ Multididiidisciplinaria. 2005;4:26–31.
168. A. T, A. K. M, S. K. K. Role of glutathione S-transferase ( GST ) in mosquito physiology and anti-Plasmodial activity. *Int J Sci Res Publ.* 2016;6:593–7.
  169. Silverman GA, Bird PI, Carrell RW, Church FC, Coughlin PB, Gettins PGW, et al. The serpins ere an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. *J Biol Chem.* 2001;276:33293–6.
  170. Suwanchaichinda C, Kanost MR. The serpin gene family in *Anopheles gambiae*. Vol. 442, *Gene.* 2009. p. 47–54.
  171. Gulley MM, Zhang X, Michel K. The roles of serpins in mosquito immunology and physiology. *J Insect Physiol.* 2013;59(2):138–47.
  172. Gough PJ, Gordon S. The role of scavenger receptors in the innate immune system. *Microbes Infect.* 2000;2:305–11.
  173. Zani IA, Stephen SL, Mughal NA, Russell D, Homer-Vanniasinkam S, Wheatcroft SB, et al. Scavenger Receptor Structure and Function in Health and Disease. *Cells.* 2015;4:178–201.
  174. González-Lázaro M, R. Dinglasan R, Hernández-Hernández F de la C, Henry Rodríguez M, Laclaustra M, Jacobs-Lorena M, et al. *Anopheles gambiae* Croquemort SCRBQ2, expression profile in the mosquito and its potential interaction with the malaria parasite *Plasmodium berghei*. *Insect Biochem Mol Biol.* 2009;39(0):395–402.
  175. Canton J, Neculai D, Gristein S. Scavenger receptors in homeostasis. *Nat Rev Immunol.* 2013;13:621–34.
  176. Gao Y, Fallon AM. Immune activation upregulates lysozyme gene expression in *Aedes aegypti* mosquito cell culture. 2000;9(May):553–8.
  177. Nitta K, Tsuge H, Iwamoto H. Comparative study of the stability of the folding intermediates of the calcium-binding lysozymes. *Int J Pept Protein Res.* 1993;41:118–23.

178. Kuroki R, Taniyama Y, Seko C, Nakamura H, Kikuchi M, Ikehara M. Design and creation of a Ca<sup>2+</sup> binding site in human lysozyme to enhance structural stability. *Proc Natl Acad Sci*. 1989;86:6903–7.
179. Lyster RLJ. Effect of calcium on the stability of mares' milk lysozyme. *J of Dairy Res*. 1992;59:331–8.
180. Permyakov SE, Khokhlova TI, Uversky VN, Permyakov EA. Analysis of Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> selectivity in  $\alpha$ -lactalbumin and Ca<sup>2+</sup>-binding lysozyme reveals a distinct Mg<sup>2+</sup>-specific site in lysozyme. *Proteins*. 2010;78:2609–24.
181. Permyakov SE, Khokhlova TI, Nazipova AA, Zhadan AP, Morozova-roche LA, Permyakov EA. Calcium-binding and temperature induced transitions in equine lysozyme: New insights from the pCa – temperature “ phase diagrams .” *Proteins*. 2006;65:984–98.
182. Troha K, Nagy P, Pivovar A, Lazzaro BP, Hartley PS, Buchon N, et al. Nephrocytes Remove Microbiota-Derived Peptidoglycan from Systemic Circulation to Maintain Immune Homeostasis Article Nephrocytes Remove Microbiota-Derived Peptidoglycan from Systemic Circulation to Maintain Immune Homeostasis. *Immunity*. 2019;1–13.
183. Abraham EG, Nagaraju J, Salunke D, Gupta HM, Datta RK. Purification and partial characterization of an induced antibacterial protein in the silkworm, *Bombyx mori*. *J Invertebr Pathol*. 1995;65:17–24.
184. League GP, Estévez-Lao TY, Yan Y, Garcia-Lopez VA, Hillyer JF. *Anopheles gambiae* larvae mount stronger immune responses against bacterial infection than adults: evidence of adaptive decoupling in mosquitoes. *Parasites and Vectors*. 2017;10:367.
185. Morishima I, Horiba T, Iketani M, Nishioka E, Yamano Y. Parallel induction of cecropin and lysozyme in larvae of the silkworm, *Bombyx mori*. *Dev Comp Immunol*. 1995;19(5):357–63.

186. Morishima I, Horiba T, Yamano Y. Lysozyme activity in immunized and non-immunized hemolymph during the development of the silkworm , *Bombyx mori*. *Comp Biochem Physiol*. 1994;108A(2/3):311–4.
187. Nasr NM, Fallon AM. Detection of lysozyme-like enzymatic activity secreted by an immune-responsive mosquito cell line. *J Invertebr Pathol*. 2003;82:162–6.
188. Moß K, Zibek S, Hirth T, Rupp S. Chitin-converting enzymes. In: Grunwald P, editor. *Handbook of carbohydrate-modifying biocatalysts*. Pan Stanford Publishing Pte Ltd; 2016.
189. Aguilar-Uscanga B, François JM. A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. *Lett Appl Microbiol*. 2003;37:268–74.
190. Lazzaro BP. Natural selection on the *Drosophila* antimicrobial immune system. *Curr Opin Microbiol*. 2008;11:284–9.
191. Wu Q, Patočka J, Kuča K. Insect antimicrobial peptides, a mini review. *Toxins (Basel)*. 2018;10(11):461.
192. Daffre S, Kylsten P, Samakovlis C, Hultmark D. The lysozyme locus in *Drosophila melanogaster*: an expanded gene family adapted for expression in the digestive tract. *Mol Gen Genet*. 1994;242:152–62.
193. Miguel-aliaga I, Jasper H, Lemaitre B. Anatomy and physiology of the digestive tract of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. 2018;210:357–96.
194. Gendrin M, Turlure F, Rodgers FH, Cohuet A, Morlais I, Christophides GK. Innate Immunity The Peptidoglycan Recognition Proteins PGRPLA and PGRPLB Regulate Anopheles Immunity to Bacteria and Affect Infection by Plasmodium. *J Innate Immun*. 2017;9:333–42.
195. Paredes JC, Welchman DP, Poidevin M, Lemaitre B. Article Negative Regulation by Amidase PGRPs Shapes the *Drosophila* Antibacterial Response and Protects the Fly from Innocuous Infection. *Immunity*. 2011;35:770–9.

196. Meister S, Agianian B, Turlure F, Relógio A, Morlais I, Kafatos FC, et al. Anopheles gambiae PGRPLC-Mediated Defense against Bacteria Modulates Infections with Malaria Parasites. *PLoS Pathog.* 2009;5(8):e1000542.
197. Zaidman-Rémy A, Hervé M, Poidevin M, Pill-Floury S, Kim M-S, Blanot D, et al. The Drosophila Amidase PGRP-LB Modulates the Immune Response to Bacterial Infection. *Immunity.* 2006;24:463–73.
198. Dziarski R, Gupta D. The peptidoglycan recognition proteins (PGRPs). *Genome Biol.* 2006;7(8):232.
199. Chang C-I, Pili-floury S, Herve M, Parquet C, Chelliah Y, Lemaitre B, et al. A Drosophila Pattern Recognition Receptor Contains a Peptidoglycan Docking Groove and Unusual L , D -Carboxypeptidase Activity. *PLoS Biol.* 2004;2(9):e277.
200. Mellroth P, Karlsson J, Steiner H. A Scavenger Function for a Drosophila Peptidoglycan Recognition Protein \*. *J Biol Chem.* 2003;278(9):7059–64.
201. Wang J, Song X, Wang M. Peptoglycan recognition proteins in hematophagous arthropods. *Dev Comp Immunol.* 2018;83:89–95.
202. Gupta D. Peptidoglycan Recognition Proteins — Maintaining Immune Homeostasis and Normal Development. *Cell Host Microbe.* 2008;2:273–4.
203. Russell VW, Dunn PE. Lysozyme in the pericardial complex of *Manduca sexta*. *Insect Biochem.* 1990;20(5):501–9.
204. Zanger K. Immunocytochemical localization of lysozyme in the nephrocytes of the harvestman , *Leiobunum rotundum*. *Tissue Cell.* 1995;27(3):299–308.
205. Hultmark D, Steiner H, Rasmuson T, Boman HG. Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. *Eur J Biochem.* 1980;106:7–16.
206. Steiner H, Hultmark D, Engström °A., Bennich H, Boman HG. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature.*

- 1981;292:246–8.
207. Wang G, Xia Li, Michael Zasloff. Antimicrobial peptides: discovery, design and novel therapeutic strategies. 2010.
  208. DeLucca AJ, Bland JM, Jacks TJ, Grimm C, Cleveland TE, Walsh TJ. Fungicidal activity of cecropin A. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997;41(2):481–3.
  209. Ekengren S, Hultmark D. *Drosophila* cecropin as an antifungal agent. 1999;29:965–72.
  210. Gwadz RW, Kaslow D, Lee JY, Maloy WL, Zasloff M, Miller LH. Effects of magainins and cecropins on the sporogonic development of malaria parasites in mosquitoes. *Infect Immun.* 1989;57(9):2628–33.
  211. Jaynes JM, Burton C a, Barr SB, Jeffers GW, Julian GR, White KL, et al. In vitro cytotoxic effect of novel lytic peptides on *Plasmodium falciparum* and *Trypanosoma cruzi*. *FASEB J.* 1988;2(13):2878–83.
  212. Carmen Rodriguez M Del, Zamudio F, Torres JA, Gonzalez-Ceron L, Possani LD, Rodriguez MH. Effect of a cecropin-like synthetic peptide (Shiva-3) on the sporogonic development of *plasmodium berghei*. Vol. 80, *Experimental Parasitology.* 1995. p. 596–604.
  213. Kim W, Koo H, Richman AM, Seeley D, Vizioli J, Klocko AD, et al. Ectopic Expression of a Cecropin Transgene in the Human Malaria Vector Mosquito *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae): Effects on Susceptibility to *Plasmodium*. *J Med Entomol.* 2004;41(3):447–55.
  214. Kokoza V, Ahmed A, Woon Shin S, Okafor N, Zou Z, Raikhel AS. Blocking of *Plasmodium* transmission by cooperative action of Cecropin A and Defensin A in transgenic *Aedes aegypti* mosquitoes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(18):8111–6.
  215. Hwang PM, Vogel HJ. Structure-function relationships of antimicrobial peptides. *Biochem Cell Biol.* 1998;76:235–46.

216. Pichon X, Lagha M, Mueller F, Bertrand E. Technology Review A Growing Toolbox to Image Gene Expression in Single Cells : Sensitive Approaches for Demanding Challenges. *Mol Cell*. 2018;71(3):468–80.
217. Lowenberger C, Bulet P, Charlet M, Hetru C, Hodgeman B, Christensen BM, et al. Insect immunity: Isolation of three novel inducible antibacterial defensins from the vector mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol*. 1995;25(7):867–73.
218. Dimarcq J-L, Bulet P, Hetru C, Hoffmann J. Cysteine-rich antimicrobial peptides in invertebrates. *Comp Physiol Regul Pept*. 1999;47:465–77.
219. O’Leary JM, Hamilton JU, Deane CM, Valeyev N V., Sandell LJ, Downing AK. Solution structure and dynamics of a prototypical chordin-like cysteine-rich repeat (von Willebrand factor type C module) from collagen IIA. *J Biol Chem*. 2004;279(51):53857–66.
220. Gragnano F, Sperlongano S, Golia E, Natale F, Bianchi R, Crisci M, et al. The Role of von Willebrand Factor in Vascular Inflammation: From Pathogenesis to Targeted Therapy. *Mediators Inflamm*. 2017;2017.
221. Wang H, Smagghe G, Meeus I. The role of a single gene encoding the Single von Willebrand factor C- domain protein ( SVC ) in bumblebee immunity extends beyond antiviral defense. *Insect Biochem Mol Biol*. 2017;91:10–20.
222. Chen Y, Jia X, Zhao L, Li C, Zhang S, Chen Y, et al. Identification and functional characterization of Dicer2 and five single VWC domain proteins of *Litopenaeus vannamei*. *Dev Comp Immunol*. 2011;35(6):661–71.
223. Sheldon TJ, Miguel-Aliaga I, Gould AP, Taylor WR, Conklin D. A novel family of single VWC-domain proteins in invertebrates. Vol. 581, *FEBS Letters*. 2007. p. 5268–74.
224. Boer S De, Eikenboom J. Von Willebrand disease: from in vivo to in vitro disease models. *HemaSphere*. 2019;3(5):e297.
225. Giblin JP, Hewlett LJ, Hannah MJ. Plenary paper Basal secretion of von Willebrand

- factor from human endothelial cells. *Blood J.* 2018;112(4):957–65.
226. Turner NA, Moake J. Assembly and activation of alternative complement components on endothelial cell-anchored ultra-large Von Willebrand Factor links complement and hemostasis-thrombosis. *PLoS One.* 2013;8(3):e59372.
227. Ruggeri ZM. Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions. *J Thromb Haemost.* 2003;1(7):1335–42.
228. Arai I, Ohta M, Suzuki A, Tanaka S, Yoshizawa Y, Sato R. Immunohistochemical analysis of the role of hemocytin in nodule formation in the larvae of the silkworm , *Bombyx mori.* *J insect Sci.* 2013;12(125):1–13.
229. Liesenborghs L, Peetermans M, Claes J, Veloso TR, Vandenbriele C, Criel M, et al. Shear-resistant binding to von Willebrand factor allows staphylococcus lugdunensis to adhere to the cardiac valves and initiate endocarditis. *J Infect Dis.* 2016;213(7):1148–56.
230. August B. Smit,\* Marijke de Jong-Brink,† Ka Wan Li,\* Marion M. J. Sassen,† Sabine Spijker,\* René van Elk,\* Stèphanie Buijs,† Jan van Minnen and RE van K, \*Graduate. Granularin, a novel molluscan opsonin comprising a single vWF type C domain is up-regulated during parasitisation. *Diagn Interv Imaging.* 2013;94(3):330–2.



## Lysozyme c-1 gene is overexpressed in *Anopheles albimanus* pericardial cells after an immune challenge

Victor Cardoso-Jaime<sup>a,b</sup>, Krystal Maya-Maldonado<sup>a,b</sup>, Antonio Celestino-Montes<sup>a,1</sup>, Víctor Tsutsumi<sup>a,\*\*</sup>, Salvador Hernández-Martínez<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, IPN, Ciudad de México, Mexico

<sup>b</sup> Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca, Morelos, Mexico

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Lysozyme  
Mosquito heart  
Pericardial cells  
*Anopheles albimanus*  
Immune response

### ABSTRACT

Different evidences suggest that pericardial cells play an important role during the immune response against pathogens that invade the mosquito hemocoel. Previously, we identified two lysozyme genes in *Anopheles albimanus* heart transcriptome. The present study showed that one of these genes (ID<sub>VB</sub>: AALB004517) has high percentage of identity to mosquito lysozyme genes related to immunity, suggesting its possible participation during the mosquito immune response. This *An. albimanus* gen, constitutively expressed lysozyme c-1 mRNA (*albLys c-1*) in mosquito heart; however, it was overexpressed in bacteria-injected mosquitoes. In heart extract samples, we identified a protein of approximately 14 kDa (likely lysozyme c-1), which lysed *M. luteus*. In addition, mRNA-FISH assay in heart samples, showed specific fluorescent hybridization signal in pericardial cells from *M. luteus*-injected mosquitos. We conclude that for the first time an inducible immune factor (lysozyme c-1) is identified in *Anopheles albimanus* mosquito pericardial cells, which could be a key component in the response against pathogens that interact with the mosquito heart.

### 1. Introduction

Mosquito borne diseases are a worldwide public health problem. Mosquitoes transmit different arbovirus, parasites and helminths, making them an important research target to the control of many devastating diseases. *Anopheles albimanus* is one of the main vectors of human malaria caused by *Plasmodium vivax* in Mexico and Latin America, however little efforts have been addressed to understand the interactions with the parasites they transmit, as compared with other mosquito species. In general, mosquitoes display efficient cellular and humoral immune mechanisms to face different invaders. Their innate immune response, encompass process of recognition, activation of signaling and transduction pathways to generate effector mechanisms (Clayton et al., 2014; Hillyer, 2010; Waterhouse et al., 2007).

Once invaders are recognized, serine protease cascades are activated and modulated by serine protease inhibitors which in turn activate both

Toll and Imd signal pathways (intensity of each one varies depending on the pathogen type) to culminate in the production of different antimicrobial peptides (AMPs) (Ramirez and Dimopoulos, 2010; Schulenburg et al., 2007; Waterhouse et al., 2007). These humoral effector peptides, are mainly produced by fat body cells and released into the hemolymph (King, 2020; Tzou et al., 2000). Cellular immune mechanisms are mediated by circulating and sessile hemocytes and include phagocytosis, nodulation, and encapsulation (Castillo et al., 2006; Hernández-Martínez et al., 2002; Hillyer and Strand, 2014; King and Hillyer, 2012). Humoral and cellular responses are directly interconnected, because hemocytes and other organs produce humoral molecules, as exemplified by AMPs and other responses in the midgut, salivary glands, Malpighian tubules and dorsal vessel (Dimopoulos et al., 2000; Hernández-Martínez et al., 2013; Hillyer and Strand, 2014; McGettigan et al., 2005).

Insect hemolymph (which transports nutrients, signaling molecules, immune factors, hormones, waste, etc.) is kept moving in an open

\* Corresponding author. Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Salud Pública, Av. Universidad 655, Santa María Ahuacatlán, Cuernavaca, Morelos, C.P. 62100, Mexico.

\*\* Corresponding author. Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, IPN, Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, Gustavo A. Madero, Ciudad de México, C.P. 07360, Mexico.

E-mail addresses: [vtutsu@cinvestav.mx](mailto:vtutsu@cinvestav.mx) (V. Tsutsumi), [shernandez@insp.mx](mailto:shernandez@insp.mx) (S. Hernández-Martínez).

<sup>1</sup> Present address: Tecnológico de Monterrey, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud. Avenida Morones Prieto 3000 Poniente. Monterrey, N.L., México. C.P. 64710.

circulatory system to reach all insect body structures. Hemolymph is mainly pumped by the dorsal vessel in alternating anterior (toward the head) and posterior (toward the tip of the abdomen) directions (Glenn et al., 2010). The dorsal vessel in insects is divided in aorta and heart (located in thorax and abdomen, respectively). The heart is formed by a tube of cross-striated muscle fibers in helical-like arrangement, ostial cells, associated pericardial cells and sessile hemocytes (Hillyer and Pass, 2020; Leódidio et al., 2013).

Pericardial cells are located along the heart, in single lateral lines that in pairs are flanking each ostium (the heart valves formed by ostial cells) (League et al., 2015). The hemolymph composition is regulated by pericardial cells which have osmoregulatory and detoxifying functions (scavenging) (Martoja and Ballan-Dufrancais, 1984). Pericardial cells take up molecules by pinocytosis, which after degradation may be returned to the hemolymph (Chapman, 1998). Interestingly, early works have reported the presence of important immune response markers in mosquito pericardial cells, suggesting that these cells could also participate in the neutralization of pathogens. Serpins, a family of proteins that participate in insect immune regulation, are localized in pericardial cells nuclei and cytoplasm during bacterial infection in *Anopheles gambiae* (Danielli et al., 2003). A member of the STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription) family of transcription factors is constitutively present in pericardial cells cytoplasm and nuclei (Barillas-Mury et al., 1999). A modular serine protease (Sp22D) was identified in pericardial cells cytoplasm of both naive and bacterial-challenged *An. gambiae*, whereas defensin accumulation occurred several hours after the challenge (Danielli et al., 2000). Similar results were obtained with the thioester-containing protein (TEP-I) (Levashina et al., 2001). However, the identification of all these immune markers in pericardial cells was attributed to their scavenging properties, and surprisingly the possibility of endogenous synthesis was not considered.

Pericardial cells are strategically located in hemolymph high-flow sites (flanking the ostia), where in conjunction with periostial hemocytes, they are exposed to a rapid contact with pathogens that could invade the hemocoel (Hernández-Martínez et al., 2013; Hillyer et al., 2007; King and Hillyer, 2012). In the malaria parasites biology, sporozoites are a stage of this protozoan that is released into the hemolymph after mosquito infection, which subsequently invades the salivary glands to be transmitted to humans. However, most parasites are eliminated in the hemocoel, particularly in periostial regions with significant involvement of hemocytes (Hillyer et al., 2007), and where pericardial cells could also be participating given the heart antimicrobial properties previously reported (Hernández-Martínez et al., 2013).

We have previously reported in *An. albimanus* heart transcriptome, the expression of different immune markers, including lysozyme (Martínez-Barnette et al., 2012), and heart-mediated inducible lytic activity against *Micrococcus luteus* bacteria (Hernández-Martínez et al., 2013). This early work on *An. albimanus* focused primarily on antimicrobial heart properties and did not explore the particular cell source of this activity in relation with their possible participation during the mosquito immune response. In this study, we investigate the expression of a lysozyme gene in *An. albimanus* heart challenged with different microorganisms as well as the heart cells expressing this gene. Bioinformatics analysis revealed that in *An. albimanus*, the ortholog gene encoding to the c-type lysozyme mRNA related to immunity (*albLys c-1*), showed high homology to the *An. darlingi* (both American mosquitoes) and *An. gambiae* (African mosquito). *albLys c-1* mRNA is expressed in mosquito heart and its expression increases after an immune challenge, with the highest induction produced in heart samples from *M. luteus*-challenged mosquito. Zymogram assays showed that heart lytic activity against *M. luteus* is mediated by a protein of around 14 kDa, corresponding to the molecular weight of lysozyme c-1. The RNA-FISH assays indicated that *albLys c-1* mRNA synthesis in heart occurs only in pericardial cells and that it is upregulated during the immune response.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Insects and microorganisms

*Anopheles albimanus* Wiedemann mosquitoes of the Tapachula strain (Chan et al., 1994), were raised at 28 °C, 80% relative humidity, with a 12-h light/12-h dark photoperiod at the National Institute of Public Health in Cuernavaca, Morelos, Mexico. The mosquitoes were fed with kitty cat food (Whiskas, Purina) fed during larval stages, and adults were fed in 10% sugar solution. In this study only 3-day-old adult female mosquitoes were used. *Micrococcus luteus* Schroeter, *Escherichia coli* Migula DH5 $\alpha$  strain (lyophilized cells), *Saccharomyces cerevisiae* (Desm.) Meyen were purchased from Sigma, St. Louis, MO. To prevent microorganisms proliferation, they were killed by heat in a boiling bath for 3 min, before to be injected into the mosquitoes.

### 2.2. Bioinformatic analysis

Phylogenetic analysis was obtained using MEGA6 <https://www.megasoftware.net/> (Tamura et al., 2013), where the evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining method (Saitou and Nei, 1987). The bootstrap consensus tree was inferred from 1000 replicates. The evolutionary distances were computed using the Poisson correction method (Felsenstein, 1985). The analysis involved 22 amino acid sequences of lysozymes from *Aedes aegypti*, *An. gambiae*, *An. darlingi*, *An. albimanus*, *Bombix mori* and *Gallus gallus* (Table S1).

Alignment of lysozyme protein sequences closest to albLys c-1 (AALB004517) was performed in Jalview software <https://www.jalview.org/> (Waterhouse et al., 2009), using Muscle algorithm and visualized on ESPript 3 server <http://espript.ibcp.fr> (Robert and Gouet, 2014). Molecular weight of mature c-type lysozymes (sequences without signal peptide) from *An. albimanus* were obtained using Compute pI/MW from ExPASy Bioinformatics Resource Portal [https://web.expasy.org/compute\\_pi/](https://web.expasy.org/compute_pi/). Structure 3D of mature albLys c-1 (without signal peptide) was obtained from I-TASSER server <https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/download/> (Yang et al., 2015). Structural model was compared with the best structural template match (*B. mori* lysozyme, PDB ID: 1GD6), using UCSF Chimera software <http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/> (Pettersen et al., 2004).

### 2.3. Mosquito injections and heart dissections

Mosquito injections were carried out as previously described (Hernández-Martínez et al., 2002). Briefly, fine needles were made from 100  $\mu$ l micro-glass capillary tubes using a pipette puller P-30 (Sutter Instrument, Novato, CA), and mounted on a pipette pump (Drummond, Broomall, PA). Mosquitoes were briefly cold-anesthetized on ice and injected with 0.25  $\mu$ l of RPMI 1640 culture medium (added with phenol red; Gibco BRL, Grand Island, N.Y.) containing approximately  $2 \times 10^3$  *S. cerevisiae*,  $8 \times 10^3$  *E. coli* or *M. luteus* (Hernández-Martínez et al., 2002, 2013; Hernández et al., 1999). Control mosquitoes were injected with 0.25  $\mu$ l of RPMI alone or not injected. Injections were made through the pleural membrane, between the fourth and fifth abdominal segments. Mosquitoes were maintained at 28 °C, 80% relative humidity for 12 h before heart dissection (Hernández-Martínez et al., 2013). Briefly, the abdominal section of the dorsal vessel (heart) with attached pericardial cells was removed from the abdomen in a drop of phosphate buffered saline [PBS, 140 mM NaCl, 2.6 mM KCl, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20.4 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.2 (all of them from Sigma, St. Louis, MO)]. Hearts were carefully washed in a drop of PBS under a dissecting microscope until visually no fat body cells were evident (Hernández-Martínez et al., 2013). These samples ("clean hearts", Fig. S1) consisted of only the dorsal vessel and the attached pericardial cells.

#### 2.4. Immunofluorescence staining for lysozyme in mosquito abdomens

Three-day-old female *An. albimanus* abdomens were separated from thorax and gut removed. Then, mosquito abdomens were dissected in PBS by cutting along the left lateral membrane. Abdomens were fixed with 4% formaldehyde in PBS. After washing, tissues were permeated with 2% Triton X-100 in PBS 10 min at RT. After washing, samples were incubated 2 h at 37 °C in 2% bovine serum albumin in PBS (blocking solution). Samples were then incubated at 4 °C overnight with a rabbit polyclonal antibody anti-lysozyme from hen egg white (ab391, from Abcam, Cambridge, MA), diluted 1:500 in blocking solution. Tissues were washed 5 times, 10 min each, with 0.1% Tween-20 in PBS (PBS-T). All subsequent procedures were carried out with the samples being kept in the dark. Tissues were incubated for 2 h at 37 °C with the secondary antibody, Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin (Invitrogen, Molecular Probes, Carlsbad, CA), diluted 1:100 in PBS-A. Tissues were washed in PBS-T (5 times, 10 min each) and mounted on glass slides in a fluorescence-preserving medium (Dapi-Fluoromount-G, EMS, Hatfield, PA). Samples were analyzed in a confocal microscope C2 (Nikon, Japan) attached to an E-600 microscope (Nikon, Japan). Images were processed by using NIS-Elements version 4.2 from Nikon and by Power Point programs. Three-dimensional (3D) reconstructions were obtained from Z-stack data sets. Results are presented as 3D views in a single projection.

#### 2.5. Western blot analysis of lysozyme in mosquito abdomen extracts

Protein extract from five mosquito abdomens and 0.5 µg from hen egg white lysozyme were placed in SDS-PAGE sample load buffer without reducing agents. Gel running conditions were 25 mA during 60 min at RT, and then equilibrated on transfer buffer 15 min. Gel transfer to nitrocellulose membrane (0.2 µm pore size, Whatman Protran) was done in a Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell (BIO RAD), at 90V, 90 min at 4 °C. Nitrocellulose membrane was blocked with 5% non-fat dry milk in PBS (blocking solution) (Svelty, Nestle), 60min shaking at RT. After that, membrane was incubated with a rabbit antibody anti-lysozyme from hen egg white (Abcam-ab391) diluted 1:1500 in blocking solution, at 4 °C over-night. Membrane was washed 3 times, 10 min each, with PBS-T, then incubated for 1 h at RT in secondary antibody, a horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin (Millipore, Burlington, MA) diluted 1:60000 in blocking solution. Membrane was washed in PBS-T (3 times, 10 min each). To detect the antibody, Western Lightning PLUS-ECL (PerkinElmer, Waltham, MA) and Kodak BioMax XAR Film were used.

#### 2.6. RNA purification and cDNA synthesis

Twenty hearts or ten whole female mosquitoes were collected in 250 µl or 500 µl of TRIzol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) respectively. RNA was purified following the provider protocol. RNA isolation performed using TRIzol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA), and in the precipitation step acrylamide linear was used as carrier to increase RNA quantity isolated. The RNA pellet was resuspended in 20 µl of DEPC treated water (Invitrogen, Carlsbad, CA).

The cDNA was obtained by the RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA). In the cDNA synthesis were used 100 ng of RNA treated previously with DNase I (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA), in 20 µl of reaction final volume, as indicated by the provider.

#### 2.7. qRT-PCR

The qRT-PCR assays were performed using Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA) and ViiA7 Real Time PCR System. Three reactions by sample were done following the provider protocol. Each reaction contained 0.4 µl of cDNA

reaction, 0.125 µM Forward (Fw) and 0.125 µM Reverse (Rv) primers. The primer sequences for *lysozyme c-1* (*albLys c-1*), *prophenoloxidase 1* (*PPO*) and *Glyceraldehyde 3 Phosphate Dehydrogenase* (*GAPDH*) were as follow: *albLys c-1* (ID<sub>VB</sub>: AALB004517), Fw (GGA-CAAGGGTATCGCCAAGA), Rv (TCGGTGGATCCGTTCTTGT); *PPO1* (ID<sub>VB</sub>: AALB002317), Fw (ACATCTTCATGGGAATGCG), Rv (GAA-CAGGTACGGATTGATGC); *GAPDH* (ID<sub>VB</sub>: AALB000739), Fw (ATGC-CATCAAGGAGAAGGT), Rv (TTCACGAAGGTATCGCTCAG).; All oligonucleotides were purchased from OligoT4, Irapuato, Gto, MX.

Data analysis was done using  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method (Livak and Schmittgen, 2001), where *GAPDH* was used as reference gene.

#### 2.8. Zymogram of lysozyme activity

For zymogram assays, we modified the procedure described by Hardt et al. (2003). Briefly, SDS-PAGE was performed in a separating gel (75 mM Tris, 0.1% SDS, 29:1 of 13% polyacrylamide, pH 8.8) (5.3 × 8.3 × 0.01 cm) containing *M. luteus* labeled with Remazol Brilliant Blue (RBB-*M. luteus*) (RBB was obtained from Sigma, St. Louis, MO), which were prepared as reported by Ito et al. (Ito et al., 1992). Stacking gel (125 mM Tris, 0.1% SDS, 29:1 of 5% polyacrylamide, pH 6.8) (2.0 × 8.3 × 0.01 cm) was prepared without RBB-*M. luteus*. Fifty hearts or 0.5 µg of hen egg white lysozyme (Sigma, St. Louis, MO) were collected directly in 30 µl SDS-PAGE sample load buffer (125 mM Tris, 0.5% SDS, 10% glycerol, 0.01% bromophenol blue, all of them from (Sigma, St. Louis, MO)), containing protease inhibitors (100 µM TLCK, 200 µM leupeptin, 1 mM PMSF, all of them from Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI) in absence of reducing agents. Samples were mixed and centrifuged at 13,000 g, 5 min. The supernatant was loaded onto the gel (28 µl per lane), which was subjected to electrophoretic migration during 60 min, 25 mA at RT using a Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad, Hercules, CA). The gel was washed twice in bi-distilled water at 37 °C, then it was incubated during 30 min in pre-warmed (37 °C) phosphate buffer (67 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 50 mM NaCl at pH 6.0) (Moreira-Ferro et al., 1998). Finally, the gel was incubated overnight under agitation at 37 °C in fresh buffer.

#### 2.9. RNA fluorescent in situ hybridization (FISH)

Isolated hearts from non-treated, RPMI or *M. luteus*-injected mosquitoes were used to detect *albLys c-1* by RNA-FISH. Clean hearts were obtained at 12 h post-injection, as described above. The protocol described by Abbaszadeh & Gavis (Abbaszadeh and Gavis, 2016) was used with 625 nM final probe concentration. Probe set (Stellaris®RNA FISH) was purchased from LGC (Biosearch Technologies, Petaluma, CA), selecting Quasar 570 as tag. Probes sequences (Table S2) were obtained by using Stellaris Probe Designer 4.2 software <https://www.biosearchtech.com/support/tools/design-software/stellaris-probe-designer>. Samples were analyzed in a confocal microscope C2 (Nikon, Japan) attached to an E-600 microscope (Nikon, Japan). Images were processed using Fiji ImageJ software <https://imagej.net/Fiji> (Schindelin et al., 2012) to obtain maximal projection intensity from Z-stack data sets.

#### 2.10. Statistical analyses

Statistical analyses of the data were performed using GraphPad Prism version 5.0 for Windows (Graph-Pad Software, San Diego, CA). The results are expressed as means ± s.e.m. Significant differences ( $P < 0.05$ ) were determined with one-way ANOVA followed by Tukey's test.

### 3. Results

#### 3.1. Sequence analysis of AALB004517

Recently, we reported the heart transcriptome of *An. albimanus* (Hernández-Martínez et al., 2013; Martínez-Barnette et al., 2012), in

which we identified the expression of two out of three putative genes for c-type lysozymes [VectorBase ID (ID<sub>VB</sub>): AALB004517 and AALB005752] identified in the genome of this mosquito (Neafsey et al., 2015). However, it is unknown what lysozyme group (from c-1 to c-8 described in *An. gambiae*) they belong to and the possible roles they might play. To determine the c-type lysozyme group for each gene, a phylogenetic analysis was performed under the neighbor joining criterion, by using previously characterized lysozyme protein sequences of *An. gambiae*, *An. darlingi*, *Ae. aegypti* and *B. mori* (Li et al., 2005; Moreira-Ferro et al., 1998; Morishima et al., 1994; Ursic Bedoya et al., 2005). The phylogenetic tree (Fig. 1A) grouped the three *An. albimanus* lysozymes into different clades, indicating that they may have different functions. The sequence AALB004163 was grouped in a clade with the sequences of lysozyme c-6 of *An. gambiae* and with a putative *Ae. aegypti* lysozyme ID<sub>VB</sub>: AAEL019435. The sequence AALB005752 was grouped into a different clade with *An. gambiae* c-7 and *Ae. aegypti* c-7B lysozymes. Finally, AALB004517 was grouped with *An. darlingi* ADAC005092 and *An. gambiae* c-1 and c-2 lysozymes, indicating that AALB004517 is an ortholog of them. In addition, AALB004517 showed a percentage of sequence identity of 92.36% and 72.34% to *An. darlingi* ADAC005092 and *An. gambiae* lysozyme c-1, respectively (Fig. 1B), which have been described as lysozymes involved in mosquitoes immune response (Kajla et al., 2010; Li et al., 2005; Moreira-Ferro et al., 1998).

The sequence alignment of AALB004517 with its orthologs, showed that all of them are highly conserved, containing characteristic amino acid residues in the domain to c-type lysozymes from insects (Fig. 2A). All of them have a signal peptide, suggesting that they could be secreted. They have eight cysteine residues in the same position (Fig. 2A), which are necessary for the folding stability of c-type lysozymes (Callewaert and Michiels, 2010). By using the sequence of the mature protein as reference, we observed that AALB004517 also retains glutamic and aspartic acid residues at positions 32 and 49, respectively (Fig. 2A). These amino acids are essential for the catalytic site from c-type lysozymes in insect, which exhibit hydrolase activity of the  $\beta$ -1,4-glycosidic linkage from bacterial peptidoglycan (Li et al., 2005; Matsuura et al., 2002). Additionally, a 3D structural model was obtained by I-TASSER (Iterative Threading ASSEmblY Refinement) (Yang et al., 2015), which shows that the tertiary structure is highly conserved. The glutamic and aspartic amino acid residues, can be observed in same position of the catalytic center as in the c-type lysozyme from *B. mori* (Matsuura et al., 2002) (Fig. 2B). Altogether, these analyses strongly suggest that *An. albimanus* AALB004517 is a gene coding for lysozyme c-1 (*albLys c-1*), which may exhibit similar functions as their orthologs.

### 3.2. Lysozyme immunoreactivity

Immunofluorescence assay showed positive reactivity to lysozyme

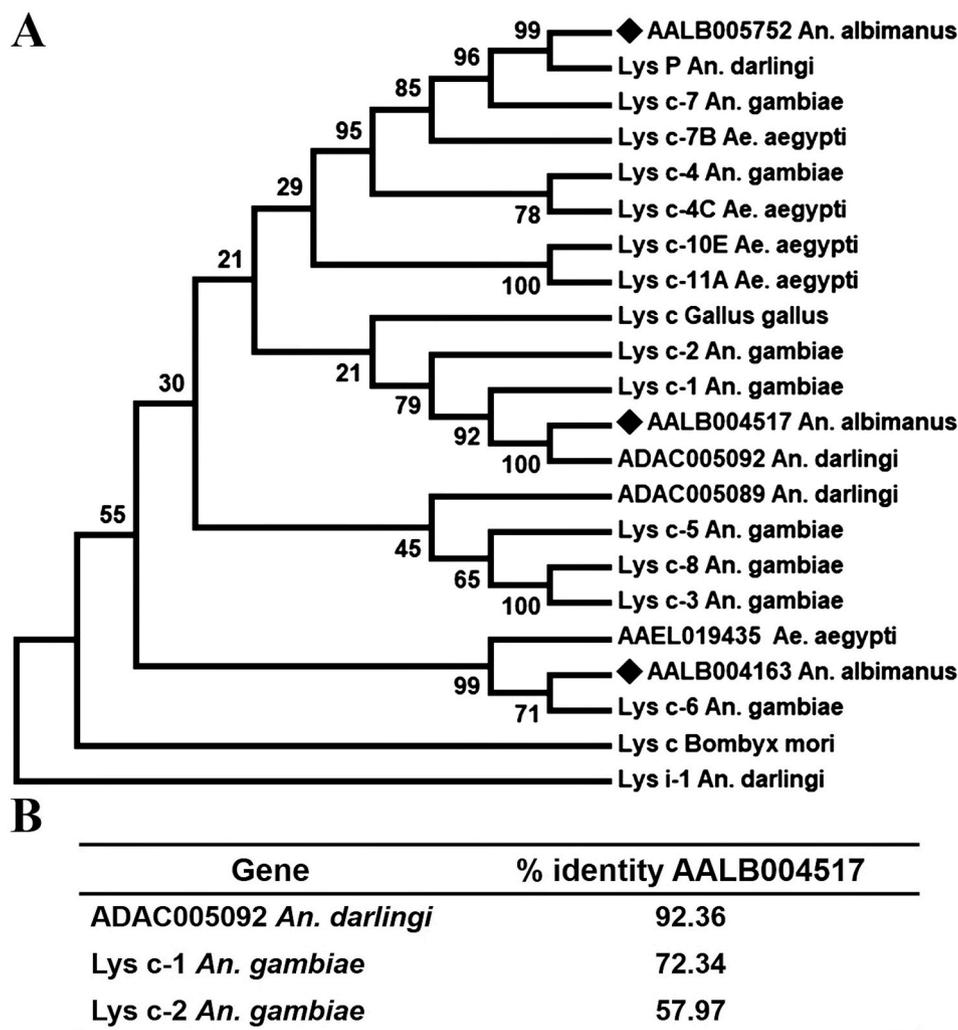
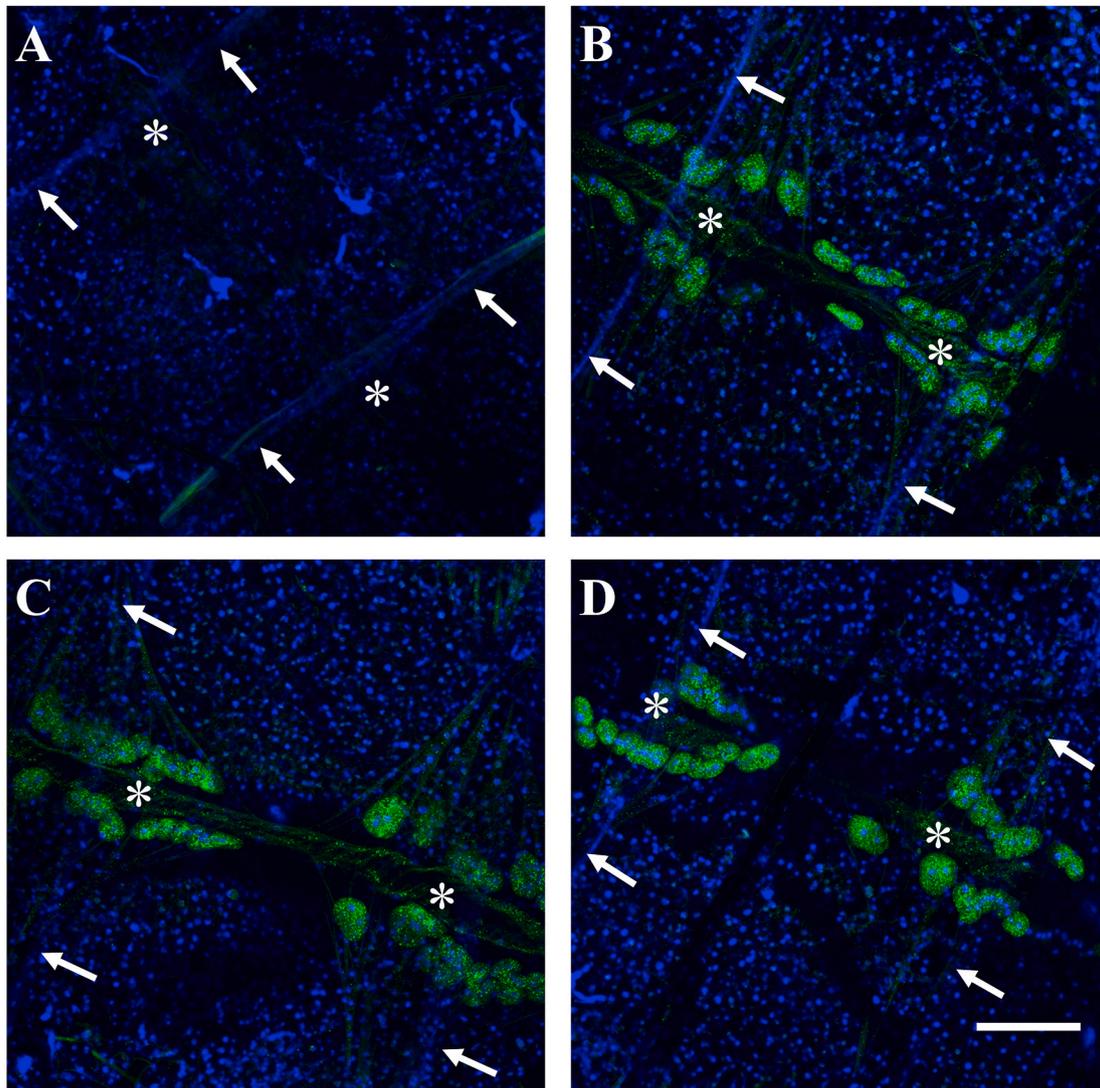


Fig. 1. Phylogenetic analysis of *Anopheles albimanus* lysozymes. A) Phylogenetic tree of lysozymes from four mosquito (*An. gambiae*, *An. darlingi*, *An. albimanus* and *Ae. aegypti*) and *B. mori*. Black diamonds indicate the *An. albimanus* lysozymes sequences, and numbers next to branches indicates bootstrap value. B) Percentage of identity of the lysozymes closest to AALB004517.





**Fig. 3. Immunohistochemical localization of lysozyme in mosquito abdomens.** Assays were performed in abdominal carcasses of three-day-old female *An. albimanus*. The immunoreactivity for the lysozyme was evaluated with a rabbit polyclonal antibody anti-lysozyme from hen egg white and with an Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin. Samples were analyzed in a confocal microscope and images processed with NIS-Elements and Power Point programs. Three-dimensional (3D) reconstructions were obtained from Z-stack data sets and images presented as 3D views in a single projection. A) Without primary antibody. B) Non-injected. C) RPMI-injected. D) *M. luteus*-injected. Positive reactivity to lysozyme (green fluorescence) was observed only in pericardial cells. Nuclei are stained with DAPI (blue fluorescence). Arrows are pointing intersegmentary membranes of 5th abdominal segment of dorsal region, as well signaling toward frontal direction (to the heat). \* Heart. Scale bar, 100  $\mu$ m. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

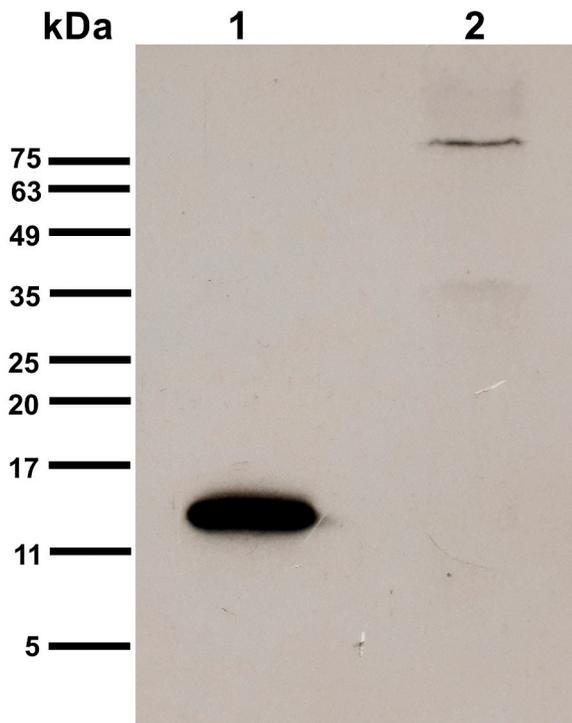
in hearts, indicating that our technical efficiency in collecting “clean heart” samples allows to remove as much as possible hemocytes (Fig. S1), and confirming that *ablLys c-1* mRNA comes from hearts.

#### 3.4. *ablLys c-1* gene is overexpressed in mosquito hearts after an immune challenge

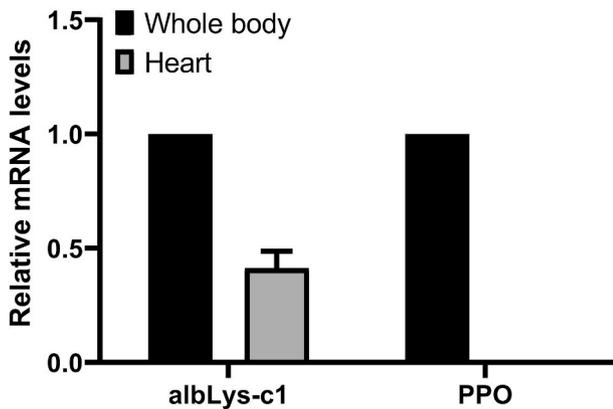
To determine if *ablLys c-1* gene from *An. albimanus* hearts plays a role in the immune response (like their orthologs), the expression of *ablLys c-1* gene was evaluated in hearts from injected mosquitoes with dead *M. luteus* (Gram-positive), *E. coli* (Gram-negative), and *S. cerevisiae* (yeasts). Fig. 6 shows that *ablLys c-1* gene was overexpressed about seventeen-, twelve- and three-fold in hearts coming from *M. luteus*-, *E. coli*- and *S. cerevisiae*-injected mosquitoes, respectively (Fig. 6). Hearts samples from RPMI-injected mosquitos (vehicle plus damage) showed no significant changes. These results strongly suggest that *ablLys c-1* from hearts is an inducible gene that may play an important role during the mosquito immune response.

#### 3.5. A protein around 14 kDa mediates lytic activity against *M. luteus* in mosquito heart extracts

Lysozymes play a key role in the immune response, due to their ability to hydrolyze  $\beta$ -1,4-glycosidic linkages in the peptidoglycan (PGN) of bacteria wall, and consequently the bacterial lysis. Previously, we report lytic activity in mosquito hearts extract against *M. luteus* (Hernández-Martínez et al., 2013), where we suggest the involvement of different antimicrobial molecules, including lysozyme. Now, to demonstrate the *ablLys c-1* protein participation in bacterial lysis, a zymogram was performed using the extracts of fifty hearts from non-injected, RPMI- and *M. luteus*-injected mosquitoes. The test consisted of a polyacrylamide gel containing *M. luteus* labeled with Remazol Bright Blue (RBB). RBB binds to the PGN in *M. luteus* cell wall and it is released when lysozyme hydrolyzes the PGN, so creating a clear area in the molecular weight corresponding to the specific enzyme (Hardt et al., 2003; Ito et al., 1992). The zymogram showed in hearts samples, a single band of lysis approximately at a position corresponding to 14 kDa, close

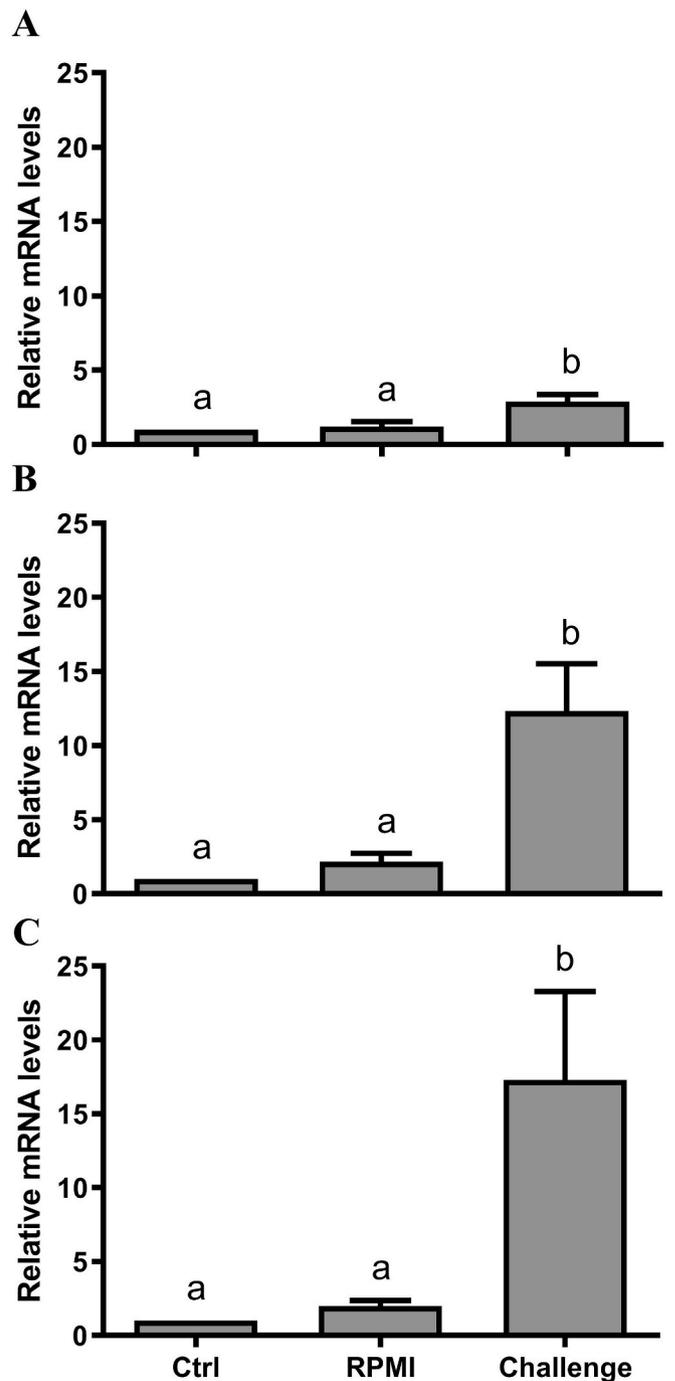


**Fig. 4.** Western blotting profile of lysozyme in mosquito abdomen extracts. Protein extract from five mosquito abdomens and hen egg white lysozyme were electrophoresed in SDS-PAGE under no-reducing conditions. Samples were transferred to nitrocellulose membrane and it was incubated with a rabbit antibody anti-lysozyme from hen egg white. The secondary antibody was a horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit. To detect the antibody, Western Lightning PLUS-ECL (PerkinElmer, Waltham, MA) and Kodak BioMax XAR Film were used. In the figure, Lane 1: Hen egg white lysozyme (MW 14.31 kDa). Lane 2: mosquito abdomen sample, showing a single band of approximately 90 kDa.



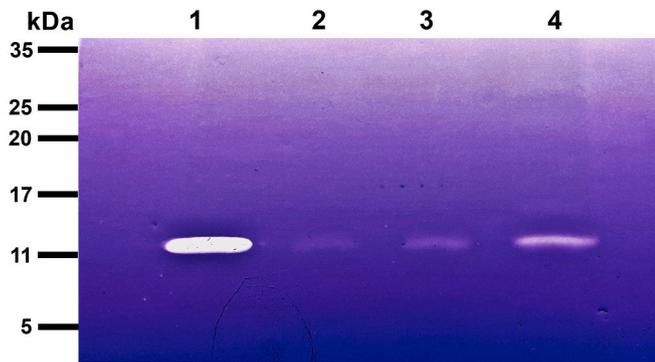
**Fig. 5.** Mosquito heart samples express *albLys c-1* gene and they do not express *prophenoloxidase (PPO)*. *albLys c-1* gene expression was analyzed by qRT-PCR in untreated samples from both, hearts and whole mosquitoes (n = 20 hearts, and n = 10 whole mosquito). Additionally, *PPO* expression was evaluated in similar samples to assess the presence of hemocytes in heart samples after obtaining procedure. In both mRNA analyzed, expression was relativized to the whole mosquito samples. Each bar represents the mean ± s.e.m. of three independent biological replicates (from rearing of different mosquito generations).

to the position where the activity of commercial hen egg white lysozyme (MW 14.31 kDa) was observed. The hypothetical molecular mass of the mature protein to *albLys c-1* is 13.41 kDa, suggesting that the lysis bands



**Fig. 6.** *albLys c-1* gene is overexpressed in mosquito heart after an immune challenge. Relative expression of *albLys c-1* gene was determined in heart samples from mosquitoes at 12 h post-injected with dead: A) *S. cerevisiae*, B) *E. coli*, C) *M. luteus*. The highest expression of *albLys c-1* gene ( $17 \pm 5.97$ ) was induced in heart samples of *M. luteus*-injected mosquitos. Ctrl (non-injected) and RPMI (RPMI-injected) (n = 20 hearts each group). *GAPDH* was used as housekeeping gene. Each bar represents the mean ± s.e.m. of three independent biological (replicates from rearing of different mosquito generations). Values labeled with different letters are significantly different by Tukey's test after One-way ANOVA at  $P < 0.05$ .

observed in the zymogram correspond to this enzyme (Fig. 7). In addition, the lytic activity was higher in hearts extract from *M. luteus*-injected mosquitoes, than control samples (non-injected and RPMI-injected). This result suggests the participation of heart *albLys c-1* during mosquito immune response (as lytic agent).



**Fig. 7. Lysozyme activity is increased in mosquito heart after a challenge with *M. luteus*.** Hen egg white lysozyme (0.5  $\mu$ g, lane 1) and heart (n = 50) protein extracts from non-injected mosquitoes (lane 2), 12 h post RPMI-injected (lane 3) and 12 h post *M. luteus*-injected (lane 4). Sample proteins were separated by electrophoresis in a gel containing *M. luteus* labeled with remazol brilliant blue. Only one band of lysozyme activity with similar molecular weight was observed per lane, indicating the presence of albLys c-1 in the mosquito heart with activity on Gram-positive bacteria wall components. In heart samples, the highest activity was observed in *M. luteus*-injected mosquitoes. Three independent gels were performed with similar results; by using three biological replicates (from rearing of different mosquito generations). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

### 3.6. Mosquito pericardial cells express *albLys c-1* gene

We hypothesized that pericardial cells could be the producers of albLys c-1 in the heart. To test our hypothesis, we detected the *albLys c-1* mRNA by fluorescent *in situ* hybridization (RNA-FISH) in isolated hearts. Fig. 8 shows that in mosquito heart, the fluorescent probe hybridization occurred only on pericardial cells, confirming our hypothesis. In addition, RNA-FISH showed a significant increase of fluorescent signal due to the high *albLys c-1* mRNA levels in pericardial cells from *M. luteus*-challenged mosquitoes (Fig. 8), strongly suggesting their involvement during the immune response.

## 4. Discussion

Insects have an open circulatory system which means that hemolymph flows freely around insect organs. Hemolymph is composed of plasma and hemocytes. The plasma contains humoral immune factors and hemocytes, which are the main effectors of cellular immune response. In addition, hemolymph transports all necessary components for tissue maintenance and survival, as well as waste molecules to be processed. However, hemolymph is also used by different viruses and pathogens for their dissemination to other insect tissues (e.g. malaria parasites), because the hemolymph continuous flow produced by the dorsal vessel. Recently, several reports indicate the importance of the study of the interaction between the immune and circulatory systems in mosquitoes (Hernández-Martínez et al., 2013; Hillyer et al., 2007; King and Hillyer, 2012). The dorsal vessel of abdominal region (heart) have valves (ostias) that allow hemolymph to flow into the heart lumen, becoming a site of hemolymph high flow. The periostial regions have been proposed as strategic sites for pathogen elimination that reach the hemocoelic cavity (which contains the hemolymph), due to the presence and accumulation of periostial hemocytes (Sigle and Hillyer, 2016). In *An. gambiae*, sessile periostial hemocytes increased in number in bacteria-challenged mosquitoes. These periostial hemocytes participated actively in bacteria elimination by a phagocytic mechanism (King and Hillyer, 2012; Sigle and Hillyer, 2016). Similar results were obtained with *S. cerevisiae* injected into *An. albimanus* hemocoel, where most melanized and non-melanized yeasts were agglutinated on periostial regions. However, these were not phagocytosed, but were

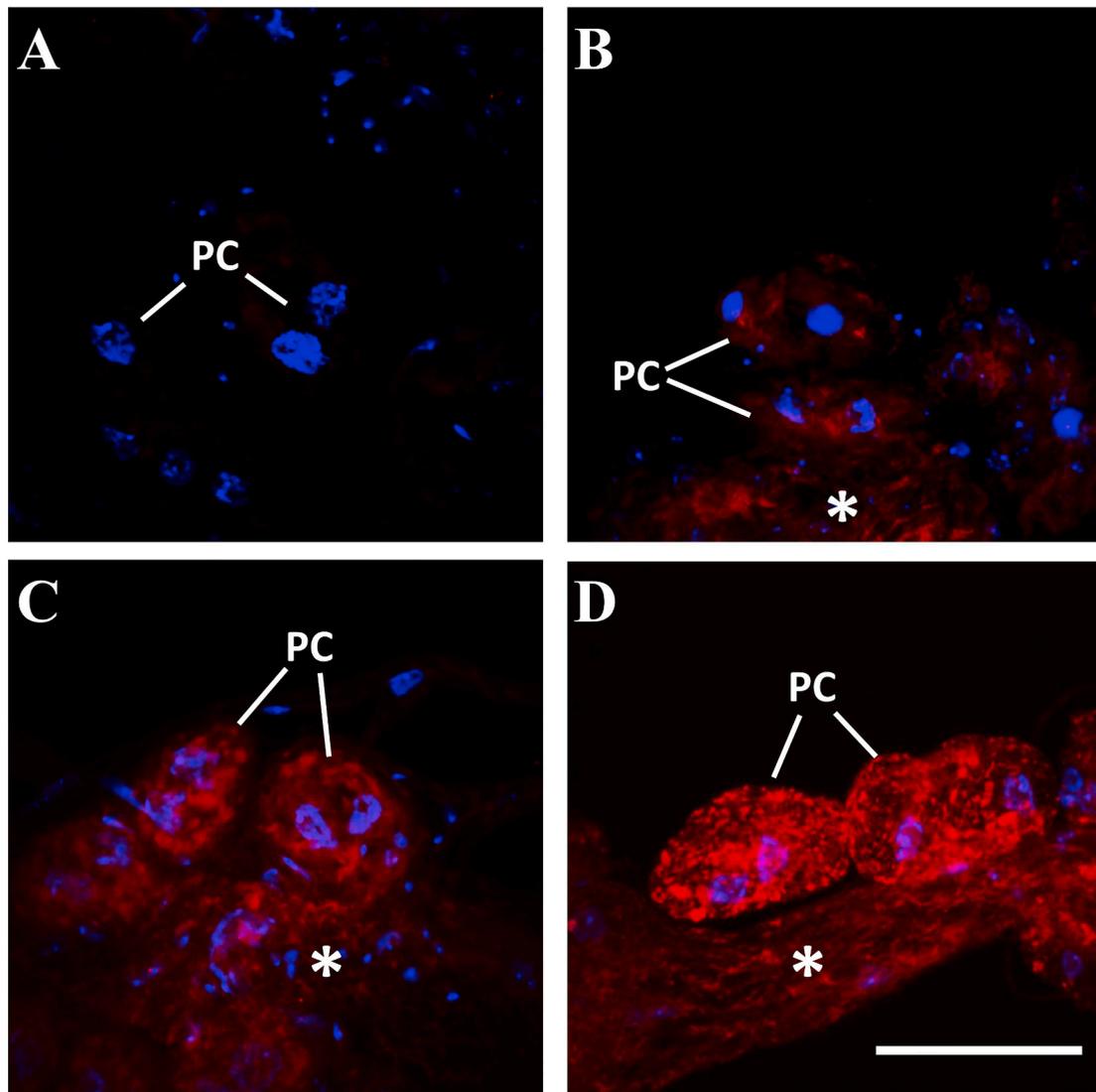
observed in the vicinities of the pericardial cells (Hernández-Martínez et al., 2013). In addition, carefully cleaned heart samples from zymosan-challenged (the main component of the yeast wall) mosquitoes, showed an important lytic activity against *M. luteus*, which was prevented by removing pericardial cells from the heart (Hernández-Martínez et al., 2013). Malaria parasite sporozoites, once released into the hemolymph, are transported by hemolymph flow to dorsal vessel lumen to reach salivary glands. Interestingly, many sporozoites released into hemolymph are caught and killed in heart periostial regions, where sessile hemocytes coincide with the location of pericardial cells that surround the heart (Hillyer et al., 2007), making possible the idea of a synergic collaboration-communication between hemocytes and pericardial cells.

In the heart, each ostium is flanked by pericardial cells, which facilitate the pericardial cells interaction with everything contained in the hemolymph crossing this area (including pathogens). Therefore, like periostial hemocytes, pericardial cells are in a privileged place to the immune system. This feature makes possible that immune markers previously reported in hemocytes and pericardial cells, are also produced by pericardial cells (Barillas-Mury et al., 1999; Danielli et al., 2000, 2003; Levashina et al., 2001). However, this possibility requires further studies.

Lysozymes are considered essential components of the mosquito immune system (Gao and Fallon, 2000). In the African mosquito *An. gambiae*, the family of c-type lysozymes is composed of eight lysozymes (c1 to c8); most of them with functions not well understood (Li et al., 2005). In the present study, bioinformatics analyses allowed us to identify three lysozyme genes in *An. albimanus*: AALB004163 is the ortholog of lysozyme c-6 sequence of *An. gambiae*; AALB005752 is the ortholog of *An. gambiae* c-7 and *Ae. aegypti* c-7B lysozymes; and AALB004517 is grouped with *An. darlingi* ADAC005092 and *An. gambiae* c-1 and c-2 lysozymes. The close relationship of *An. albimanus* and *An. darlingi* c-type lysozyme was not surprising (Fig. 1), because they are American mosquitoes that diverged from African mosquitoes millions of years ago (Neafsey et al., 2015).

Initially, we tried to identify the presence of lysozyme in *An. albimanus* hearts by using a commercial antibody anti-lysozyme from hen egg white in histochemical fluorescence assays. Interestingly, we observed a strong and specific signal only in pericardial cells, but when we performed the Western blot, only one band of approximately 90 kDa was detected (Figs. 3 and 4). This molecular weight was similar to *An. gambiae* lysozyme c-6 (Li et al., 2005) (100.62 kDa), from which *An. albimanus* ortholog is AALB004163 (putative MW 106.21 kDa). Immunohistochemical assays, also showed constitutive signal that did not change, independently of the experimental condition (non-injected, RPMI- or *M. luteus*-injected mosquito), which is in accordance with the previous report to this lysozyme type (Li et al., 2005). As we indicated above, the predicted protein to albLys c-6 lacks a signal peptide, suggesting it is stored in pericardial cells and has a function unrelated to immunity, but needs to be addressed in further studies.

Because *lysozyme c-1* orthologs in *An. gambiae* (Kajla et al., 2010) and *An. darlingi* (Moreira-Ferro et al., 1998) have been associated to immunity, we decided to investigate this in more detail. Lysozymes are components of the first defense line during the immune response, so they have a constitutive expression, but they can also be induced during an immune challenge (Abraham et al., 1995; Chapelle et al., 2009; Kajla et al., 2010; Li et al., 2005; Morishima et al., 1994; Yu et al., 2002). Previously, in an *albimanus* hearts transcriptome, we reported the expression of different genes associated with immune response, including lysozyme (Martínez-Barnette et al., 2012). In *An. albimanus*, we observed a constitutive expression of *albLys c-1* mRNA in “clean heart” samples and whole body from untreated mosquitoes (Fig. 5). Sessile hemocytes in the heart (as in any other organ) are not properly forming part of the organ (which is surrounded by a basal lamina) (Cevik et al., 2019; Sigle and Hillyer, 2016), are just attached and can be removed during the process of heart dissection (Fig. S1). The fact that



**Fig. 8.** *In situ* localization of *albLys c-1* mRNA on mosquito heart. The transcription of lysozyme was analyzed by RNA-FISH on isolated mosquito heart. In red are marked the transcripts to *albLys c-1* with probes tagged with Quasar 570, and DAPI stain (in blue) labeled the cell nuclei of the different heart cell types. A) heart control without probes, B) heart from non-injected mosquitoes, C) and D) hearts at 12h post RPMI- and *M. luteus*-injected mosquitoes respectively. *M. luteus* challenge produced a strong increase in *albLys c-1* mRNA expression in PC. Images are representative areas from five heart samples analyzed in each condition. \*Vessel; PC, pericardial cell. Scale bar, 50  $\mu$ m. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

hemocytes are the only source of PPO (Lu et al., 2014), and because they could be a source of lysozyme (Choi et al., 2012), allowed us to analyze the expression of PPO as sampling quality in our heart dissecting protocol. PPO expression was only observed in whole body samples, indicating that most of sessile hemocytes can be removed by carefully washing the heart samples. Although it has been documented that specific hemocyte population (periostial hemocytes) can remain attached to the heart (Sigle and Hillyer, 2018), we consider that the number of them was reduced. Interestingly, a higher overexpression of the gene for lysozyme *c-1* was recently documented in *An. gambiae* heart, compared with hemocytes, carcass and whole body, in live bacteria infected mosquitoes. Authors hypothesized that pericardial cells and periostial hemocytes were the responsible of lysozyme *c-1* mRNA production (Estévez-Lao et al., 2020). Our results in the American mosquito *An. albimanus* state that *albLys c-1* mRNA source was the heart as well.

As we hypothesized, an *albLys c-1* gene overexpression was observed in heart samples after mosquitoes were *M. luteus*- and *E. coli*-challenged, being in both higher than in *S. cerevisiae*-challenged (Fig. 6). Two signaling pathways are primarily regulating insect immune response: IMD is elicited by Gram-negative bacteria and Toll is mainly elicited by

Gram-positive bacteria and fungi. However, it is also known that cross-activation between them can occur (Clayton et al., 2014; Hillyer, 2016; Kumar et al., 2018; Stokes et al., 2015). Surprisingly, the knowledge we have about the signaling pathways regulating the insect lysozyme gene expression is scarce. The stimulation of a human hepatocytes cell line with *Staphylococcus aureus*, induced an up regulation of lysozyme concentration, which was diminished by addition of a Toll-like receptor 2 antibody (Klüter et al., 2014). In the honeybee *Apis mellifera*, a lysozyme gene overexpression was demonstrated after mechanical wounding or pathogen challenge and a genome-wide analysis of immunity, suggested that lysozyme gene expression could be under the control of Toll pathway (Evans et al., 2006).

In insects, including mosquitoes, lysozymes are overexpressed after a Gram-positive and Gram-negative bacteria challenge (Abraham et al., 1995; Gao and Fallon, 2000; Kajla et al., 2010; League et al., 2017; Li et al., 2005; Morishima et al., 1995, 1994; Nasr and Fallon, 2003), which correlates with our results in mosquito heart. Both, *E. coli* and *M. luteus* induced a strong overexpression of *albLys c-1* gene in heart samples (approximately, twelve-folds and seventeen-folds, respectively) (Fig. 6). Regarding whether fungi can induce the expression of lysozyme in

mosquitoes, no information is available to date. In the present work, despite presenting a significant difference from the control samples ( $P > 0.05$ ), the overexpression of *albLys c-1* gene in hearts from challenged mosquitoes with *S. cerevisiae* was particularly low (approximately three-folds), suggesting that yeasts are not efficient elicitor of lysozyme gene expression under our experimental conditions. However, in addition to its muramidase activity, the hen egg white lysozyme (E. C.3.2.1.17) also presents a quite strong chitinolytic activity by hydrolyzing 1,4- $\beta$ -linkages of chitodextrins between *N*-acetyl-D-glucosamine residues (Mofß et al., 2016). The cell wall dry mass in *S. cerevisiae* contains only 2% of *N*-acetyl-glucosamine (chitin) (Aguilar-Uscanga and François, 2003), therefore, this low amount of chitin seems to be insufficient to induce a higher lysozyme gene expression in mosquito hearts. In this context, it will be necessary to carry out further studies using different amounts of *N*-acetyl-glucosamine or fungi, aimed to determine the possible participation of heart lysozyme during the immune response to fungi.

During the mosquito humoral immune response, different components participate in the lysis of a wide number of pathogens (Hillyer, 2010; Lazzaro, 2008; League et al., 2017). The lytic activity of *An. albimanus* heart extracts vs. *M. luteus*, previously reported (Hernández-Martínez et al., 2013), could be mediated in part by albLys c-1. However, the involvement of other components, such as AMPs (Wu et al., 2018), in the lytic process cannot be ruled out. In the present study we observed the specific participation of lysozyme (albLys c-1) in the lytic process, because the zymogram allows to separate proteins and detect only those that have hydrolase activity against  $\beta$ -1,4-glycosidic linkages in the PGN (Daffre et al., 1994; Hardt et al., 2003; Ito et al., 1992). *Anopheles albimanus* genome contains three genes to c-type lysozymes: *Lysozyme c-1* (AALB004517), *Lysozyme c-6* (AALB004163) and *Lysozyme c-7* (AALB005752), with a mature protein of putative molecular weight of 13.41 kDa, 106.21 kDa, and 27.24 kDa respectively. In the zymogram only one protein with such characteristic was observed, which corresponded to the molecular weight expected for albLys c-1, suggesting its participation in the lytic process of Gram-positive bacteria, as previously reported in mosquito hearts (Hernández-Martínez et al., 2013). In addition, we observed in the zymogram a highest lytic activity in hearts extracts coming from *M. luteus*-injected mosquitoes, which correlates with the overexpression observed in *albLys c-1* gene under similar challenge conditions. These results strongly suggest the participation of mosquito heart during the immune response, through albLys c-1 as a bacteriolytic factor.

Early reports have suggested the presence of lysozyme in *Calliphora erythrocephala*, *Manduca sexta*, and *Leiobunum rotundum* pericardial cells (Crossley, 1972; Russell and Dunn, 1990; Zanger, 1995). However, the evidences were obtained through immunocytochemical, classic lytic assays or bacterial growth inhibition studies, making difficult to distinguish whether pericardial cells either synthesize lysozyme or take it from hemolymph, even to discard the presence of additional lytic molecules (AMPs). We demonstrated that *An. albimanus* pericardial cells express a lysozyme gene (*albLys c-1*), by RNA fluorescent *in situ* hybridization (RNA-FISH) (Fig. 8), suggesting that heart lytic activity previously reported is due, at least in part, to lysozyme produced by pericardial cells. As far as we know, the expression of a gene related to immunity (lysozyme *albLys c-1*) in *An. albimanus* pericardial cells is reported for the first time. On the other hand, reports in different insects indicate that pericardial cells increase intracellular lysozyme levels after an immune challenge (Crossley, 1972; Russell and Dunn, 1990; Zanger, 1995). In *An. gambiae* *Lys c-1* and *c-2* transcripts also are increased after immune challenge (Li et al., 2005). In *An. albimanus*, our results showed strong overexpression of *albLys c-1* gene in heart samples from challenged mosquitoes, suggesting that *albLys c-1* play an important role in the pericardial cells-mediated immune response. Interestingly, in *C. erythrocephala* was reported that pericardial cells synthesize and release lysozyme in response to pathogens invading the hemocoel (Crossley, 1972). Due to albLys c-1 has a signal peptide, we hypothesize

that it could be secreted by *An. albimanus* pericardial cells to participate in pathogen lysis caught in the heart. Nevertheless, further studies will be necessary to address this hypothesis.

## 5. Conclusions

In summary, we identified a c-type lysozyme (*albLys c-1*) in the heart of the American mosquito *An. albimanus*. Our results suggest that albLys c-1 from pericardial cells is an immune related factor because: 1) *albLys c-1* gene is transcriptionally constitutive, but it is overexpressed after an immune challenge. 2) Mosquito heart extracts contains a protein with lytic activity in expected albLys c-1 molecular weight, which increases its abundance in *M. luteus*-challenged mosquitoes. 3) The *albLys-c1* transcriptional overexpression, in heart samples analyzed by RNA-FISH, was observed only in pericardial cells from *M. luteus*-challenged mosquitoes. In conclusion, *An. albimanus* pericardial cells express *albLys-c1* gene, suggesting they may play an important role during the immune response against pathogens invading the mosquito hemocoel.

## Author contributions statement

V.C.-J. and S.H.-M designed the experiments. V.C.-J., V.T. and S.H.-M analyzed the data and wrote the manuscript. V.C.-J. and K.M.-M. performed all qPCR studies. V.C.-J. and A.C.-M. completed the mRNA-FISH studies. All authors reviewed the manuscript.

## Funding

This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACyT, México, grants 258239 and A1-S-27705 to S.H.-M. and V.T., respectively. A CONACyT scholarship 298398 to V.C.-J. and 336294 to K.M.-M.

## Declaration of competing interest

No competing interests declared.

## Acknowledgements

We thanks Dr. Fidel de la Cruz Hernández-Hernández (CINVESTAV) for providing reagents and equipment to standardize RNA-FISH assays.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.dci.2020.103830>.

## References

- Abbaszadeh, E.K., Gavis, E.R., 2016. Fixed and live visualization of RNAs in *Drosophila* oocytes and embryos. *Methods* 98, 34–41. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2016.01.018>.
- Abraham, E.G., Nagaraju, J., Salunke, D., Gupta, H.M., Datta, R.K., 1995. Purification and partial characterization of an induced antibacterial protein in the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Invertebr. Pathol.* 65, 17–24. <https://doi.org/10.1006/jipa.1995.1003>.
- Aguilar-Uscanga, B., François, J.M., 2003. A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. *Lett. Appl. Microbiol.* 37, 268–274. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2003.01394.x>.
- Barillas-Mury, C., Han, Y.-S., Seeley, D., Kafatos, F.C., 1999. *Anopheles gambiae* Ag-STAT, a new insect member of the STAT family, is activated in response to bacterial infection. *EMBO J.* 18, 959–967. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.4.959>.
- Callewaert, L., Michiels, C.W., 2010. Lysozymes in the animal kingdom. *J. Biosci.* 35, 127–160. <https://doi.org/10.1007/s12038-010-0015-5>.
- Castillo, J.C., Robertson, A.E., Strand, M.R., 2006. Characterization of hemocytes from the mosquitoes *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 36, 891–903. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2006.08.010>.
- Cevik, D., Acker, M., Michalski, C., Jacobs, J.R., 2019. Pericardial, a *Drosophila* collagen, facilitates accumulation of hemocytes at the heart. *Dev. Biol.* 454, 52–65. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2019.06.006>.

- Chan, A.S.T., Rodríguez, M.H., Torres, J.A., Rodríguez, M. del C., Villarreal, C., 1994. Susceptibility of three laboratory strains of *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae) to coindigenous *Plasmodium vivax* in southern Mexico. *J. Med. Entomol.* 31, 400–403. <https://doi.org/10.1093/jmedent/31.3.400>.
- Chapelle, M., Girard, P., Cousserans, F., Volkoff, N., Duvic, B., 2009. Lysozymes and lysozyme-like proteins from the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. *Mol. Immunol.* 47, 261–269. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2009.09.028>.
- Chapman, R.F., 1998. Excretion and salt and water regulation. In: *The Insects: Structure and Function*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 478–508.
- Choi, Y.-J., Fuchs, J.F., Mayhew, G.F., Yu, H.E., Christensen, B.M., 2012. Tissue-enriched expression profiles in *Aedes aegypti* identify hemocyte-specific transcriptome response to infection. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 42, 729–738. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2012.06.005>.
- Clayton, A.M., Dong, Y., Dimopoulos, G., 2014. The *Anopheles* innate immune system in the defense against malaria infection. *J. Innate Immun.* 6, 169–181. <https://doi.org/10.1159/000353602>.
- Crossley, A.C., 1972. The ultrastructure and function of pericardial cells and other nephrocytes in an insect: *Calliphora erythrocephala*. *Tissue Cell* 4, 529–560. [https://doi.org/10.1016/s0040-8166\(72\)80029-6](https://doi.org/10.1016/s0040-8166(72)80029-6).
- Daffre, S., Kylsten, P., Samakovlis, C., Hultmark, D., 1994. The lysozyme locus in *Drosophila melanogaster*: an expanded gene family adapted for expression in the digestive tract. *Mol. Gen. Genet.* 242, 152–162. <https://doi.org/10.1007/bf00391008>.
- Danielli, A., Kafatos, F.C., Loukeris, T.G., 2003. Cloning and characterization of four *Anopheles gambiae* serpin isoforms, differentially induced in the midgut by *Plasmodium berghoi* invasion. *J. Biol. Chem.* 278, 4184–4193. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208187200>.
- Danielli, A., Loukeris, T.G., Laguex, M., Müller, H.-M., Richman, A., Kafatos, F.C., 2000. A modular chitin-binding protease associated with hemocytes and hemolymph in the mosquito *Anopheles gambiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. Unit. States Am.* 97, 7136–7141. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.13.7136>.
- Dimopoulos, G., Casavant, T.L., Chang, S., Scheetz, T., Roberts, C., Donohue, M., Benes, V., Bork, P., Ansoorge, W., Soares, M.B., Kafatos, F.C., 2000. *Anopheles gambiae* pilot gene discovery project: identification of mosquito innate immunity genes from expressed sequence tags generated from immune-competent cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. Unit. States Am.* 97, 6619–6624. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.12.6619>.
- Estévez-Lao, T.Y., Sigle, L.T., Gomez, S.N., Hillyer, J.F., 2020. Nitric oxide produced by peristaltic hemocytes modulates the bacterial infection induced reduction of the mosquito heart rate. *J. Exp. Biol.* <https://doi.org/10.1093/jeb/225821>.
- Evans, J.D., Aronstein, K., Chen, Y.P., Hetru, C., Imler, J.-L., Jiang, H., Kanost, M., Thompson, G.J., Zou, Z., Hultmark, D., 2006. Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Mol. Biol.* 15, 645–656. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2006.00682.x>.
- Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783–791. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x>.
- Gao, Y., Fallon, A.M., 2000. Immune activation upregulates lysozyme gene expression in *Aedes aegypti* mosquito cell culture. *Insect Mol. Biol.* 9, 553–558. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2583.2000.00216.x>.
- Glenn, J.D., King, J.G., Hillyer, J.F., 2010. Structural mechanics of the mosquito heart and its function in bidirectional hemolymph transport. *J. Exp. Biol.* 213, 541–550. <https://doi.org/10.1242/jeb.035014>.
- Hardt, M., Guo, Y., Henderson, G., Laine, R.A., 2003. Zymogram with Remazol brilliant blue-labeled *Micrococcus lysodeikticus* cells for the detection of lysozymes: example of a new lysozyme activity in Formosan termite defense secretions. *Anal. Biochem.* 312, 73–76. [https://doi.org/10.1016/S0003-2697\(02\)00443-8](https://doi.org/10.1016/S0003-2697(02)00443-8).
- Hernández-Martínez, S., Lanz, H., Rodríguez, M.H., González-Ceron, L., Tsutsumi, V., 2002. Cellular-mediated reactions to foreign organisms inoculated into the hemocoel of *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 39, 61–69. <https://doi.org/10.1603/0022-2585.39.1.61>.
- Hernández-Martínez, S., Lanz-Mendoza, H., Martínez-Barnette, J., Rodríguez, M.H., 2013. Antimicrobial properties of *Anopheles albimanus* pericardial cells. *Cell Tissue Res.* 351, 127–137. <https://doi.org/10.1007/s00441-012-1505-6>.
- Hernández, S., Lanz, H., Rodríguez, M.H., Torres, J.A., Martínez-Palomó, A., Tsutsumi, V., 1999. Morphological and cytochemical characterization of female *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae) hemocytes. *J. Med. Entomol.* 36, 426–434. <https://doi.org/10.1093/jmedent/36.4.426>.
- Hillyer, J.F., 2016. Insect immunology and hematopoiesis. *Dev. Comp. Immunol.* 58, 102–118. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2015.12.006>.
- Hillyer, J.F., 2010. Mosquito immunity. In: Söderhäll, K. (Ed.), *Invertebrate Immunity*. Springer, Boston, MA, pp. 218–238. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-8059-5\\_12](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-8059-5_12).
- Hillyer, J.F., Barreau, C., Vernick, K.D., 2007. Hemocoel, efficiency of salivary gland invasion by malaria sporozoites is controlled by rapid sporozoite destruction in the mosquito. *Int. J. Parasitol.* 37, 673–681. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.12.007>.
- Hillyer, J.F., Pass, G., 2020. The insect circulatory system: structure, function and evolution. *Annu. Rev. Entomol.* 65, 121–143. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-011019-025003>.
- Hillyer, J.F., Strand, M.R., 2014. Mosquito hemocyte-mediated immune responses. *Curr. Opin. Insect Sci.* 3, 14–21. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2014.07.002>.
- Ito, Y., Yamada, H., Imoto, T., 1992. Colorimetric assay for lysozyme using *Micrococcus luteus* labeled with a blue dye, Remazol brilliant blue R, as a substrate. *Chem. Pharm. Bull.* 40, 1523–1526. <https://doi.org/10.1248/cpb.40.1523>.
- Kajla, M.K., Andreeva, O., Gilbreath III, T.M., Paskewitz, S.M., 2010. Characterization of expression, activity and role in antibacterial immunity of *Anopheles gambiae* lysozyme c-1. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 155, 201–209. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2009.11.012>.
- King, J.G., 2020. Developmental and comparative perspectives on mosquito immunity. *Dev. Comp. Immunol.* 103, 103458. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2019.103458>.
- King, J.G., Hillyer, J.F., 2012. Infection-induced interaction between the mosquito circulatory and immune systems. *PLoS Pathog.* 8, e1003058. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003058>.
- Klüter, T., Fitschen-Oestern, S., Lippross, S., Weuster, M., Mentlein, R., Steubesand, N., Neunaber, C., Hildebrand, F., Pufe, T., Tohidnezhad, M., Beyer, A., Seekamp, A., Varoga, D., 2014. The antimicrobial peptide lysozyme is induced after multiple trauma. *Mediat. Inflamm.* 2014, 303106. <https://doi.org/10.1155/2014/303106>.
- Kumar, A., Srivastava, P., Sirisena, P.D.N.N., Dubey, S.K., Kumar, R., Shrinet, J., Sunil, S., 2018. Mosquito innate immunity. *Insects* 9, 95. <https://doi.org/10.3390/insects9030095>.
- Lazzaro, B.P., 2008. Natural selection on the *Drosophila* antimicrobial immune system. *Curr. Opin. Microbiol.* 11, 284–289. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.05.001>.
- League, G.P., Estévez-Lao, T.Y., Yan, Y., Garcia-Lopez, V.A., Hillyer, J.F., 2017. *Anopheles gambiae* larvae mount stronger immune responses against bacterial infection than adults: evidence of adaptive decoupling in mosquitoes. *Parasites Vectors* 10, 367. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2302-6>.
- League, G.P., Onuh, O.C., Hillyer, J.F., 2015. Comparative structural and functional analysis of the larval and adult dorsal vessel and its role in hemolymph circulation in the mosquito *Anopheles gambiae*. *J. Exp. Biol.* 218, 370–380. <https://doi.org/10.1242/jeb.114942>.
- Leóidio, A.C.M., Ramalho-Ortigão, M., Martins, G.F., 2013. The ultrastructure of the *Aedes aegypti* heart. *Arthropod Struct. Dev.* 42, 539–550. <https://doi.org/10.1016/j.asd.2013.09.005>.
- Levashina, E.A., Moita, L.F., Blandin, S., Vriend, G., Laguex, M., Kafatos, F.C., 2001. Conserved role of a complement-like protein in phagocytosis revealed by dsRNA knockout in cultured cells of the mosquito, *Anopheles gambiae*. *Cell* 104, 709–718. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00267-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00267-7).
- Li, B., Calvo, E., Marinotti, O., James, A.A., Paskewitz, S.M., 2005. Characterization of the c-type lysozyme gene family in *Anopheles gambiae*. *Gene* 360, 131–139. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2005.07.001>.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods* 25, 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- Lu, A., Zhang, Q., Zhang, J., Yang, B., Wu, K., Xie, W., Luan, Y.X., Ling, E., 2014. Insect prophenoxydase: the view beyond immunity. *Front. Physiol.* 5, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00252>.
- Martínez-Barnette, J., Gómez-Barreto, R.E., Ovilla-Muñoz, M., Téllez-Sosa, J., García López, D.E., Dinglasan, R.R., Mohien, C.U., Maccallum, R.M., Redmond, S.N., Gibbons, J.G., Rokas, A., Machado, C.A., Cazares-Raga, F.E., González-Cerón, L., Hernández-Martínez, S., Rodríguez-Lopez, M.H., 2012. Transcriptome of the adult female malaria mosquito vector *Anopheles albimanus*. *BMC Genom.* 13, 207. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-207>.
- Martoja, R., Ballan-Dufrançais, C., 1984. The ultrastructure of the digestive and excretory organs. In: King, R.C., Akai, H. (Eds.), *Insect Ultrastructure*. Springer US, Boston, MA, pp. 199–268. [https://doi.org/10.1007/978-1-4613-2715-8\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4613-2715-8_6).
- Matsuura, A., Yao, M., Aizawa, T., Koganesawa, N., Masaki, K., Miyazawa, M., Demura, M., Tanaka, I., Kawano, K., Nitta, K., 2002. Structural analysis of an insect lysozyme exhibiting catalytic efficiency at low temperatures. *Biochemistry* 41, 12086–12092. <https://doi.org/10.1021/bi016099j>.
- McGettigan, J., McLennan, R.K.J., Broderick, K.E., Kean, L., Allan, A.K., Cabrero, P., Regulski, M.R., Pollock, V.P., Gould, G.W., Davies, S.A., Dow, J.A.T., 2005. Insect renal tubules constitute a cell-autonomous immune system that protects the organism against bacterial infection. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35, 741–754. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2005.02.017>.
- Moreira-Ferro, C.K., Daffre, S., James, A.A., Marinotti, O., 1998. A lysozyme in the salivary glands of the malaria vector *Anopheles darlingi*. *Insect Mol. Biol.* 7, 257–264. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.1998.00067.x>.
- Morishima, I., Horiba, T., Iketani, M., Nishioka, E., Yamano, Y., 1995. Parallel induction of cecropin and lysozyme in larvae of the silkworm, *Bombyx mori*. *Dev. Comp. Immunol.* 19, 357–363. [https://doi.org/10.1016/0145-305x\(95\)00019-9](https://doi.org/10.1016/0145-305x(95)00019-9).
- Morishima, I., Horiba, T., Yamano, Y., 1994. Lysozyme activity in immunized and non-immunized hemolymph during the development of the silkworm, *Bombyx mori*. *Comp. Biochem. Physiol.* 108A, 311–314. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(94\)90100-7](https://doi.org/10.1016/0300-9629(94)90100-7).
- Moß, K., Zibek, S., Hirth, T., Rupp, S., 2016. Chitin-converting enzymes. In: Grunwald, P. (Ed.), *Handbook of Carbohydrate-Modifying Biocatalysts*. Pan Stanford Publishing Pte Ltd.
- Nasr, N.M., Fallon, A.M., 2003. Detection of lysozyme-like enzymatic activity secreted by an immune-responsive mosquito cell line. *J. Invertebr. Pathol.* 82, 162–166. [https://doi.org/10.1016/S0022-2011\(03\)00030-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2011(03)00030-2).
- Neafsey, D.E., Waterhouse, R.M., Abai, M.R., Aganezov, S.S., Alekseyev, M.A., Allen, J. E., Amon, J., Arcá, B., Arensburg, P., Artemov, G., Assour, L.A., Basseri, H., Berlin, A., Birren, B.W., Blandin, S.A., Brockman, A.I., Burkot, T.R., Burt, A., Chan, C. S., Chauve, C., Chiu, J.C., Christensen, M., Costantini, C., Davidson, V.L.M., Deligianni, E., Dottorini, T., Dritsou, V., Gabriel, S.B., Guelbeogo, W.M., Hall, A.B., Han, M.V., Hlaing, T., Hughes, D.S.T., Jenkins, A.M., Jiang, X., Jungreis, I., Kakani, E.G., Kamali, M., Kempainen, P., Kennedy, R.C., Kirmiziloglu, I.K., Koekemoer, L.L., Laban, N., Langridge, N., Lawniczak, M.K.N., Lirakis, M., Lobo, N. F., Lowy, E., MacCallum, R.M., Mao, C., Maslen, G., Mbogo, C., McCarthy, J., Michel, K., Mitchell, S.N., Moore, W., Murphy, K.A., Naumenko, A.N., Nolan, T.,

- Noiva, E.M., O'Loughlin, S., Oringanje, C., Oshaghi, M.A., Pakpour, N., Papathanos, P.A., Peery, A.N., Povelones, M., Prakash, A., Price, D.P., Rajaraman, A., Reimer, L.J., Rinker, D.C., Rokas, A., Russell, T.L., Sagnon, N., Sharakhova, M.V., Shea, T., Simão, F.A., Simard, F., Slotman, M.A., Somboon, P., Stegny, V., Struchiner, C.J., Thomas, G.W.C., Tojo, M., Topalis, P., Tubio, J.M.C., Unger, M.F., Vontas, J., Walton, C., Wilding, C.S., Willis, J.H., Wu, Y.-C., Yan, G., Zdobnov, E.M., Zhou, X., Catteruccia, F., Christophides, G.K., Collins, F.H., Cornman, R.S., Crisanti, A., Donnelly, M.J., Emrich, S.J., Fontaine, M.C., Gelbart, W., Hahn, M.W., Hansen, I.A., Howell, P.L., Kafatos, F.C., Kellis, M., Lawson, D., Louis, C., Luckhart, S., Muskavitch, M.A.T., Ribeiro, J.M., Riehle, M.A., Sharakhov, I.V., Tu, Z., Zwiebel, L.J., Besansky, N.J., 2015. Highly evolvable malaria vectors: the genomes of 16 *Anopheles* mosquitoes. *Science* 347, 1258522. <https://doi.org/10.1126/science.1258522>.
- Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C., Ferrin, T.E., 2004. UCSF Chimera - a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* 25, 1605–1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>.
- Ramirez, J.L., Dimopoulos, G., 2010. The Toll immune signaling pathway control conserved anti-dengue defenses across diverse *Ae. aegypti* strains and against multiple dengue virus serotypes. *Dev. Comp. Immunol.* 34, 625–629. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2010.01.006>.
- Robert, X., Gouet, P., 2014. Deciphering key features in protein structures with the new ENDScript server. *Nucleic Acids Res.* 42, 320–324. <https://doi.org/10.1093/nar/gku316>.
- Russell, V.W., Dunn, P.E., 1990. Lysozyme in the pericardial complex of *Manduca sexta*. *Insect Biochem.* 20, 501–509. [https://doi.org/10.1016/0020-1790\(90\)90032-3](https://doi.org/10.1016/0020-1790(90)90032-3).
- Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406–425. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.Y., White, D.J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., Cardona, A., 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* 9, 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>.
- Schulenburg, H., Boehnisch, C., Michiels, N.K., 2007. How do invertebrates generate a highly specific innate immune response? *Mol. Immunol.* 44, 3338–3344. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2007.02.019>.
- Sigle, L.T., Hillyer, J.F., 2016. Mosquito hemocytes preferentially aggregate and phagocytose pathogens in the periostial regions of the heart that experience the most hemolymph flow. *Dev. Comp. Immunol.* 55, 90–101. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2015.10.018>.
- Sigle, L.T., Hillyer, J.F., 2018. Mosquito hemocytes associate with circulatory structures that support intracardiac retrograde hemolymph flow. *Front. Physiol.* 9, 1187. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01187>.
- Stokes, B.A., Yadav, S., Shokal, U., Smith, L.C., Eleftherianos, I., 2015. Bacterial and fungal pattern recognition receptors in homologous innate signaling pathways of insects and mammals. *Front. Microbiol.* 6, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00019>.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725–2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst1197>.
- Tzou, P., Ohresser, S., Ferrandon, D., Capovilla, M., Reichhart, J.-M., Lemaitre, B., Hoffmann, J.A., Imler, J.-L., 2000. Tissue-specific inducible expression of antimicrobial peptide genes in *Drosophila* surface epithelia. *Immunity* 13, 737–748. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)00072-8](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)00072-8).
- Ursic Bedoya, R.J., Mitzey, A.M., Obratsova, M., Lowenberger, C., 2005. Molecular cloning and transcriptional activation of lysozyme-encoding cDNAs in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Mol. Biol.* 14, 89–94. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2004.00534.x>.
- Waterhouse, A.M., Procter, J.B., Martin, D.M.A., Clamp, M., Barton, G.J., 2009. Jalview Version 2-A multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* 25, 1189–1191. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp033>.
- Waterhouse, R.M., Kriventseva, E.V., Meister, S., Xi, Z., Alvarez, S., Bartholomay, L.C., Barillas-mury, C., Bian, G., Christensen, B.M., Dong, Y., Jiang, H., Kanost, M.R., Koutsos, A.C., Levashina, E.A., Li, J., Ligoxygakis, P., Maccallum, M., Mayhew, G.F., Mendes, A., Michel, K., Osta, M.A., 2007. Evolutionary dynamics of immune-related genes and pathways in disease-vector mosquitoes. *Science* 316, 1738–1743. <https://doi.org/10.1126/science.1139862>.
- Wu, Q., Patočka, J., Kuča, K., 2018. Insect antimicrobial peptides, a mini review. *Toxins* 10, 461. <https://doi.org/10.3390/toxins10110461>.
- Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., Zhang, Y., 2015. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nat. Methods* 12, 7–8. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3213>.
- Yu, K.H., Kim, K.N., Lee, J.H., Lee, S.H., Kim, S.H., Cho, K.Y., Nam, M.H., Lee, I.H., 2002. Comparative study on characteristics of lysozymes from the hemolymph of three lepidopteran larvae, *Galleria mellonella*, *Bombyx mori*, *Agrius convolvuli*. *Dev. Comp. Immunol.* 26, 707–713. [https://doi.org/10.1016/s0145-305x\(02\)00027-7](https://doi.org/10.1016/s0145-305x(02)00027-7).
- Zanger, K., 1995. Immunocytochemical localization of lysozyme in the nephrocytes of the harvestman, *Leiobunum rotundum*. *Tissue Cell* 27, 299–308. [https://doi.org/10.1016/s0040-8166\(95\)80050-6](https://doi.org/10.1016/s0040-8166(95)80050-6).