



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINÁMICA CELULAR

***“Búsqueda y expresión de un receptor hipotético de la
hormona adipocinética en Anopheles albimanus”***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

BIÓL. GRECIA GABRIELA HERNÁNDEZ DÍAZ

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Cuauhtémoc Juan Humberto Lanz Mendoza

CUERNAVACA, MORELOS

ENERO, 2020

Jurado revisor de tesis

Presidente: Dr. Alejandro Alvarado Delgado. CISEI-INSP

Secretario: Dra.: Verónica Mercedes Narváez Padilla. CIDC-UAEM

Vocal: Dra. María Angélica Santana Calderón. CIDC-UAEM

Suplente: Dr. Cuauhtémoc Juan Humberto Lanz Mendoza. CISEI-INSP

Suplente: Dr. Rodrigo Said Razo Hernández. CIDC-UAEM

RESUMEN

Los insectos han sobrevivido en coexistencia con microorganismos, algunos potencialmente patógenos, logrando desarrollar diversas estrategias de defensa. Se ha descrito, que algunas de estas estrategias, involucran la liberación de neuropéptidos, los cuales podrían estar actuando como moduladores de la actividad inmune. Las hormonas adipocinéticas se han asociado a la regulación de la respuesta inmune, de manera indirecta, a través de la activación de hemocitos circulantes (Wiesner, A. et al; 1997), o directa, potenciando la actividad de la fenoloxidasa (Goldsworthy, G. et al; 2002), sin embargo, la expresión de los receptores de estas hormonas, no ha sido, ampliamente investigada. Datos generados en nuestro grupo de trabajo, muestran una sobreexpresión de la AKH II (hormona adipocinética II) en cerebros de mosquitos *Anopheles albimanus*, infectados con el parásito de la malaria *Plasmodium berghei*, así como un posible potenciamiento en la expresión de péptidos antimicrobianos, por AKH en intestino medio. Por lo tanto, el interés de identificar un receptor de AKH y conocer su patrón de expresión en diversos órganos y estadios del mosquito es de gran importancia para continuar elucidando las probables funciones diversas de estas moléculas.

De tal forma que, el presente trabajo se centró en realizar la búsqueda *In silico* de una secuencia con características básicas descritas para un receptor de AKH y analizar su expresión a través de PCR Tiempo Real, en abdomen e intestino medio, así como en toda la ontogenia del mosquito *Anopheles albimanus*. Obteniendo como resultados la identificación de la secuencia AALB008204 como receptor hipotético de AKH en *An. albimanus*, así como la validación del transcrito en abdomen e intestino medio y durante el desarrollo larval de *An. albimanus*. Además, se analizó la expresión de AKHR hipotético en larva etapa 4 de *An. albimanus*, durante un reto con *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli* y zymosan. Interesantemente la expresión de AKHR hipotético disminuyó después de un reto con *E.coli* a las 6 horas.

DEDICATORIA

Dedico todo mi esfuerzo plasmado en este proyecto a mis padres, Elizabeth y Francisco, así como a mis hermanos, Yael y Brisseida. Padres gracias por seguirme apoyando incondicionalmente en mi formación académica, por ser, aparte de excelentes padres, mis amigos. Gracias a ustedes y a su arduo trabajo, me han ayudado a mejorar y a superarme académicamente. Los amo

A mi mentor académico, el Dr. Alejandro, por su desinteresada ayuda, por echarme una mano cuando lo necesité y por todas sus contribuciones al proyecto. Gracias Dr. Alejandro

AGRADECIMIENTOS

Agradecer de manera muy especial al Dr. Humberto Lanz, por permitirme seguir en su grupo de trabajo, y abrir incondicionalmente las puertas de su laboratorio. Por creer en mis capacidades como alumna, por su amabilidad, sus aportaciones y por su paciencia, pero sobre todo, por la gran motivación que medió al final para terminar totalmente mi tesis.

Agradecimientos al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico otorgado, con el número de becario 627860, para la realización de este proyecto de investigación y el cual fue necesario para lograr obtener un grado académico más.

Agradezco a mis amigos, el Dr. Jorge Cime y a la M. en C. Valeria Vargas, por toda su ayuda académica desinteresada al escucharme, enseñarme, ayudarme a despejar dudas y motivarme para continuar con mi proyecto.

Todo mi agradecimiento y cariño a Emm, por absolutamente todo el apoyo moral, para continuar escribiendo y finalizar mi trabajo. Por batallar junto conmigo, con mis emociones, con los días malos y los momentos de estrés. Resaltando toda la motivación que me daba en todos esos días que lo necesité.

A mis amigos y compañeros de laboratorio, Vale, Jorge Nely, Juan y Charlie, gracias. Por compartir conmigo horas de trabajo en el laboratorio así como consejos, enseñanzas y todos los buenos momentos que me hicieron muy amena mi estancia en el INSP.

Agradezco a todo el comité evaluador por ayudarme a formarme académicamente y todas sus valiosas aportaciones para la mejora del proyecto.

Gracias a mis abuelos Fermín y Marcela por su amor y apoyo incondicional.

ÍNDICE

Contenido

1. MARCO TEÓRICO	1
1.1 Generalidades del género <i>Anopheles</i>	1
1.1.2 Morfología y anatomía de los Anophelinos	3
1.1.3 El género <i>Anopheles</i> como modelo de estudio.....	5
1.2 Fisiología y anatomía del sistema digestivo de los Culícidos.	7
1.3 Sistema nervioso central en insectos.....	10
1.4 Sistema neurosecretor en insectos.....	12
1.4.1 Receptores acoplados a proteína G y su función	18
1.4.2 Hormonas adipocinéticas y su receptor acoplado a proteína G	21
1.5 Respuesta inmune en insectos.....	28
2. ANTECEDENTES	30
3. JUSTIFICACIÓN	35
4. HIPÓTESIS	36
5. OBJETIVO GENERAL	36
5.1 OBJETIVOS PARTICULARES	36
6. MATERIALES Y MÉTODOS	37
6.1 Búsqueda y análisis <i>In silico</i> de una secuencia putativa de AKHR en el genoma de <i>Anopheles albimanus</i>	37
6.1.1 Crianza de <i>Anopheles albimanus</i> y obtención de material biológico	37
6.1.2 Amplificación de AKHR por punto final en abdómenes e intestinos de <i>Anopheles albimanus</i>	38
6.1.3 Disección de abdomen e intestino.....	38
6.2 Amplificación de AKHR hipotético durante el desarrollo larval de <i>Anopheles albimanus</i>	40
6.3 Analizar la expresión relativa del receptor hipotético de AKHR en la etapa larval 4 de <i>Anopheles albimanus</i> , después de un reto con <i>M.luteus</i> o <i>E.coli</i> o zymosan.....	41
7. RESULTADOS	43
7.1 Búsqueda y análisis <i>In silico</i> de una secuencia putativa de AKHR en el genoma de <i>Anopheles albimanus</i>	43
7.1.2 Amplificación de AKHR por punto final en abdómenes e intestinos de <i>Anopheles albimanus</i>	45
7.2 Amplificación de AKHR hipotético durante el desarrollo larval de <i>Anopheles albimanus</i>	47
7.3 Expresión relativa del receptor hipotético de AKHR en la etapa larval 4 de <i>Anopheles albimanus</i> , después de un reto con <i>M.luteus</i> , <i>E.coli</i> o zymosan.	49
8. DISCUSIÓN	53

8.1 Búsqueda y análisis <i>In silico</i> de una secuencia putativa de AKHR en el genoma de <i>Anopheles albimanus</i>	54
8.1.2 Amplificación de AKHR por punto final en abdómenes e intestinos de <i>Anopheles albimanus</i>	57
8.2 Amplificación de AKHR hipotético durante el desarrollo larval de <i>Anopheles albimanus</i>	60
8.3 Analizar la expresión relativa del receptor hipotético de AKHR en la etapa larval 4 de <i>Anopheles albimanus</i> , después de un reto con <i>M.luteus</i> o <i>E.coli</i> o zymosan.	60
9. CONCLUSIONES	62
10. PERSPECTIVAS	63
11. ANEXOS	64
.....	65
.....	66
.....	67
12. REFERENCIAS.....	68

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de los mosquitos (p.2).

Figura 2. Morfología externa de la etapa adulta del genero *Anopheles* (p.4).

Figura 3. Morfología externa de la larva del genero *Anopheles* (p.5).

Figura 4. Predicción de la distribución de *Anopheles albimanus* en la republica mexicana (p.7).

Figura 5. Sistema digestivo de los culícidos (p.9).

Figura 6. Sistema nervioso central en insectos (p.11).

Figura 7. Sistema endocrino o neurosecretor en insectos (p.15).

Figura 8. Estructura clásica de un receptor acoplado a proteína G (GPCR) (p.19).

Figura 9. Estructura del gen de AKH-I de *Anopheles gambiae* (p.22).

Figura 10. Traducción de señal por AKH para la función hipertrehalosémica. (p.24).

Figura 11. Traducción de señal para la actividad hiperlipémica de AKH (p.25).

Figura 12. Estructura del gen AKHR (p.26).

Figura 13. Análisis filogenético del receptor de AKH (p.27).

Figura 14. Mapa conceptual de la respuesta inmune en mosquitos (p.30).

Figura 15. Grafica de la actividad de la fenoloxidasa en *Locusta migratoria* (p.31).

Figura 16. Expresión de neuropéptidos en cerebros de *Anopheles albimanus* (p.32).

Figura 17. Expresión de péptidos antimicrobianos en intestino medio de *Anopheles albimanus* (p.33).

Figura 18. Distribución tisular de la expresión del receptor de AKH en *Sarcrofaga crassipalpis* (p.34).

Figura 19. Esquema general de la agrupación de *Anopheles albimanus* para la disección de abdomen e intestino medio (p.38).

Figura 20. Etapas navales de *Anopheles albimanus* (p.41).

Figura 21. Esquema del diseño experimental del reto en larva 4 de *Anopheles albimanus* (p.42).

Figura 22. Análisis tipo TMHMM para la predicción de hélices transmembrana en secuencia proteicas (p.44).

Figura 23. Amplificación de AKHR hipotético en abdomen (p.46).

Figura 24. Amplificación de AKHR hipotético en intestinos (p.46).

Figura 25. Electroferograma de la secuenciación de AKHR hipotético (p.47).

Figura 26. Amplificación de AKHR hipotético en larvas de *Anopheles albimanus* (p.48).

Figura 27. Expresión relativa ($\Delta\Delta\text{ct}$) de AKHR hipotético durante el desarrollo larval (p.48).

Figura 28. Graficas de la expresión relativa ($2^{-\Delta\Delta\text{ct}}$) de larvas en etapa 4 durante un reto (pp.50-52).

Figura 29. Estructura de AKHR hipotético en *Anopheles albimanus* (p.56).

Figura 30. Esquema que ilustra el desarrollo de la propuesta experimental (p.57).

Figura 31. Diseño experimental para la amplificación de AKHR hipotético en abdomen e intestinos (p.58).

Figura 32. Amplificación de AKHR hipotético y posibles isoformas (p.59).

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Neuropéptidos y sus funciones (p.16).

Tabla 2. Comparación de frecuencias de *Anopheles gambiae* y *Anopheles albimanus* (p.43).

Tabla 3. Dominios compartidos entre AGAP002156 (AKHR) y AALB008204 (AKHR) (p.44).

Tabla 4. Posiciones de aminoácidos de cada dominio hélice transmembrana (p.45).

Tabla 5. Medias de la expresión relativa de AKHR hipotético después de un reto en L4 (p.50).

Tabla 6. Secuencias obtenidas del análisis de tipo blastn (p.55).

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Generalidades del género *Anopheles*.

El género *Anopheles* está formado por organismos comúnmente llamados mosquitos y pertenece al orden Díptera y a la familia Culicidae así como al Filo Artrópoda. Destaca el orden Díptera como un grupo constituido por una amplia variedad de insectos que son considerados de interés para la salud de la población humana. El número de especies clasificadas dentro de la familia Culicidae, es de 3500 aproximadamente, a su vez son clasificados dentro de tres subfamilias: Toxorhynchites, Anophelinae y Culicinae. (Clements, A. 1992).

Los mosquitos son organismos que se encuentran en casi todos los hábitats. Alrededor de tres cuartas partes de las especies se distribuyen en zonas húmedas tropicales o subtropicales, el cual es un clima ideal donde se lleva a cabo su ciclo biológico (Clements, A.1992). Es importante destacar el ciclo biológico de los mosquitos (figura 1), caracterizado por tener cuatro etapas de desarrollo, el huevo, la larva, pupa y el adulto. El ciclo inicia con la oviposición, acción que se refiere al depósito de huevecillos por la hembra, en la orilla de una zona acuática y los cuales después de dos o más días eclosionan a la siguiente etapa del desarrollo, la larva. Este estadio del desarrollo se distingue por tener cuatro fases que van desde larva fase 1 hasta larva fase 4, correspondientes al número de mudas y crecimiento de la larva. Su alimentación incluye a microorganismos que crecen en el agua, las microalgas como diatomeas y protozoarios, entre ellos, dinoflagelados y *Paramecium*. Después de la última fase larval, los apéndices son consolidados en forma de un cefalotórax y toma una postura encorvada, este estadio del desarrollo se denomina pupa. Posteriormente, la pupa inicia el proceso de metamorfosis, proceso en donde se lleva a cabo el desarrollo del cuerpo del mosquito, el cual emergerá después de uno a dos días. (Clements, A. 1992; Gullan, P. & Cranston, P. 2010).

En el momento que el mosquito va a emerger, comienza a ingerir aire lo que provoca la expansión y apertura de la cutícula que formaba a la pupa, a la vez que el mosquito expande sus alas para emprender el vuelo (Clements, A. 1992; Gullan, P. & Cranston, P. 2010).

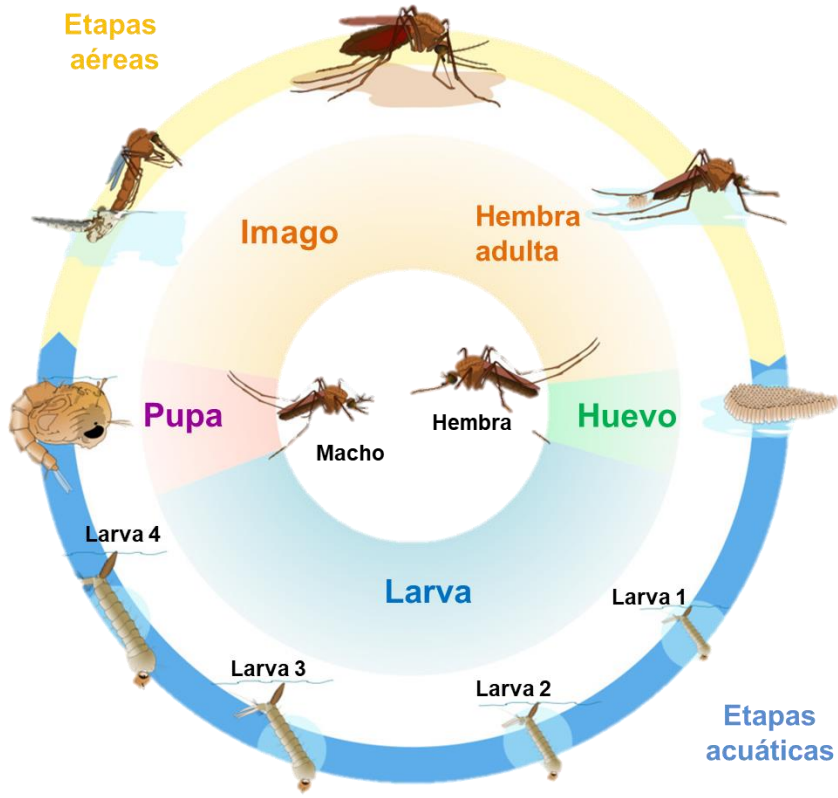


Figura 1. Ciclo de vida de los mosquitos. El ciclo comienza cuando la hembra deposita los huevecillos en el agua y estos se desarrollan a larvas (L1, L2, L3 y L4). El tercer estadio de desarrollo es la pupa y después de uno o dos días, la cutícula de quitina que protege a la pupa se rompe y emerge el imago. Cada cambio de estadio significa un cambio de muda.

Es necesario mencionar que el ciclo de vida que llevan a cabo las especies Anophelinas y de los mosquitos en general, tiene una durabilidad corta a parte que le otorga la ventaja de desarrollarse en cualquier ambiente acuoso, mientras las condiciones climáticas sean las adecuadas.

En cuanto a la alimentación de los *Anopheles* machos y hembras, se conoce que son capaces de succionar y obtener néctar de plantas, siendo los carbohidratos el ingrediente principal, ya que son utilizados como fuente de energía, sobre todo para ejercer la actividad de vuelo. No obstante para poder desarrollar sus huevecillos, la hembra necesita una segunda fuente de nutrientes de la que toma proteínas necesarias para este proceso. Esta fuente alterna de nutrientes es la sangre de individuos mamíferos, que obtiene utilizando su probóscide capaz de perforar y entrar a través de los poros de la epidermis (Clements, A. 1992). Es por eso que las hembras de las subfamilias Anophelinae y Culicinae se caracterizan por ser hematófagas y a través de la penetración de la probóscide se inyecta saliva puede transmitir organismos infecciosos cómo parásitos del género *Plasmodium* (Clements, A. 1992).

1.1.2 Morfología y anatomía de los Anophelinos

De acuerdo con su desarrollo los Anofelinos se consideran insectos holometábolos, ya que presentan una metamorfosis completa, cambiando de morfología en cada etapa de su desarrollo (Triplehorn, C. & Johnson, N. 2005).

Las principales características de los adultos y las etapas larvales son:

- ***Anopheles adulto.*** Morfológicamente los Anophelinos adultos presentan un cuerpo pequeño de entre 5 a 15 mm de longitud, dividido en tres secciones o tagmas visibles y reconocibles: cabeza, tórax y abdomen (figura 2). En el área que pertenece a la cabeza, se aloja un par de ojos compuestos, las antenas y la probóscide; los apéndices bucales del macho son más cortos a comparación de la hembra, la cual posee estos apéndices largos en forma de aguja para penetrar el tejido epidermal. Los palpos maxilares son largos en ambos sexos pero en el mosquito macho son usualmente redondeados a diferencia de los palpos maxilares de la hembra. Las antenas en los machos poseen mayor abundancia de plumas que en las hembras, facilitando su clasificación por sexos (Gállego, J. 2006;

Triplehorn, C. & Johnson, N. 2005). En el Tórax, se localizan las alas mesotorácicas, formadas por venas longitudinales de gran importancia taxonómica. Por último el abdomen constituido de 7 a 8 segmentos bien definidos y visualmente identificables (Gállego, J. 2006).

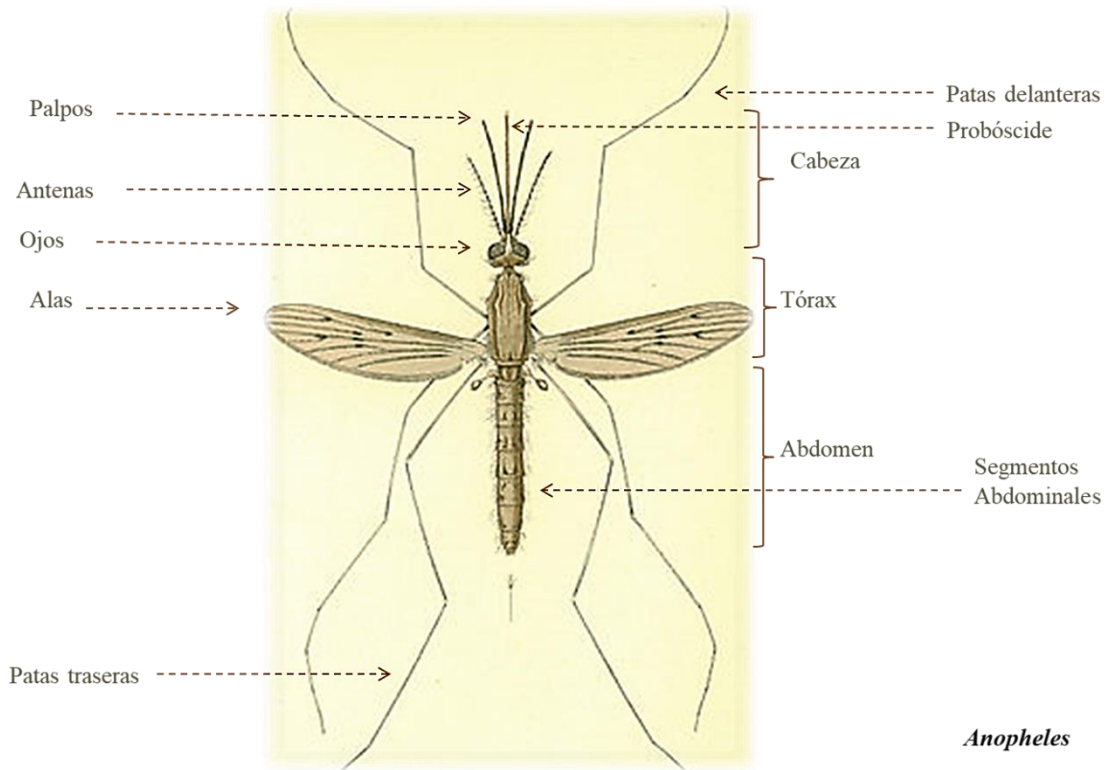


Figura 2. Morfología externa de la etapa adulta del género *Anopheles*. Se observan los tres tagmas del cuerpo de un mosquito hembra *Anopheles albimanus*; la cabeza, el tórax y el abdomen, así mismo, las estructuras que presenta en cada uno. Fuente Ruppert, E., et al. 2004.

- **Etapa Larval.** El desarrollo larvario de los Anophelinos, se lleva a cabo en un ambiente acuático, del cual tomarán los nutrientes necesarios para crecer y mudar durante cuatro etapas larvales. Morfológicamente, en la larva se distinguen tres tagmas al igual que la etapa adulta de *Anopheles*, por lo cual se logra visualizar la cabeza, tórax y el abdomen (figura 3). Estas tres secciones están abastecidas de una gran cantidad de pelos ó setas, los cuales son de gran interés taxonómico. En el área de la cabeza, se localizan las antenas y los apéndices bucales provistos de tufos de

pelos. El tórax, se describe como un segmento globuloso, insegmentado y más ancho que la cabeza. Finalmente, el abdomen se caracteriza por estar seccionado en nueve segmentos: el penúltimo, portador de los espiráculos, necesarios para conectar el sistema respiratorio de la larva con el exterior, e implantados en el extremo de un sifón respiratorio; el siguiente y último segmento, está formado por cuatro papilas anales para el desecho de productos de la digestión (Gállego, J. 2006).

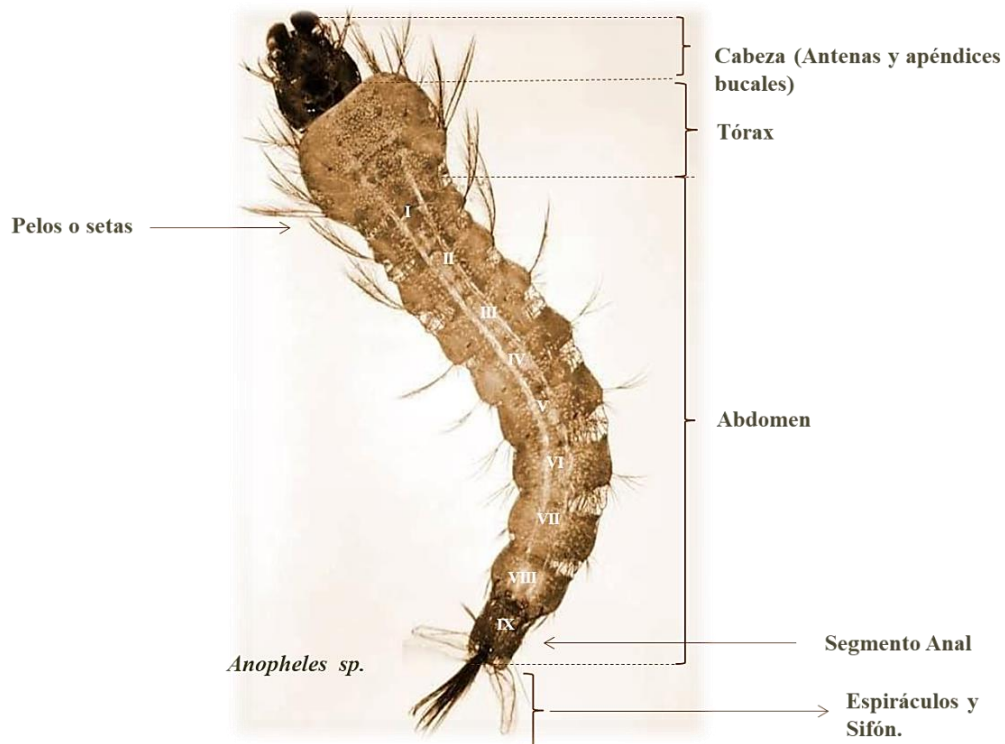


Figura 3. Morfología externa de la larva del género *Anopheles*. Se observan los tres tagmas del cuerpo: cabeza, tórax y abdomen y órganos que están presentes en cada segmento. Obtenida y modificada de CDC Public Health Image Library, Harry Weinburgh.

1.1.3 El género *Anopheles* como modelo de estudio

El género *Anopheles* destaca por la capacidad que poseen sus miembros para transmitir microorganismos patógenos, clasificándolos como organismos vectores de enfermedades infecciosas en particular de la malaria o paludismo. En los individuos que presentan esta enfermedad se observa: fiebres altas, cefaleas y vómitos, como consecuencia de la invasión y dispersión de parásitos en el hígado

y eritrocitos (WHO, 2018). Sin embargo, sólo determinadas especies de *Anopheles* son capaces de transmitir el agente causal del paludismo en humanos, por la dependencia de múltiples factores del parásito y del vector, entre estos, la capacidad vectorial, la presencia de barreras naturales a la infección, barreras inmunológicas por parte del vector, así como la presencia de receptores específicos para el parásito (Bown, D. & Nelson, M., 1993).

En México hay reportadas tres especies del género *Anopheles* capaces de transmitir *Plasmodium* y propagar el paludismo: *Anopheles albimanus* Wiedemann, 1820; distribuida en las zonas costeras de <100 m sobre el nivel del mar (figura 4), *Anopheles pseudopunctipennis* Theobald, 1901; distribuida en zonas elevadas en un rango de 200 y 2000 m sobre el nivel del mar y *Anopheles vestitipennis* Dyar & Knab 1906; la cual se localiza en la selva Lacandona y el sur de Chiapas (Casas, M., y Bonilla, A., 2006).

A nivel nacional los casos de paludismo, a partir del año 2010 al 2015, se han reducido significativamente, colocando al país en situación cercana de erradicación de la enfermedad. Sin embargo, el último reporte de la Organización Mundial de la Salud, en México, registró 736 casos durante el 2017, obteniendo un aumento de +185 casos de los reportados en el 2016. Por lo tanto, las medidas de prevención y control entomológico de *Anopheles* son importantes para mantener controlados el número de casos de paludismo, así como la investigación científica para el desarrollo de nuevas herramientas para el control del vector (WHO, 2018).

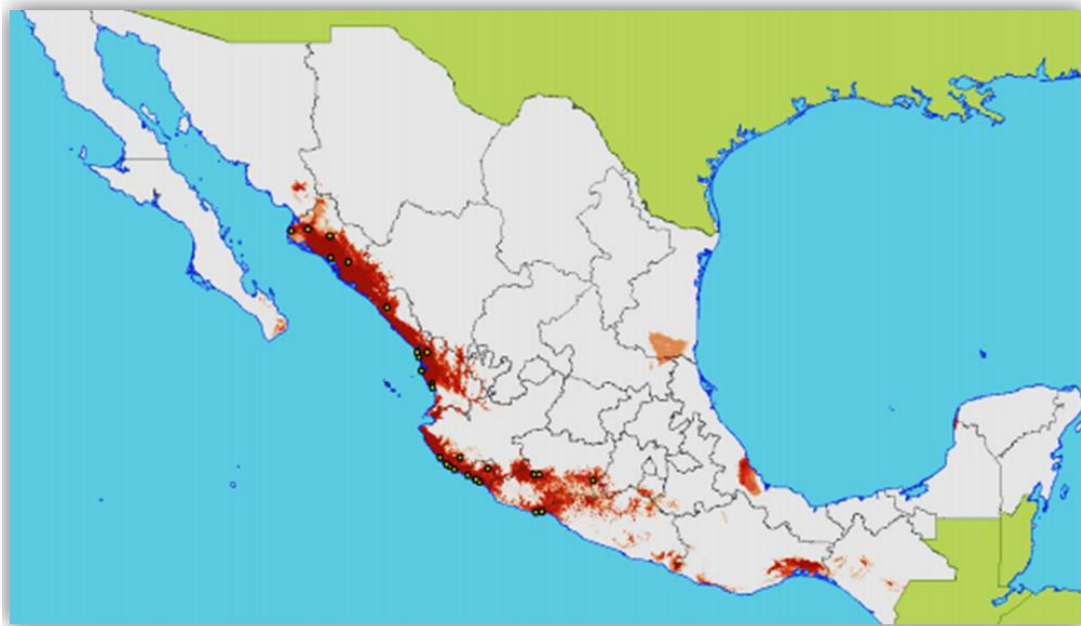


Figura 4. Predicción de la distribución de *Anopheles albimanus* en la República Mexicana. Los círculos en el mapa corresponden a las colectas realizadas para determinar los nichos ecológicos de la especie. Tomada de Casas Martínez, M., A. Orozco Bonilla y J. G. Bond Compeán. 2012.

Conocer la fisiología y anatomía general de los mosquitos, es importante para entender el funcionamiento interno de todo el organismo y a su vez, los cambios y el estado fisiológico generado por la interacción parásito-vector, en el caso de *Anopheles*. Son importantes para entender el desarrollo y funcionamiento de las herramientas utilizadas para el control entomológico, como son los insecticidas y su acción en el sistema nervioso. Por lo anterior, es necesario explorar nuevas líneas de investigación que en un futuro brinden aportaciones importantes para limitar el desarrollo de organismos vectores de enfermedades, como los mosquitos.

1.2 Fisiología y anatomía del sistema digestivo de los Culícidos.

Los Culícidos consumen una variedad de alimento dependiendo de la etapa de desarrollo. Las larvas, las cuales están en un ambiente acuático consumen protozoarios, entre algunos *Paramecium*. El mosquito en etapa adulta, tiene la

capacidad de nutrirse a partir del consumo del néctar de plantas, y la hembra de la sangre de mamíferos, pues es esencial para el desarrollo de huevecillos (Gullan, P. & Cranston, P; 2010; Ruppert, E., et al. 2004).

El sistema digestivo de los Culícidos se divide en tres regiones (figura 5): el intestino anterior, que interviene en la digestión, trituración y en el transporte del alimento; se subdivide en faringe, esófago y un área para reserva de alimento denominada “crop”. El intestino medio donde hay producción de enzimas y absorción de los productos de la digestión; tiene dos áreas principales: el ventrículo tubular y los divertículos laterales llamados “ceca”. Las células del intestino medio poseen microvellosidades que cubren la superficie interna. El intestino posterior, lugar donde ocurre la absorción de sales y agua y posteriormente la formación heces. El intestino está recubierto de una capa de células de gran espesor, llamada epitelio intestinal, que descansa sobre una membrana basal, rodeada por una capa muscular y se caracteriza por tener la función de secretar una membrana permeable conocida como membrana peritrófica, que protege a las paredes internas del intestino medio del bolo alimenticio. La capa más externa del intestino medio corresponde a un revestimiento cuticular que solo está presente en el intestino anterior y en el posterior, el cual funciona como una barrera física de protección contra patógenos. (Gullan, P. & Cranston, P; 2010; Ruppert, E., et al. 2004).

Las glándulas salivales son órganos que también forman parte del sistema digestivo, varían en tamaño y forma. Pueden ser tubos elongados o estructuras ramificadas más complejas. Existen varios tipos de células de secreción en las glándulas salivales y la secreción generada por ellas es transportada y vertida en la parte ventral de la cavidad preoral (Gullan, P. & Cranston, P; 2010; Ruppert, E., et al. 2004).

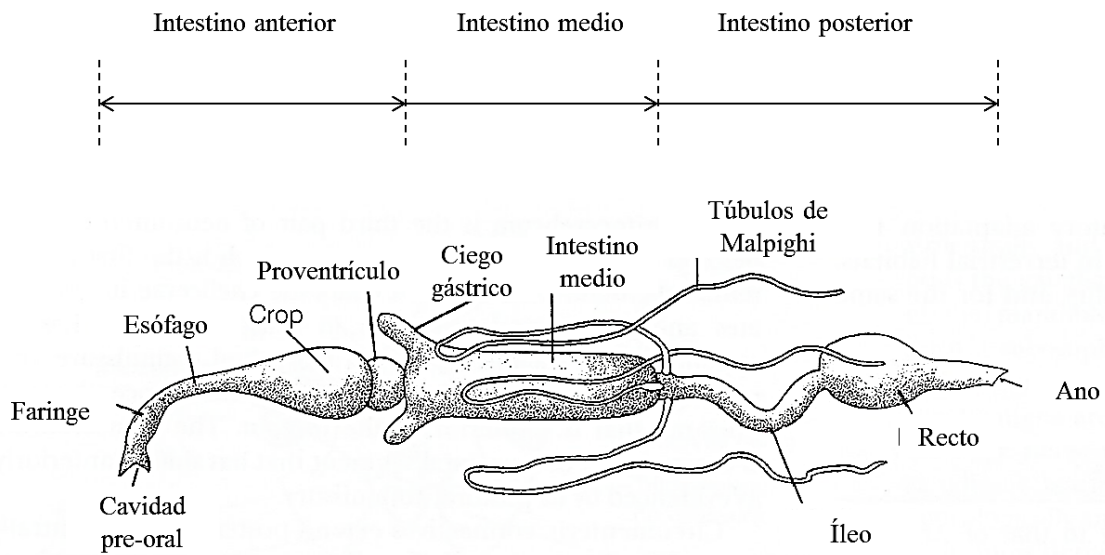


Figura 5. Sistema digestivo de los Culícidos. Tomada y modificada de Ruppert, E., et al. 2004.

La localización del alimento y su acción dependen del estado fisiológico del individuo, así como los factores sensitivos necesarios para sentirse atraídos por el alimento. En la inanición, los insectos son más sensibles a los olores y sabores y por ende son capaces de encontrar su alimento. En algunos insectos, mientras la hembra lleva los huevecillos no se siente atraída por el consumo de alimento. Por otra parte, no es necesaria la ingesta de comida en algunas etapas del desarrollo de los dípteros, por ejemplo, en el huevo (embrión) y la pupa, así mismo en la diapausa, la cual se caracteriza por ser un estado de baja actividad metabólica (Gillott, C. 2005.)

La ingesta de alimento en todos los artrópodos, no es un proceso que se lleve a cabo de forma aislada de los demás sistemas, es una acción coordinada por el sistema digestivo y el sistema nervioso, como resultado de la inervación del sistema nervioso central y el sistema nervioso estomatogástrico sobre los apéndices bucales y el intestino, encargándose de iniciar el proceso de absorción, trituración y almacenaje de nutrientes (Verlinden,H., et al. 2014).

1.3 Sistema nervioso central en insectos.

El sistema nervioso de los insectos, se caracteriza por ser un sistema simple y formado por ganglios únicos o fusionados, interconectados a través de nervios sensoriales o motores. De acuerdo con su estructura y función el sistema nervioso se divide en sistema nervioso central y sistema nervioso periférico. El sistema nervioso central (figura 6), está formado por el cerebro y el cordón nervioso ventral; se sitúa en la parte dorsal de la cabeza y es el resultado de la fusión de seis ganglios, en él se distinguen tres regiones: el protocerebro, que es la región posterior del cerebro, y es el primer par de ganglios fusionados, en él se controlan aspectos de la visión del insecto; el deutocerebro, es el segundo par de ganglios, donde se localiza el centro de integración de las señales captadas por las antenas; y el tritocerebro que se localiza cerca del intestino anterior e integra los estímulos sensoriales del protocerebro y deutocerebro. El cordón nervioso ventral está constituido por pares de ganglios segmentados, que se encuentran a lo largo de toda la línea media ventral del tórax y el abdomen, los ganglios están vinculados por un nervio corto situado en la parte media, llamado comisura transversal (Meyer, J., 2006; Ruppert, E., et al. 2004).

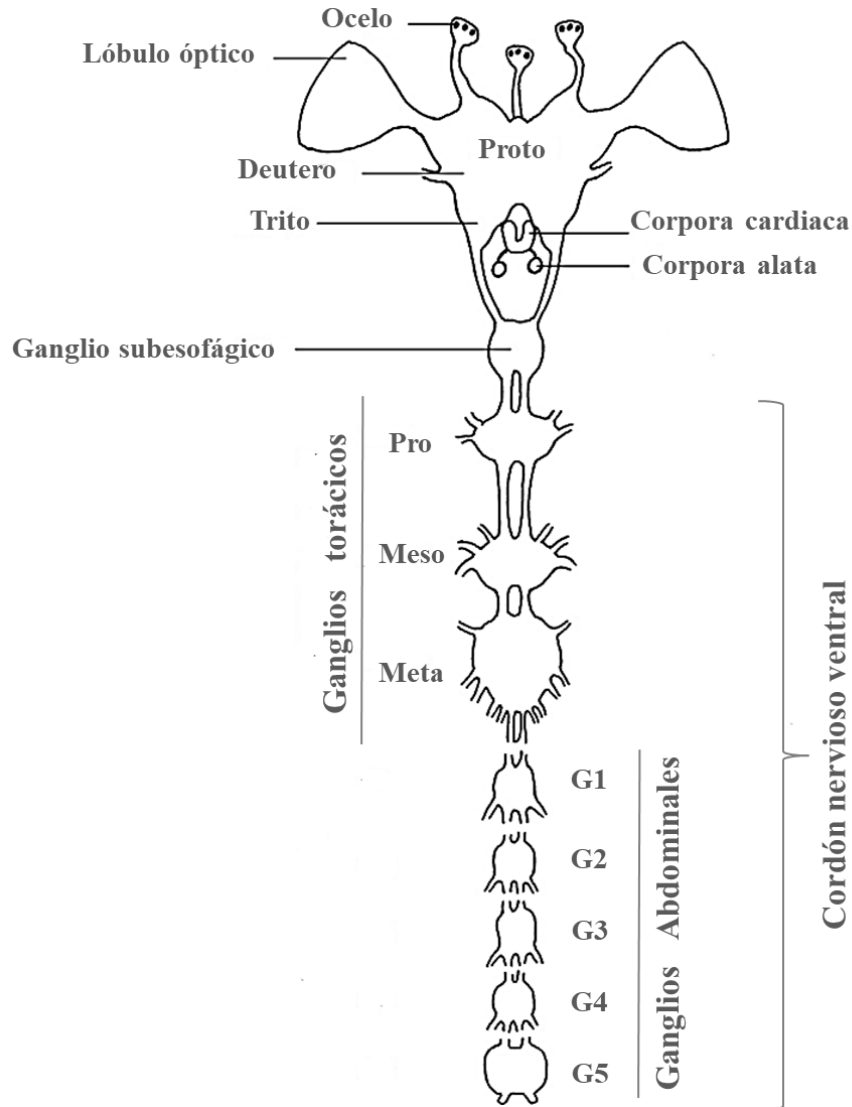


Figura 6. Sistema nervioso central en insectos. Se observan cada una de las partes que lo forman, comenzando por la parte anterior, donde se localiza el cerebro (protocerebro, deutocerebro y tritocerebro) y dos pares de las principales glándulas que forman parte del sistema endócrino. Posteriormente se localiza el cordón nervioso ventral, dividido en ganglios que se encuentran en la zona del tórax y por último los ganglios abdominales (G1:G5).

El sistema nervioso periférico (SNP) está constituido por nervios segmentales que conectan a los órganos sensoriales con el sistema nervioso central y los nervios que forman parte del SNP son formados por los axones de neuronas sensoriales y motoras. Las interneuronas son las responsables de mediar interacciones entre neuronas sensoriales y motoras y están restringidas en el sistema nervioso central. Existe otro sistema que ayuda al sistema nervioso somático a mediar

interacciones del ambiente exterior, el cual es el sistema nervioso estomatogástrico y está formado por una asociación de ganglios y nervios que inervan órganos viscerales, además de estar conectado con el cerebro y el sistema endócrino. La función del sistema estomatogástrico es regular la absorción y el transporte de alimentos en los órganos viscerales. (Meyer, J., 2006; Ruppert, E., et al. 2004; Verlinden, H., et al. 2014).

Actividades fisiológicas como la homeostasis, el comportamiento, la coordinación del desarrollo, la modulación neuronal, la actividad de vuelo en los Culícidos, entre otras, son procesos regulados, importantemente por neuropéptidos, entre otras moléculas y son producidos en células neurosecretoras dentro del sistema nervioso y que forman parte del sistema neuroendocrino (Nässel, D. 2002).

1.4 Sistema neurosecretor en insectos.

Las células, en un organismo multicelular, se logran comunicar a través de mecanismos de señalización, los cuales pueden ser intercelulares o señales que son liberadas sistémicamente en el espacio extracelular, difundiéndose a grandes distancias y a su vez afectando objetivos muy alejados del origen de la señal. En todos los organismos donde hay un sistema nervioso, existe una comunicación con un sistema neurosecretor o endocrino. En una comunicación endocrina la señal viaja y llega a células lejanas, un ejemplo son las neurohormonas, las cuales se producen dentro de células neurosecretoras del sistema nervioso central y son secretadas fuera de su sitio de síntesis para viajar a través del hemocele, en el caso de los insectos, hasta llegar a su célula blanco. En la célula blanco la señal será reconocida por receptores, generando una cascada de señalización intracelular (Alberts, B., et al. 2008; Hertenstein, V. 2006).

El sistema neurosecretor en los insectos (figura 7), se constituye por varias asociaciones de células neurosecretoras (CNSs), ubicadas en el cerebro y el cordón nervioso ventral. Además, de la presencia de glándulas endócrinas periféricas de gran importancia, donde se encuentra otro grupo de CNS y asimismo por las cuales atraviesan los axones de las CNS provenientes del cerebro (Hertenstein, V. 2006).

1. **Cerebro.** En este órgano se distinguen cinco zonas formadas por grupos de CNS: Las *CNS anteriores*, las cuales inervan hasta y a partir del tercer ganglio abdominal. Las *CNS mediales*, de las cuales sus axones llegan a órganos endocrinos, torácicos, órganos neurohemales y a los ganglios. Las *CNS intermediales o intercerebrales (PI)*, que constituyen la tercer zona y grupo de células que inervan desde las glándulas endocrinas y a partir del octavo ganglio abdominal. Las *CNS laterales (PL)*, que se localizan cerca del borde posterolateral del Protocerebro. El último grupo está formado por las *CNS ventrales* y el destino de sus axones es aún desconocido. (Clements, A. 1992; Hertenstein, V. 2006).

Los principales y abundantes grupos de *CNS* en el cerebro, están formados por las células neurosecretoras *PI* y las *PL*. Este par de *CNS* secretan una gran variedad de péptidos, los cuales actúan como reguladores de procesos fisiológicos. Entre los péptidos que se producen en las *PI* y *PL* están los péptidos similares a la insulina, péptidos similares a las *FMRFamidas*, la hormona diurética, la hormona dispersante de pigmento, *alatostatina*, *miododulina*, *corazonina*, entre otros (Nassel, D. 2002).

2. **Corpora Cardiaca (CC).** Está formada por un par de glándulas, situadas en la parte frontal del tórax. Están conectadas al cerebro y a otro órgano endocrino llamado *Corpora Allata (CA)*. Las células que forman a la *CC*, son células neurosecretoras homólogas a las células que se encuentran en el cerebro. En *Culícidos* como *Aedes aegypti*, cada *CC* está formada por seis células

neurosecretoras. Los axones de las células de la CC pasan por la CA y se mezclan, lo que hace más difícil localizar hasta dónde llegan los axones de las células neurosecretoras intrínsecas. La CC produce sus propias neurohormonas como las adipocinéticas, factores glucémicos, factores de aceleración cardíaca y el factor inductor de melanina. Las hormonas adipocinéticas (por sus siglas en inglés *AKH*, *adipokinetic hormone*), es el principal neuropéptido producido, ya que es de gran importancia, porque son reguladores del metabolismo y ayudan a generar energía para la actividad de vuelo en Culícidos. (Clements, A., 1992.; Gullan, P., & Cranston, P., 2010; Hertenstein, V. 2006).

3. ***Corpora Allata (CA)***. Está formada por otro par de glándulas derivadas del epitelio. Es pequeña y en algunos insectos está fusionada para formar una sola glándula. Se localiza debajo de la CC, cerca del intestino anterior y su función es secretar la hormona juvenil la cual regula procesos como el crecimiento larvario, la metamorfosis, la ovogénesis y la reproducción (Clements, A., 1992). La hormona juvenil es un derivado de ácidos grasos y se ha identificado que su liberación de la CA puede ser inhibida por la allatostatina (Veelaert D., et al. 1998).
4. ***Glándula protorácica (GPT)***. En la mayoría de los insectos, está situada en los segmentos protorácicos. En los dípteros, son células glandulares de gran tamaño formando dos grupos bilaterales. En la GPT se produce el precursor de la principal hormona de muda 20-hidroxiecdisona. La función de la ecdisona es regular procesos en el desarrollo, como la transición de larva a pupa y la fase de metamorfosis (Veelaert D., et al. 1998).

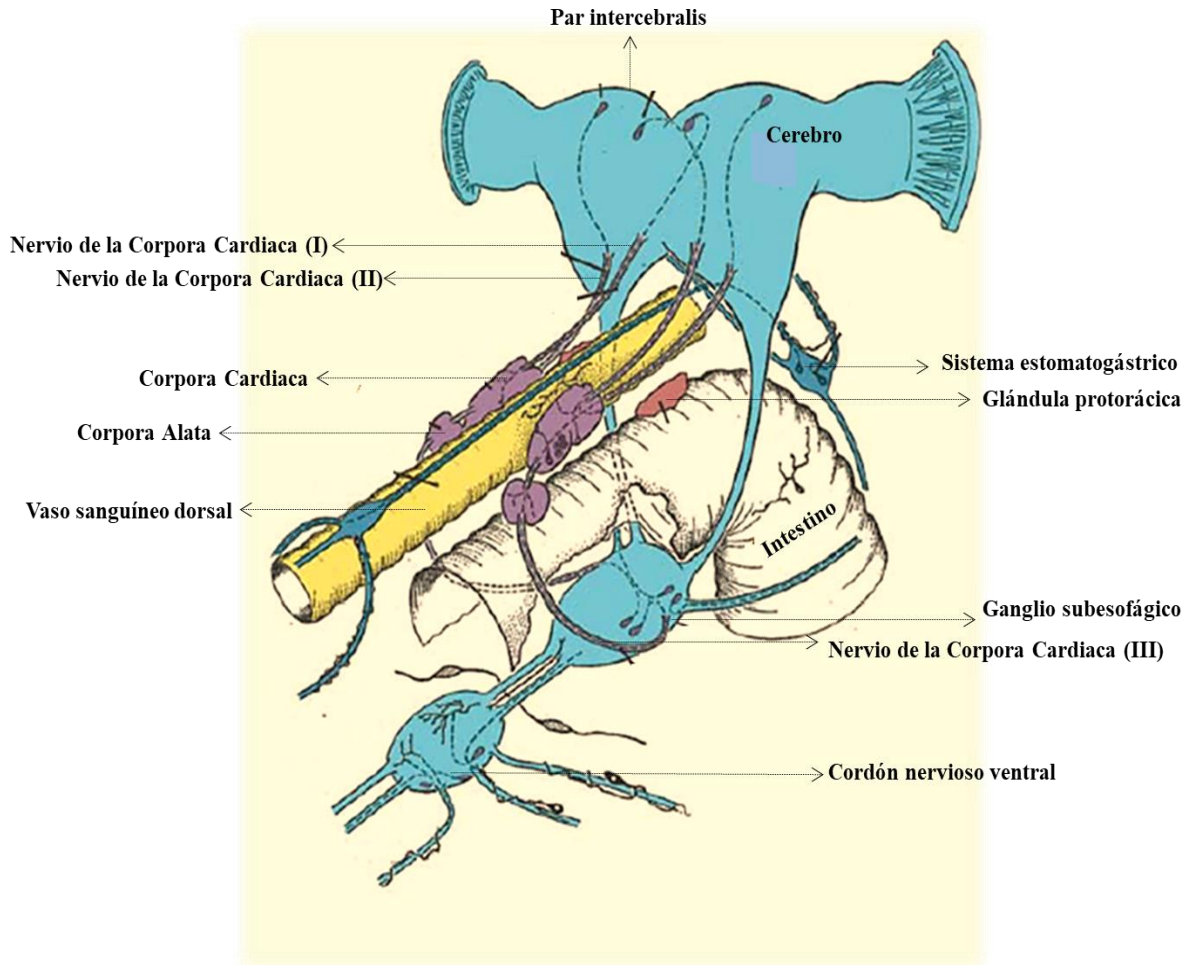


Figura 7. Sistema endócrino o neurosecretor en insectos. En la imagen se observa la ubicación espacial de todos los elementos del sistema neurosecretor, principalmente, el cerebro y las dos principales glándulas periféricas: la Corpora Cardiacia y la Corpora Alata. Imagen tomada y modificada de Hartenstein, V. 2006.

Como se ha mencionado, el sistema neurosecretor en insectos es el encargado de sintetizar una variedad de neuropéptidos, que actúan como reguladores para mantener la homeostasis en equilibrio. Con base a la información de la revisión de Altstein, M. en el 2010, en los genomas de especies como *Drosophila melanogaster*, *Anopheles gambiae*, *Aedes aegypti*, *Bombyx mori* y *Apis mellifera*, se conoce que hay en cada especie, alrededor de 30 a 40 genes que codifican para precursores de neuropéptidos y un poco más que codifican para receptores acoplados a proteína G (Altstein, M., & Nässel, D., 2010).

Una amplia gama de neuropéptidos se han identificado y aislado por ensayos clásicos de actividad biológica, por lo que han recibido nombres que sólo reflejan una sola acción o su función clásica. La tabla 1 muestra diferentes neuropéptidos y las funciones reportadas.

Tabla 1. Neuropéptidos y sus funciones

Neuropéptido	Función clásica
Allatostatinas y allatotropina	Regulan e inducen la producción de la hormona juvenil (Gullan, P., & Cranston, P., 2010).
Bursicona	Regulación de la cutícula y el proceso de muda. (Gullan, P., & Cranston, P., 2010)
Péptido cardioactivo de crustáceos (CCAP)	Actúa en interneuronas y neuronas motoras para producir contracciones musculares involucradas en el comportamiento durante la ecdisis así como en el ritmo cardiaco (Gäde, G., & Hoffmann, K. 2005.; Nässel, D., 2002).
Hormona de la activación de pre-ecdisis (PETH)	Estimula el comportamiento pre-ecdisis (Gullan, P., & Cranston, P., 2010)
Hormona de la ecdisis (ETH)	Inicia los eventos del proceso de ecdisis (Gullan, P., & Cranston, P., 2010)
Hormona de eclosión (EH)	Regula eventos de la ecdisis (Gullan, P., & Cranston, P., 2010)
Hormona prototorácica	Induce la liberación de ecdisteroides (Gullan, P., & Cranston, P., 2010)
Hormonas adipocinéticas (AKH's)	Involucrada en la movilización de lípidos y carbohidratos como la trehalosa, para abastecer de fuentes de energía a los músculos alares para el vuelo (Gäde, G. 1990).

Hormona hiperglucémica / hipotrealocémica	Liberación de carbohidratos del cuerpo graso.
Hormona hipoglucémica / hipotrealocémica	Absorción de carbohidratos
Péptido antidiurético (ADP)	Suprime la excreción de agua (Gullan, P., & Cranston, P., 2010)
Hormona diurética	Balance de agua e iones (Altstein, M., & Nässel, D., 2010).
Corazonina	Involucrada en el proceso de muda y en la pigmentación oscura. (Altstein, M., & Nässel, D., 2010).
Leucoquininas y miosupresionas	Involucradas en procesos miotrópicos. (Gullan, P., & Cranston, P., 2010).
Proctolina	Contracciones intestinales, perístasis. (Gullan, P., & Cranston, P., 2010).
Péptidos parecidos a la insulina (ILP's)	Involucrados en el crecimiento, metabolismo y supresión de la respuesta inmune (Altstein, M., & Nässel, D., 2010.; Pietri, J. et al., 2015)
FMRFamidas	Modulación del sistema nervioso central (Nässel, D., 2002).
SIFamidas	Involucrados en la reproducción (Gullan, P., & Cranston, P., 2010).

Tabla tomada y modificada de Hernández, G. 2017.

En fecha reciente se ha demostrado que los neuropéptidos son capaces de regular más de un proceso fisiológico. Por lo anterior, las investigaciones recientes para el control entomológico se han centrado en los neuropéptidos como moléculas blanco, así como de sus receptores para poder desarrollar insecticidas de nueva generación.

1.4.1 Receptores acoplados a proteína G y su función

Los receptores acoplados a proteína G (por sus siglas en inglés: GPCRs, G protein-coupled receptors) forman una de las familias más extensas de proteínas de membrana. Guzmán y García en su revisión de *“Receptores acoplados a proteínas G y sus múltiples facetas”* del 2018, hacen referencia a los GPCRs como: “sensores del medio externo (luz, olores, sabores) y del interno (iones, hormonas, neurotransmisores, factores de crecimiento). Participan en el mantenimiento de la homeostasis así como en la génesis y desarrollo de diversas enfermedades. Además son el blanco del 20-30% de los fármacos de uso cotidiano” (Guzmán, A. & García, J. 2018). Sin embargo, los GPCR'S se han estudiado mayoritariamente en vertebrados o específicamente en mamíferos. A pesar de esto, hay estudios que demuestran que neuropéptidos y aminas biogénicas en insectos, controlan funciones en la reproducción, el metabolismo y el comportamiento, señalizando a través de GPCRs (Verlinden, H. et al. 2014).

Conviene subrayar que, los GPCRs se han vuelto un blanco muy atractivo en insectos para la elaboración de productos novedosos para el control entomológico. La inhibición o sobre activación de los GPCRs pueden alterar vías de transducción de señales vitales que conduzcan a la muerte del insecto. (Verlinden, H. et al. 2014).

Los receptores acoplados a proteína G (figura 8), tienen una estructura conservada y uniforme. En su estructura presentan siete regiones α -hélice transmembrana y las cuales se conectan mediante bucles alternos intracelulares (ICL1, ICL2 e ICL3) y extracelulares (ECL1, ECL2 y ECL3), el extremo amino terminal ubicado en el lado extracelular y el carboxilo terminal en el lado intracelular. Los bucles ECL pueden poseer sitios de glicosilación y junto con las regiones transmembrana formar un sitio de unión a ligando hacia el espacio extracelular. El extremo carboxilo terminal y las ICL en general, presentan sitios de fosforilación así como de unión a la proteína G y otras efectoras (Guzmán, A. & García, J. 2018; Verlinden, H. et al. 2014).

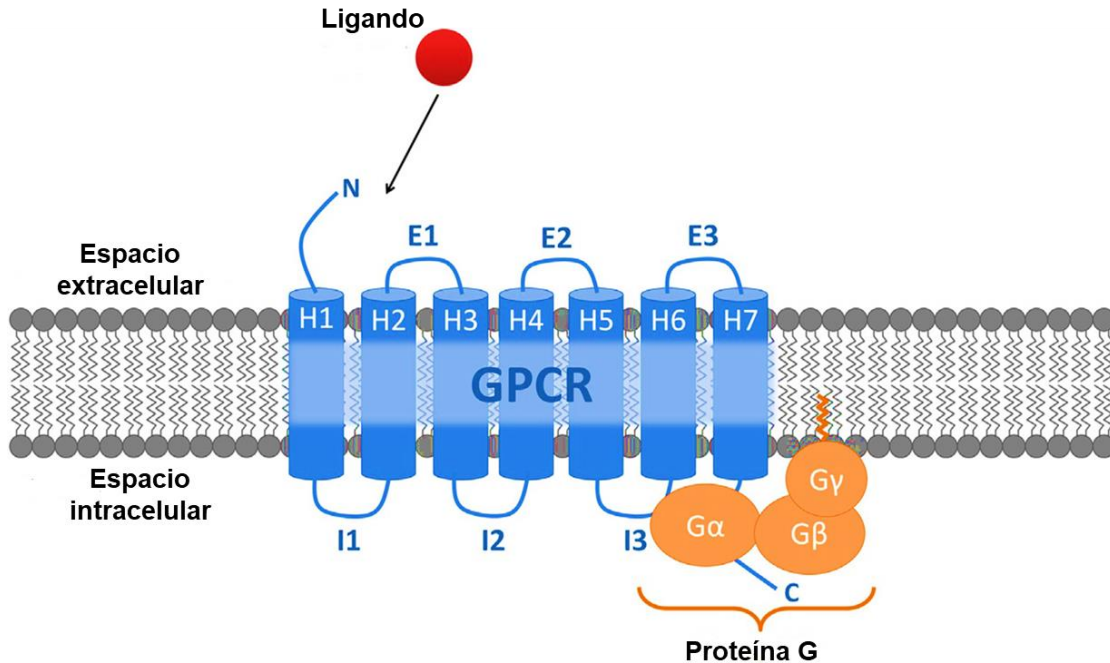


Figura 8. Estructura clásica de un receptor acoplado a proteína G (GPCR). En la figura se muestran las siete cadenas α -hélice transmembrana (H1-H7), los bucles externos (E1-E3) y los bucles internos (I1-I3) así como el extremo amino terminal y el extremo carboxilo terminal donde se une la proteína G, la cual está formada por sus tres subunidades ($G\alpha$, $G\beta$ y $G\gamma$). Al recibir un estímulo por un ligando, se activa el GPCR, generando la disociación de la proteína G en $G\alpha$ y $G\beta\gamma$, las cuales activan a sus respectivas moléculas efectoras, entre ellas la adenilato ciclasa y la fosfolipasa-C. Imagen tomada y modificada de Verlinden, H. et al. 2014.

De acuerdo con Fredriksson, R. et al. 2003, en los metazoos los GPCRs se dividen en cinco grupos principales, con base en su estructura proteica y las propiedades de su ligando. El grupo más extenso y que forma la “familia A” son los llamados “GPCRs relacionados a rodopsina”. La “Familia B” conformada por “GPCRs relacionados a secretina”. Tercer grupo, la “Familia C” “GPCRs metabotrópicos relacionados a glutamato”. El cuarto grupo formado por “GPCRs del desarrollo”, activados por ligandos relacionados a Wnt y a hedgehog y por último un grupo misceláneo atípico de GPCRs (Fredriksson, R. et al. 2003).

Con respecto a los neuropéptidos de insectos, varios de ellos señalizan a través de GPCRs, como la hormona diurética y el factor dispersante de pigmento, los cuales son reconocidos por GPCRs relacionados a secretina, mientras que la mayoría de los neuropéptidos interactúan con GPCRs que pertenecen a la

“Familia A”, los relacionados a rodopsina. Sin embargo hay otros neuropéptidos, cómo la hormona de eclosión (EH) y los péptidos parecidos a la insulina (ILPs) que señalizan a través de receptores tirosina-cinasa.

De acuerdo con Nassel, D. en el 2002, el número de neuropéptidos en insectos es numeroso, tanto que pueden formar 23 familias, a la vez, que presentan múltiples isoformas y las cuales su función podría ser redundante. Caers, J. et al. 2012, subraya que desde veinte años atrás se había logrado caracterizar el primer receptor del neuropéptido en *Drosophila*: el receptor de taquikinina. No obstante, la investigación quedó detenida, hasta que en el año 2000 se publicó el genoma de *Drosophila* y se retomó. También menciona que, gracias a los genomas disponibles de otras especies de insectos, es posible extrapolar información y tratar de entender el funcionamiento de vías de señalización. A pesar de todas estas herramientas, la información sigue siendo escasa o casi nula acerca del funcionamiento de los receptores de neuropéptidos en insectos, por lo que probablemente, existe una enorme cantidad de receptores que pueden ser caracterizados (Caers, J. et al. 2012).

Por mencionar ejemplos de funciones y descripciones que se han realizado de receptores de neuropéptidos en insectos, encontramos que en *Drosophila*, se ha localizado el receptor para el péptido sexual (SPR), involucrado en la reproducción (Yapici, N. et al. 2008). El receptor de ILPs (péptidos relacionados a la insulina) se ha reportado en los ovarios de hembras *Aedes aegypti* (Riehle, M. & Brown, N. 1999). En lepidópteros como *Bombix mori*, se ha caracterizado el receptor de allatotropina, del cual proponen que es capaz de regular la producción y liberación de sNPF (Yamanaka, N. et al. 2008). También ya ha sido caracterizado en *M. sexta*, *T. castaneum*, y *A. aegypti* (Nouzova, M. et al. 2012). Así como el receptor de la hormona diurética, ha sido clonado en *A. aegypti* y *B. morix* y del cual se ha realizado una predicción en *A. gambiae* (Ha, S. et al. 2000). Y para finalizar, el receptor de la hormona adipocinética (AKHR), se ha reportado y clonado en *D.*

melanogaster, *B. mori* y *A. gambiae*, involucrado en la regulación del metabolismo (Park, Y. et al, 2002).

1.4.2 Hormonas adipocinéticas y su receptor acoplado a proteína G

La familia de las hormonas adipocinéticas (AKHs), es una de las más estudiadas y extensas de neuropéptidos en insectos. La alta demanda de energía durante las contracciones de los músculos, que ejercen los insectos durante el vuelo, se provee de moléculas energéticas, las cuales provienen de la oxidación de carbohidratos, lípidos y de aminoácidos como la prolina. Las AKHs son las hormonas responsables de aumentar la movilización de trehalosa y diacilglicerol en el cuerpo graso, para abastecer de esa energía requerida en actividades que impliquen un desgaste energético. Por lo tanto, las AKHs son denominadas por sus funciones como hormonas hipertrealosémicas, hipotrealosémicas o hiperlipémicas. En cuanto a su estructura, estrictamente son péptidos de una longitud de 8 a 10 aminoácidos y los cuales tienen el extremo amino terminal bloqueado por un piroglutamato y un extremo carboxilo-amida terminal. La estructura genuina de AKH, está caracterizada por presentar una fenilalanina (F) en la posición 4 y triptófano (W) en la posición 8 y una glicina (G) en la posición 9 (Bogerd, J. et al. 1995). Por otra parte, las AKHs comparten una significativa similitud con la hormona concentradora de pigmento rojo (RPCHs) de crustáceos, por lo que se agrupan en la familia AKH/RPCHs. (Gäde, G. & Auerswald, L. 2003; Van der Horst, D. 2003).

Las AKHs corresponden a una de las familias de neuropéptidos más caracterizadas con aproximadamente 40 isoformas identificadas. Sin embargo todavía no está claro si todas las isoformas tienen actividad redundante. En cuanto a la estructura del gen de AKH, presenta un péptido señal e intrones entre la secuencia codificante para AKH y una secuencia que codifica para un péptido llamado péptido relacionado al precursor de AKH (Figura 9) (Hekimi, S. & O'shea, M. 1989; Kaufmann, C., et al. 2009).



Figura 9. Estructura del gel de AKH-I de *Anopheles gambiae*. En la figura se observa la organización de las partes que corresponden al gen de AKH-I. Tomada y modificada de Kaufmann, C., et al. 2009.

Por otra parte, las AKHs provienen de un largo precursor proteico llamado prepropéptido, en el cual pueden estar incluidos otros péptidos como APRP. Las AKH pasan por una proteólisis realizada por endoproteasas, en sitios pares de aminoácidos como lisina y arginina. Posteriormente tienen modificaciones post-traduccionales, como el piroglutamato del amino terminal y la amidación del carboxilo terminal. En *Schistocerca gregaria* las células neurosecretoras expresan dos precursores generados por dos transcritos (AKH I y AKH II), los cuales son traducidos en dos pre-prohormonas. Subsecuentemente el péptido señal y APRP son retirados, dejando únicamente el péptido correspondiente a AKH (Rayne, R., & O'shea, M. 1994).

Con relación a la función clásica reportada para las hormonas adipocinéticas, se han generado datos en *Periplaneta americana*, *Locusta migratori* y *Schistocerca gregaria* que permitieron construir un modelo de su mecanismo de acción. No obstante, la cascada de señalización y las moléculas participantes no se han podido dilucidar en su totalidad (Gäde, G. & Auerswald, L. 2003).

El desencadenamiento de la señalización para la movilización de trealosa, comienza por la unión de la AKH con su receptor acoplado a proteína G. A su vez, provoca la activación de PLC (Fosfolipasa C) y produciendo segundos mensajeros: el IP3 (Inositol trifosfato) y DAG (Diacilglicerol) (figura 10). IP3 se une específicamente a receptores en el RE (retículo endoplásmico) provocando la liberación de Ca²⁺ hacia el citosol. DAG en conjunto con el Ca²⁺ liberado activan PKC (Proteína Cinasa C). Se han reportado dos formas de PKC, una de ellas se

activa específicamente por fosforilación por la *cinasa-b* y consecuentemente estimula la activación de la *fosforilasa-a* y la producción de glucosa-1-fosfato (G-1-P). Otra PKC es activada específicamente por PLA2 (*fosfolipasa-A2*) resultando en la producción de ácidos grasos saturados libres, los cuales son necesarios para la síntesis de trehalosa (Gäde, G. and Auerswald, L., 2003).

Además de ejercer una actividad hipertrealosémica, la señalización por AKH también aumenta la producción de precursores lipídicos así como la movilización de prolina en el cuerpo graso. La transducción de señal ha sido estudiada en el escarabajo *Pyrota sinuata* y en la cual se propone que la unión de AKH endógena a su receptor estimula un cambio conformacional de la proteína G, la cual posteriormente activara la adenilato ciclasa, incrementando los niveles de cAMP. Este incremento logra activar la movilización de la triacilglicerol lipasa necesaria para iniciar con la β -oxidación y finalizar con la producción de prolina (Gäde, G. & Auerswald, L., 2003).

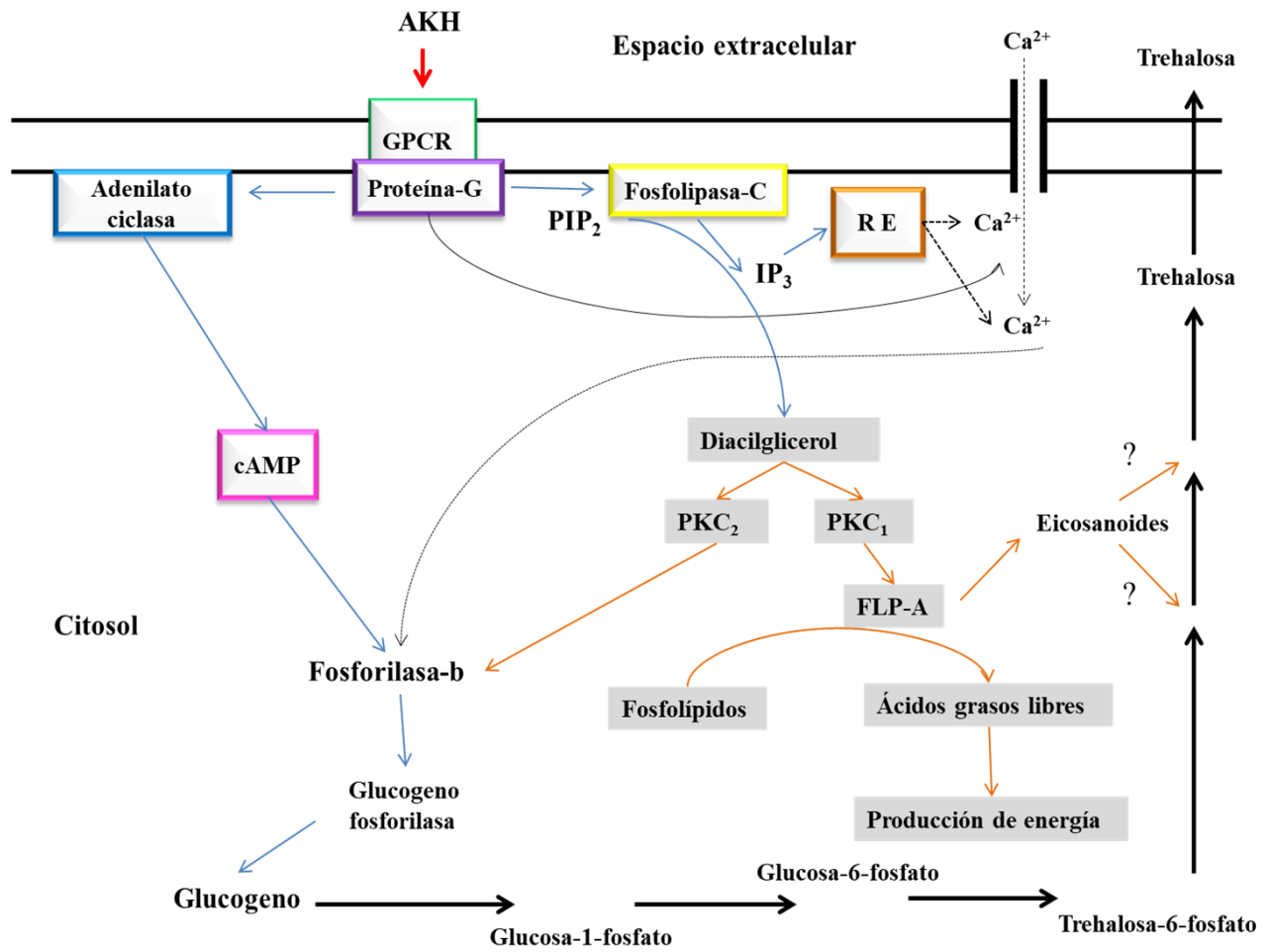


Figura 10. Traducción de señal por AKH para la función hipertrehalosémica. El esquema de la cascada de señalización efectuada por AKH, es propuesto por Gäde, G. & Auerswald, L., 2003. Las moléculas participantes se han reportado a través de estudios realizados en *Periplaneta americana*, *Locusta migratoria* y *Schistocerca gregaria*. PIP₂ corresponde a Fosfatidilinositol bifosfato; IP₃ (Inositol trifosfato); cAMP (Adenosin Monofosfato cíclico); PKC (Proteína Cinasa C) y FLP-A (Fosfolipasa-A). Tomada y modificada de Gäde, G. & Auerswald, L., 2003.

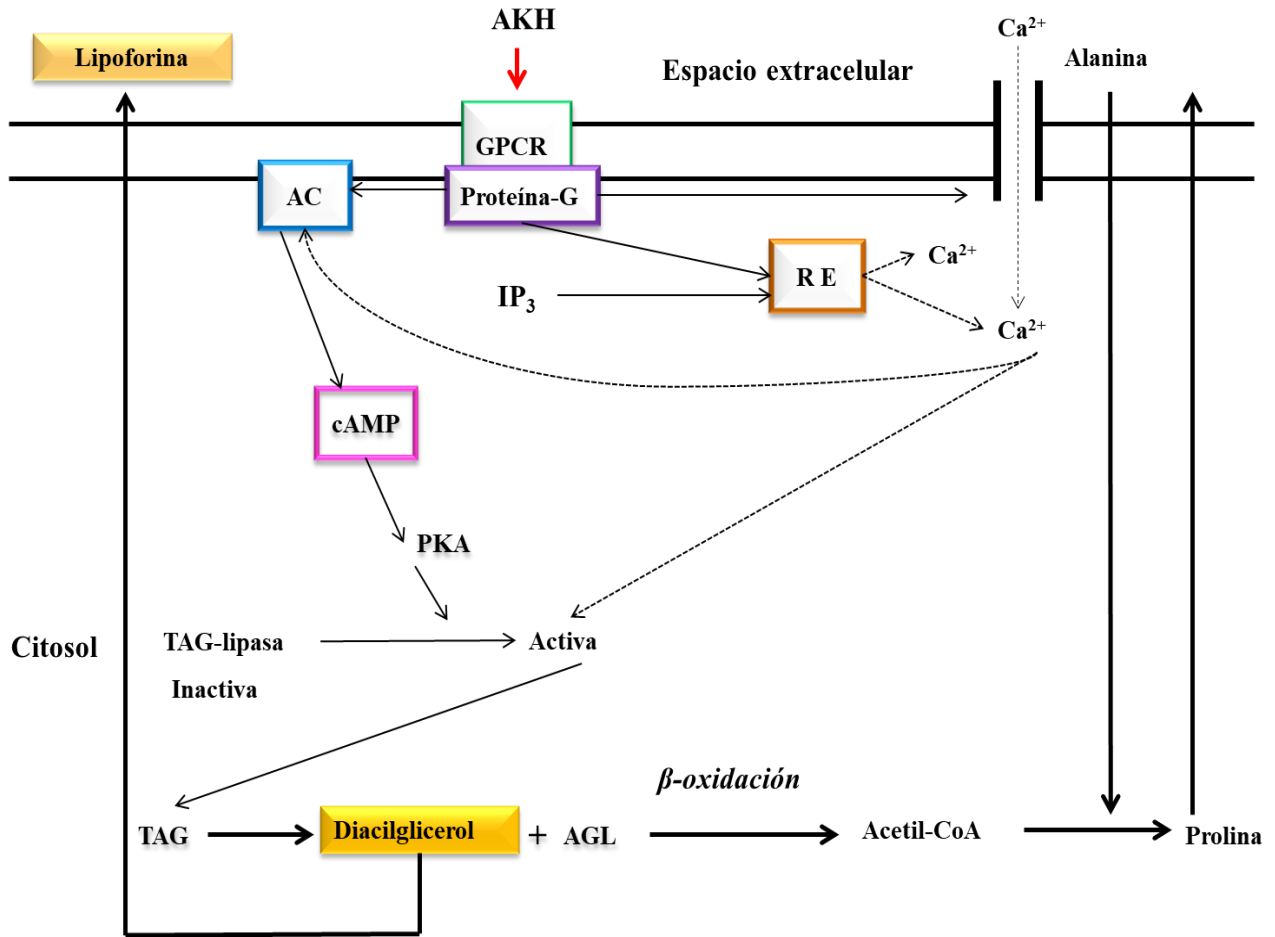


Figura 11. Transducción de señal para la actividad hiperlipémica de AKH. El modelo se construyó a partir de estudios realizados en *Locusta*, polillas y escarabajos. Abreviaturas: AC (Adenilato Ciclasa); GPCR (Receptor acoplado a Proteína G); RE (Reticulo Endoplásmico); cAMP (Adenosín Monofosfato cíclico); PKA (Proteína Cinasa A); IP₃ (Inositol Trifosfato); TAG (Triacilglicerol) y AGL (Ácidos Grasos Libres). Tomada y modificada de Gäde, G. & Auerswald, L., 2003.

El inicio de la transducción de señal generada por AKH, requiere de la activación de su receptor acoplado a proteína-G. El primer receptor de AKH (AKHR) fue identificado en *Manduca sexta* (Ziegler, R. et al. 1995) y posteriormente el receptor de *Drosophila* (Park, Y. et al. 2002). Así mismo, se ha identificado en *Periplaneta americana*, *Anopheles gambiae* (Caers, J. et al 2012), *Bombyx mori* (Shi, Y. et al. 2011), también a través del análisis predictivo de secuencias, se han identificado dos variantes de AKHR en *Aedes aegypti* (Kaufmann, C. et al. 2009).

La organización genómica de las regiones codificantes de los genes AKHRs comprende de 5 a 7 exones y de 4 a 6 intrones; por ejemplo en *Drosophila melanogaster* el gen de AKHR presenta 5 exones y 4 intrones, mientras que en *Anopheles gambiae* posee de 7 exones y 6 intrones (figura 12) (Shizhong, L., et al., 2016).

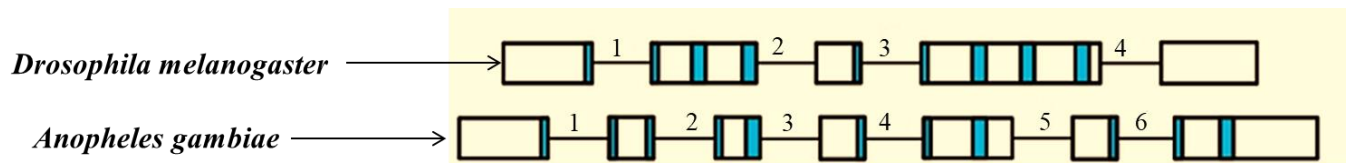


Figura 12. Estructura del gen AKHR. En la imagen se observa la estructura génica de AKHR de *Drosophila melanogaster* y *Anopheles gambiae*, los rectángulos corresponden a los exones y los números a los intrones mientras que las líneas paralelas azules representan a las regiones transmembranales del receptor. Tomada y modificada de Shizhong, L., et al., 2016.

Interesantemente, un estudio de genómica evolutiva, propone que la señalización por AKH/AKHR emergió en organismos Lophotrochozoa y está relacionada con la señalización realizada por los miembros de la super familia de receptores de la hormona liberadora de la gonadotropina (GnRH), en deuterostomados (figura 13). Por lo tanto, se propone una relación evolutiva entre los ligandos GnRH, AKH y ACP (Péptidos relacionados a AKH y Corazonina) (Li, S., et al., 2016). Los ACP son péptidos que recientemente se han identificado, sin embargo todavía no se conoce con exactitud su función, no obstante, se han identificado receptores para

estos péptidos y que parecen tener gran importancia a nivel evolutivo ya que se consideran estructuralmente intermediarios entre los neuropéptidos AKH, Corazonina (CRZ) y sus receptores. Al parecer el GPCR ancestral tuvo varios eventos de duplicación seguido de mutaciones ocasionadas por la presión de selección, lo que ocasionó la divergencia de cinco receptores: AKHR, ACPR, CRZR, CRZR/GnRHR y GnRHR (Li, S, et al., 2016).

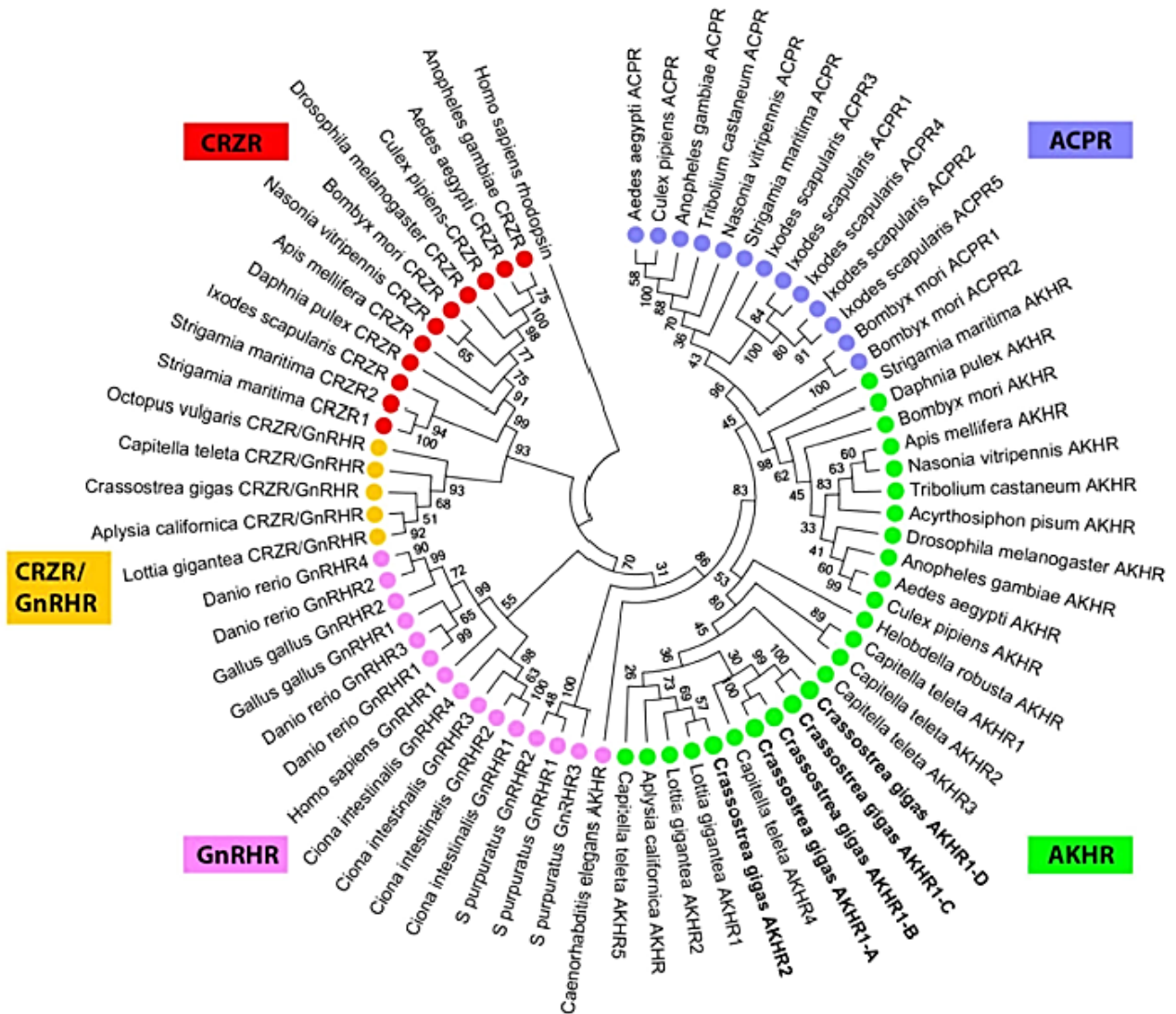


Figura 13. Análisis filogenético del receptor de AKH. En el árbol se observa la divergencia de los receptores AKHR (receptor de AKH), ACPR (receptor de ACP), CRZR (receptor de corazonina), GnRHR (receptor de la hormona liberadora de gonadotropina) y CRZR/GnRHR. Tomada de Li, S., et al., 2016.

Sumado a la identificación molecular de AKHR y a los análisis evolutivos, se ha mencionado que la señalización por AKH/AKHR no solamente está implicada en la locomoción sino también una gran variedad de procesos fisiológicos como la reproducción, el crecimiento larval, el comportamiento alimenticio, pero resulta importante su participación en la respuesta inmune. En las interacciones inmunoendocrinas que pudieran estar ocurriendo a través de AKH/AKHR en los procesos infecciosos, particularmente en mosquitos. De manera que se mencionaran características generales de la respuesta inmune en insectos.

1.5 Respuesta inmune en insectos.

La respuesta inmunitaria de los mosquitos está dividida en respuesta inmune celular y la respuesta inmune humoral (Figura 14), pero antes de activarse existen otras barreras que los protegen. Estructuralmente los mosquitos, al igual que todos los artrópodos poseen un exoesqueleto de quitina que evita que los órganos tengan contacto con el ambiente y una membrana peritrófica que impide y brinda protección al intestino medio de interacciones con organismos patógenos, estas estructuras construye una primera línea de defensa, y son las barreras físicas (Dimopoulos, G. 2003).

Cuando las barreras físicas son evadidas o atravesadas por patógenos da inicio la respuesta celular. Los mecanismos de defensa que la caracterizan son la fagocitosis, la encapsulación y la coagulación. Los hemocitos son las células que llevan a cabo la respuesta celular, y son análogos a los leucocitos en vertebrados. En *Anopheles albimanus* se han descrito tres tipos de hemocitos: prohemocitos, plasmacitos, granulocitos (Hernandez et al 1999). Cada población de hemocitos contribuye con una tarea o actividad diferente, el mecanismo de fagocitosis la llevan a cabo los plasmacitos, los granulocitos se caracterizan por tener una mayor producción de la proteína Fenoloxidasa (PO) y por último los prohemocitos son células progenitoras que darán lugar a hemocitos maduros (Hernández-

Martínez. et al. 2002).

La respuesta inmune innata en insectos es eficiente ya que su activación es rápida después de haber estado en contacto con un patógeno. Los insectos tienen y receptores que les permite reconocerlo propio de lo extraño. Los Pattern Recognition Receptors (PRRs, por sus siglas en inglés) y los Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPs, por sus siglas en inglés *Pathogen Associated Molecular Patterns*) son los responsables de la especificidad que existe en la respuesta inmune innata de insectos, ya que son capaces de reconocerse y unirse oligo-específicamente. Este reconocimiento puede desencadenar diversos eventos para eliminar al patógeno. Uno de ellos es la fagocitosis y otro importante es la activación indirecta de las vías de señalización inmunes que regulan la transcripción de péptidos antimicrobianos (AMP's, por sus siglas en inglés *Antimicrobial Peptides*) y genes efectores que eliminan a los patógenos (Dimopoulos, G. 2003.; Rolff, J., & Reynolds, S., 2009).

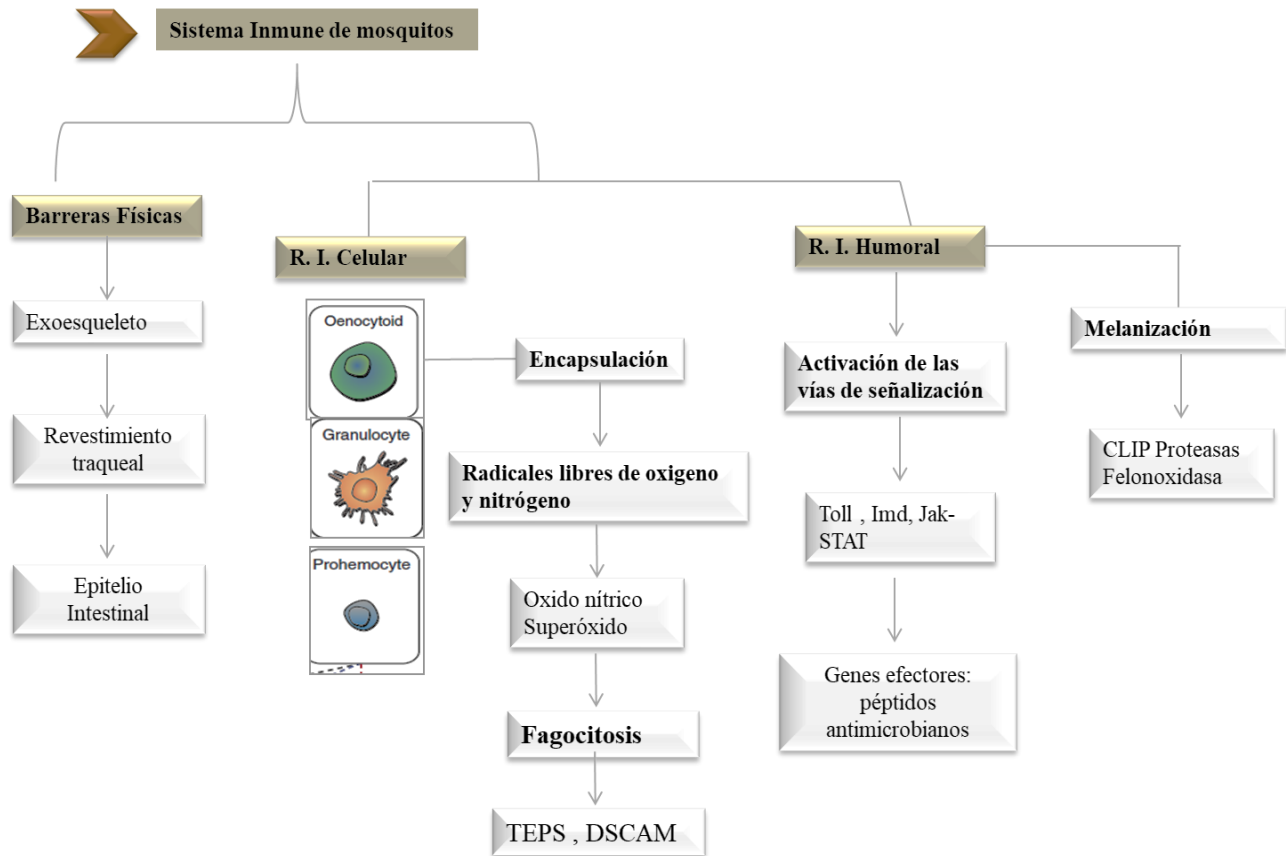


Figura 14. Mapa conceptual de la respuesta inmune en mosquitos.

2. ANTECEDENTES

La participación de AKH en la respuesta inmune se ha propuesto a partir de datos generados por Wiesner A. y colaboradores en 1997, al observar una actividad antibacteriana en la hemolinfa en larvas de *Galleria melonela*, a través de la inyección intrahemocelica de apoLp-111 y AKH (Wiesner, A. et al, 1997). Por otro lado, Goldsworthy y colaboradores en el 2012, demuestran que, mediante ensayos de actividad enzimática, AKH I y II de *Locusta migratoria* están involucradas en la activación de la cascada de la profenoloxidasas (Goldsworthy, G., et al, 2002). Es importante mencionar, que en la elaboración de estos experimentos fue necesario el estímulo con LPS (lipopolisacárido), para que

conjuntamente administrado con AKH, se observara un efecto sinérgico en la actividad de la enzima (figura 15).

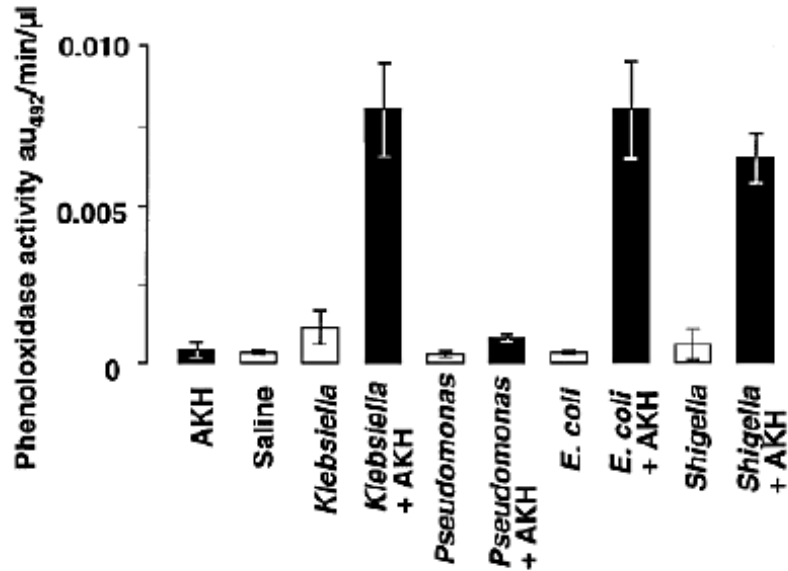


Figura 15. Gráfica de la actividad de la Fenoloxidasa en *Locusta migratoria*. En la gráfica derecha se muestra la actividad de la fenoloxidasa, obtenida mediante ensayos enzimáticos. El experimento se realizó inoculando adultos machos de *Locusta migratoria* con 100 μg de las diferentes preparaciones de LPS. El eje de las ordenadas representa la actividad enzimática 3 h después de la inoculación del LPS con (barras sombreadas) o sin (barras blancas) 20 pmol de Lom-AKH-I. Tomado de Goldsworthy, G., Opoku-Ware, K., & Mullen, L, 2002.

Recientemente, nuestro grupo se ha interesado en el estudio de la respuesta inmune de mosquitos *Anopheles albimanus* con un enfoque neuroinmunoendocrino. Los primeros resultados generados, han contribuido en el desarrollo del neuropeptidoma putativo en mosquitos hembra *Anopheles albimanus*, obteniendo 18 transcritos que potencialmente codifican para 44 biopéptidos producidos en el cerebro. Ensayos de expresión de transcritos de neuropeptidos, en cerebros infectados con *Plasmodium berghei*, involucran la sobreexpresión de AKH II y por lo cual existe la posibilidad de que pueda estar involucrada en la regulación de la respuesta inmune en *Anopheles albimanus* (Alvarado, A. et al. 2016) (figura 16).

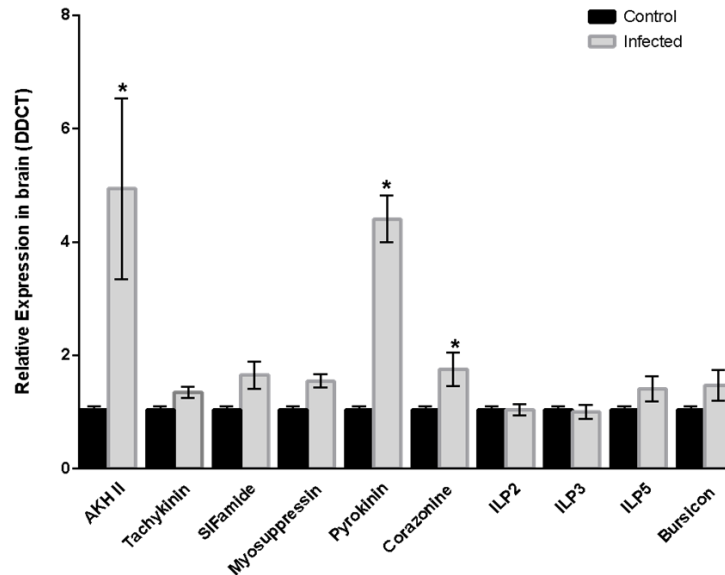


Figura 16. Expresión de neuropéptidos en cerebros de *Anopheles albimanus*. En la gráfica se observa la expresión de transcritos de neuropéptidos en mosquitos hembra, durante la infección con *Plasmodium berghei*. Tres transcritos correspondientes a AKH II, pirokinina y corazonina, se sobreexpresaron 24 horas post-infección. Tomada de Alvarado, A y colaboradores; 2016.

Aunado a estos resultados obtenidos, datos del efecto de las hormonas adipocinéticas I y II en la expresión de antimicrobianos como atacina y cecropina en intestino medio de mosquitos *Anopheles albimanus* se han analizado (figura 17). Sin embargo estos análisis no muestran diferencias estadísticamente significativas de estos PAMs, pero si inducen la expresión de transcritos. Estos datos generan mayor interés en el análisis de este tipo de hormonas y sus receptores. Incluir un reto inmune en nuestras investigaciones y buscar e identificar el receptor(es) putativo(s) para AKH II en el intestino medio permitirán ampliar el panorama de conocimiento y entender las funciones de AKH en un estado fisiológico comprometido.

Finalmente, Bill, M. y colaboradores en el 2016, midieron la expresión de transcritos del receptor de la hormona adipocinética en diferentes tejidos de la mosca de la carne *Sarcophaga crassipalpis*, y observaron su expresión en el intestino medio así como en otros órganos (figura 18), lo que demuestra que existen receptores para estas hormonas no solo en el SNC o en cuerpo graso, lo

que favorece las hipótesis que asocia a estas hormonas a funciones diversas en distintos contextos fisiológicos (Bill, M. et al.2016).

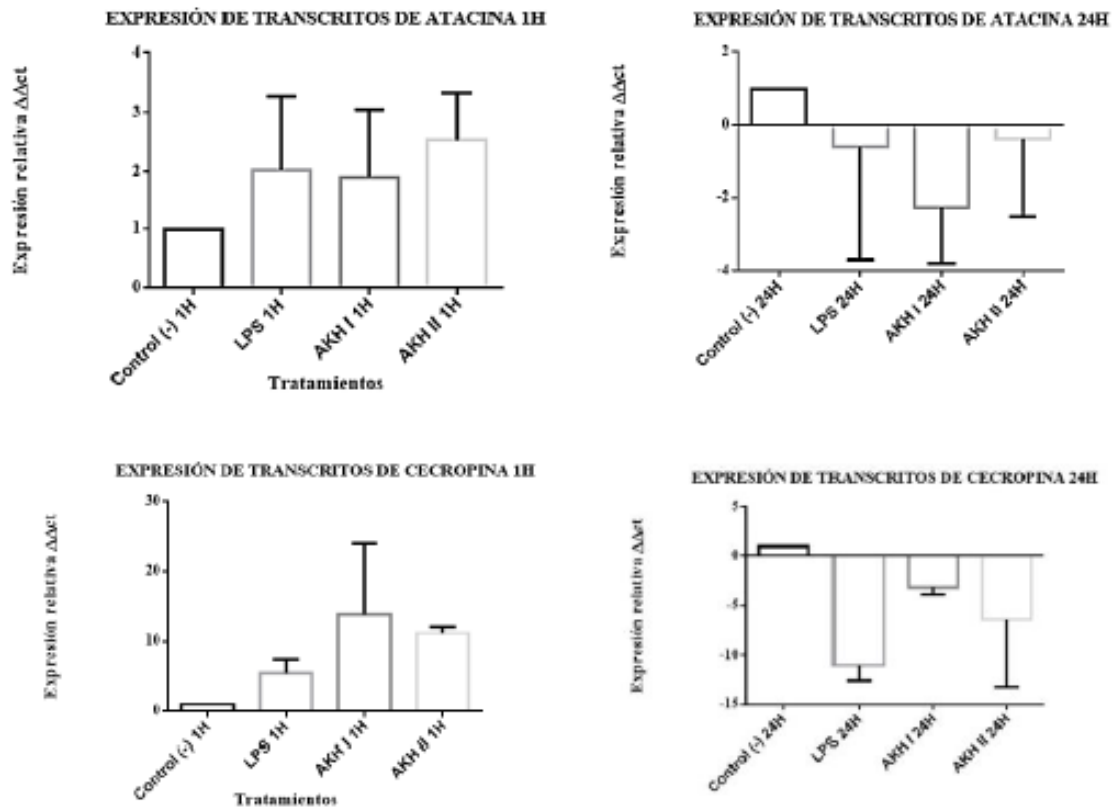


Figura 17. Expresión de péptidos antimicrobianos en intestino medio de *Anopheles albimanus*. En la figura se observan cuatro gráficas que corresponden a la expresión relativa de transcritos de atacina y cecropina, en cultivo *in vitro* de intestinos, incubados con AKH I, o AKH II, o un activador de la respuesta inmune (LPS) durante 1 y 24 horas.

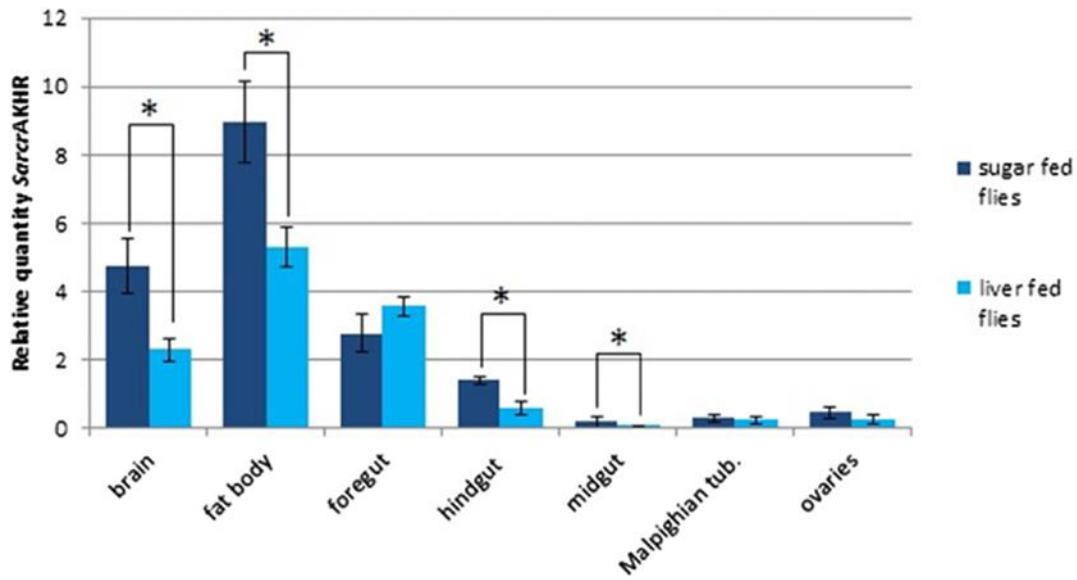


Figura 18. Distribución tisular de la expresión del receptor de AKH en *Sarcophaga crassipalpis*. Las moscas se alimentaron con extracto de hígado o azúcar y de las cuales se colectaron siete tejidos para la medición por PCR tiempo real de transcritos de AKHR. Los tejidos extraídos fueron: cerebro, cuerpo graso, intestino anterior, intestino posterior, intestino medio, túbulos de Malpighi y ovarios (Bil, M, et al. 2016).

3. JUSTIFICACIÓN

La investigación científica es crucial para conocer la fisiología de organismos vectores y posteriormente desarrollar nuevas estrategias que ayuden a controlar su población y la transmisión de enfermedades. Reyes, G. y Sánchez, R., en el Manual Técnico de Entomología para el Programa de Paludismo 2014, mencionan que: “La efectividad de las medidas de control no es estática debido a los cambios ecológicos, así como también al desarrollo de resistencia del vector a los insecticidas y del parásito a las drogas “. Por lo tanto, se deben diseñar y evaluar nuevas alternativas posibles para el control entomológico.

Entre las posibles alternativas, diferentes investigaciones se han enfocado en estudiar la fisiología del sistema neuroendocrino de organismos vectores, ya que moléculas como los neuropéptidos y sus receptores, son un blanco para el desarrollo de insecticidas para el control de plagas y vectores. Nuestro grupo de trabajo ha extendido sus estudios en inmunología de vectores como *Anopheles albimanus*, con investigaciones que logren generar conocimiento acerca de neuropéptidos y receptores capaces de regular positiva o negativamente la respuesta inmune del vector. Iniciamos con la identificación del neuropeptidoma de *Anopheles albimanus* y del cual han resultado datos interesantes como la sobre-expresión de AKH II en cerebros durante la infección con *Plasmodium berghei*. Posteriormente se analizó el efecto de AKH I y AKH II en intestino medio de *An. albimanus* sobre la expresión de antimicrobianos y como resultado decidimos enfocar el presente trabajo en la búsqueda, amplificación y análisis de AKHR en la etapa larval y adulta de *An. albimanus*.

4. HIPÓTESIS

El receptor de la hormona adipocinética se expresa durante el desarrollo larval y en intestino medio de *Anopheles albimanus*.

5. OBJETIVO GENERAL

Identificar *In silico* y validar experimentalmente, una secuencia hipotética para el receptor de la hormona adipocinética en *Anopheles albimanus*.

5.1 OBJETIVOS PARTICULARES

Realizar la búsqueda *In silico* y validar la presencia de una secuencia hipotética para el receptor de AKH, en intestino medio y abdomen de *Anopheles albimanus*.

Analizar la expresión del receptor hipotético de AKH durante el desarrollo larval de *Anopheles albimanus*.

Analizar la expresión relativa del receptor hipotético de AKH en la etapa larval 4 de *Anopheles albimanus*, después de un reto con *M. luteus* o *E. coli* o *Zymosan*.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Búsqueda y análisis *In silico* de una secuencia putativa de AKHR en el genoma de *Anopheles albimanus*.

Para la identificación de una secuencia putativa del receptor de AKH en *An. albimanus*, se utilizó como herramienta de búsqueda la base de datos *VectorBase* (<https://www.vectorbase.org/>) y la secuencia AGAP002156, la cual corresponde al receptor hipotético de la hormona adipocinéctica de *Anopheles gambiae*. Con La secuencia AGAP002156, se realizó un alineamiento tipo BlastN contra el genoma de *An. albimanus*, utilizando los parámetros “defoul” (Maximum e-value = 10). A partir de la secuencia 2156 se identificó la secuencia ortóloga en *An. albimanus*, con el ID AALB008204. Presentado un porcentaje de similitud del 82.20 % y una cobertura nucleotídica de 97.38. (En el apartado de resultados, la tabla 2, detalla la comparación y características de ambas secuencias).

El diseño de los oligonucleótidos se realizó sobre la secuencia completa 8204, los cuales se nombraron: **AKHRECEP-FW** 5'- GTC GTG TGA TGG CGT TCT TC -3' y **AKHRECEP-RV** 5'- GGT GAA CCT TCA AAG GCT GC -3', ambos con una longitud de 20 bases, una temperatura de fusión (Tm) de 62°C y un porcentaje de guanina y citosina (GC) de 55. El tamaño del fragmento/amplicon correspondía a 111 pares de bases (pb). Posteriormente, se estandarizaron las condiciones de amplificación por PCR punto final. Modificando concentraciones de cDNA molde, concentración de oligonucleótido y diferentes temperaturas de alineamiento.

6.1.1 Crianza de *Anopheles albimanus* y obtención de material biológico

Para realizar los experimentos, se utilizaron mosquitos hembra de *Anopheles albimanus*, cepa Tapachula, los cuales fueron criados en el insectario No. 1 del bioterio del Instituto Nacional de Salud Pública. Las condiciones establecidas para la crianza de las etapas larvales y mosquitos adultos fueron las siguientes: temperatura ambiental de 28°C, humedad relativa del 80% y fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad. Los mosquitos se alimentaron con solución de sacarosa al 8%.

6.1.2 Amplificación de AKHR por punto final en abdómenes e intestinos de *Anopheles albimanus*.

Para la amplificación del fragmento correspondiente a un segmento de AKHR hipotético (AALB008204), se formaron tres grupos de mosquitos hembra, el testigo, mosquitos alimentados con sacarosa al 8% y dos grupos en ayuno prolongado de 18 horas, con la finalidad de potenciar la expresión de AKHR hipotético (Figura 19).

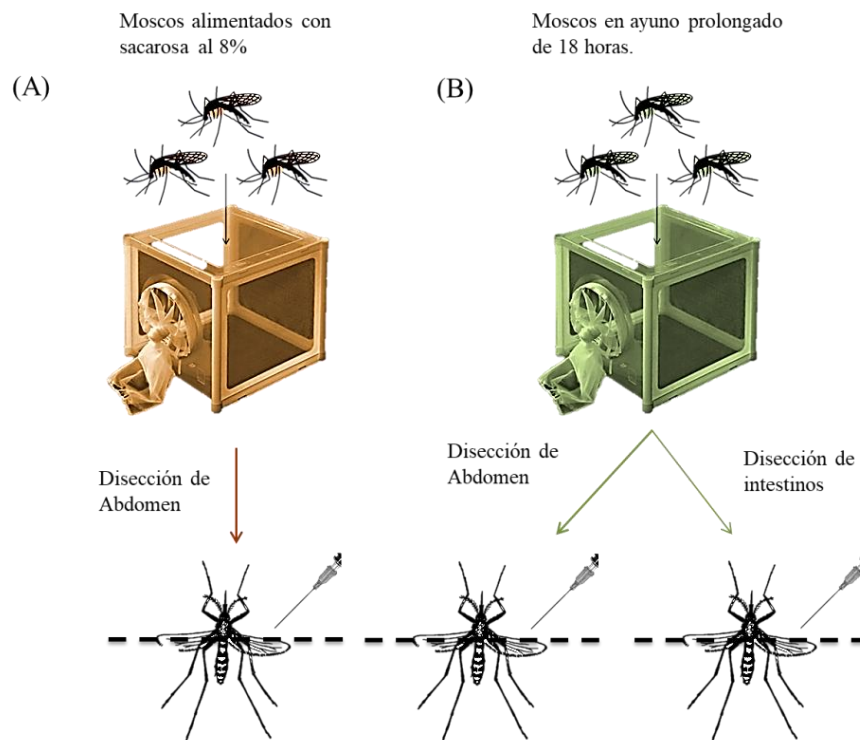


Figura 19. Esquema general de la agrupación de *Anopheles albimanus* para la disección de abdomen e intestino medio. Previó a la selección de grupos, los mosquitos se mantuvieron en crianza con torundas de algodón humedecidas con solución de sacarosa al 8% durante cinco días, después de emerger de la pupa. En el sexto día se dividieron en dos grupos (panel A y B), retirando la torunda de algodón al grupo B durante 18 horas. Transcurrido el tiempo de ayuno, se continuó con la disección de abdómenes (n=20) e intestinos (n=20).

6.1.3 Disección de abdomen e intestino.

La disección de tejidos para todos los experimentos se realizó en un microscopio estereoscópico, utilizando portaobjetos, jeringas y pinzas de disección estériles. Se utilizó como solución de disección, una mezcla de buffer fosfato

salino al 1X con una mezcla de antibióticos PSN (penicilina, estreptomina y neomicina) y gentamicina. Antes de iniciar la disección, los mosquitos se incubaron a una temperatura de -20°C , por tres a cinco minutos para anestésarlos. Los mosquitos se colocaron inmediatamente en un contenedor con hielo (4°C) para mantenerlos inmóviles y e iniciar la disección.

La técnica de disección de intestinos se realizó de la siguiente manera: Sobre un portaobjeto y sosteniendo la jeringa, se colocó una gota de la mezcla de solución de disección, el mosco se tomó cuidadosamente con la punta de las pinzas de disección (preferentemente por las patas), y se colocó dorsalmente sobre el portaobjeto, a manera de que la parte ventral quedara expuesta, el mosquito se sostuvo suavemente de las alas y el tórax. Con la aguja de la jeringa se identificó el antepenúltimo segmento del abdomen, el cual se presionó y se halo para producir una incisión para extraer el intestino y los túbulos de Malpighi, los cuales se cortaron y eliminaron para coleccionar únicamente el intestino medio. Para obtener el abdomen, se realizó el mismo procedimiento, sin embargo para obtener este órgano el corte se produjo entre la unión del tórax y el abdomen. El tejido obtenido se almacenó en $250\ \mu\text{L}$ de TRIzol® para la extracción de RNA.

Posteriormente a la disección de abdómenes e intestinos, se realizó la extracción de RNA por el método de TRIzol®, confirmando la integridad de las muestras en un gel de agarosa al 2%. Continuando con el protocolo para la síntesis de DNA complementario (cDNA), el RNA total extraído de todas las muestras se ajustó a la misma cantidad en un volumen de $10\ \mu\text{L}$. Las reacciones se incubaron con DNase I (RNase-free), Thermo Scientific® durante 30 minutos a 37°C , seguido de 10 minutos de incubación a 70°C con $1\ \mu\text{L}$ de EDTA (50 mM). Para sintetizar y enriquecer sólo el RNA mensajero se agregó oligo DT y se incubó por 10 minutos a 70°C . Para finalizar con la síntesis cDNA, las reacciones se incubaron con un coctel de dNTP's (0.4 uM), $0.25\ \mu\text{L}$ de RiboLock RNase Inhibitor (40 U/ μL), $0.5\ \mu\text{L}$ de enzima transcriptasa reversa (RT 200U/ μL) y buffer de la RT a 5X. Todos los reactivos empleados fueron de la marca Thermo Fisher Scientific®. La reacción se incubó durante una hora y treinta minutos a 42°C . Posteriormente se incubó a

70°C por 10 minutos para la desactivación de la enzima RT por calor. Para la validación de las muestras de cDNA fue necesario amplificar transcritos del gen S7 que codifica para una proteína de la subunidad 40s del ribosoma, amplificando un producto de 147 pb.

La amplificación de un fragmento del receptor de la hormona adipocinética (AKHR) se realizó en las condiciones óptimas estandarizadas que fueron las siguientes. Los volúmenes de reacción de PCR fueron de 12 µL con 2 µL de cDNA, y concentraciones finales de los siguientes reactivos: dNTP's (0.2 mM), Oligo AKHRECEP-FW (0.4 pmol) y AKHRECEP-RV (0.2 pmol), Dream Taq Polymerase Thermo™ (1.5 U) y DreamTaq™ Green Buffer (1 X) el cual contiene KCl and (NH₄)₂SO, así como MgCl₂ a 20 mM. Las condiciones de síntesis para la reacción fueron las siguientes: desnaturalización a 95°C por 3 minutos, alineamiento 64°C por 30 segundos, y extensión a 72°C durante 1 minuto (por 35 ciclos).

El producto amplificado se purificó para su secuenciación y comprobar si correspondía a la secuencia seleccionada para AKHR de la base de datos VectorBase para *An. albimanus*.

6.2 Amplificación de AKHR hipotético durante el desarrollo larval de *Anopheles albimanus*.

El mantenimiento y desarrollo de las etapas larvales se llevó a cabo en recipientes redondos con capacidad para 4 litros de agua y una profundidad de veinte centímetros a 28°C. Las larvas se alimentaron con croquetas pulverizadas para gato (Whiskas®).

Para identificar y evidenciar la presencia de transcritos del receptor de AKH en larvas, se criaron y colectaron ejemplares de las 4 etapas: Larva 1 (L1), larva 2 (L2), larva 3 (L3), larva 4 (L4) y pupa (n=30 por estadio larval). Para clasificar correctamente cada ejemplar y tener una muestra homogénea, se tomaron mediciones de las diferentes larvas (figura 20).

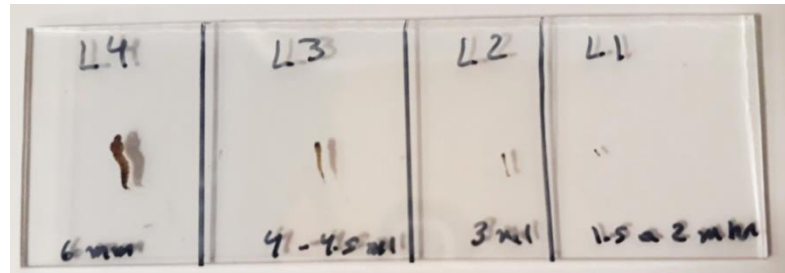


Figura 20. Etapas larvales de *Anopheles albimanus*. Se observan las cuatro etapas larvales de *Anopheles albimanus* y las mediciones correspondientes a la longitud de los individuos.

El cDNA de cada muestra, se utilizó para amplificar el receptor de AKH. Además, se realizó la cuantificación de la expresión del transcrito por análisis tipo $\Delta\Delta CT$ después de la amplificación por PCR tiempo real, con las mismas condiciones de amplificación mencionadas en el apartado 6.5.

6.3 Analizar la expresión relativa del receptor hipotético de AKHR en la etapa larval 4 de *Anopheles albimanus*, después de un reto con *M.luteus* o *E.coli* o zymosan.

Para generar información acerca de participación del receptor hipotético de AKH en la respuesta inmune del mosquito *Anopheles albimanus*, se realizaron experimentos de retos bacterianos. Se inocularon larvas de *An. albimanus* en etapa 4 con *Micrococcus luteus*, *E.coli*, o zymosan, o agua inyectable PiSA®, como vehículo y control de daño físico. Posteriormente, las muestras se tomaron a 1 hora, 2 horas, 6 horas y 24 horas para observar el cambio en la expresión a tiempos cortos y prolongados por el reto (la figura 21 muestra el diseño

experimental).

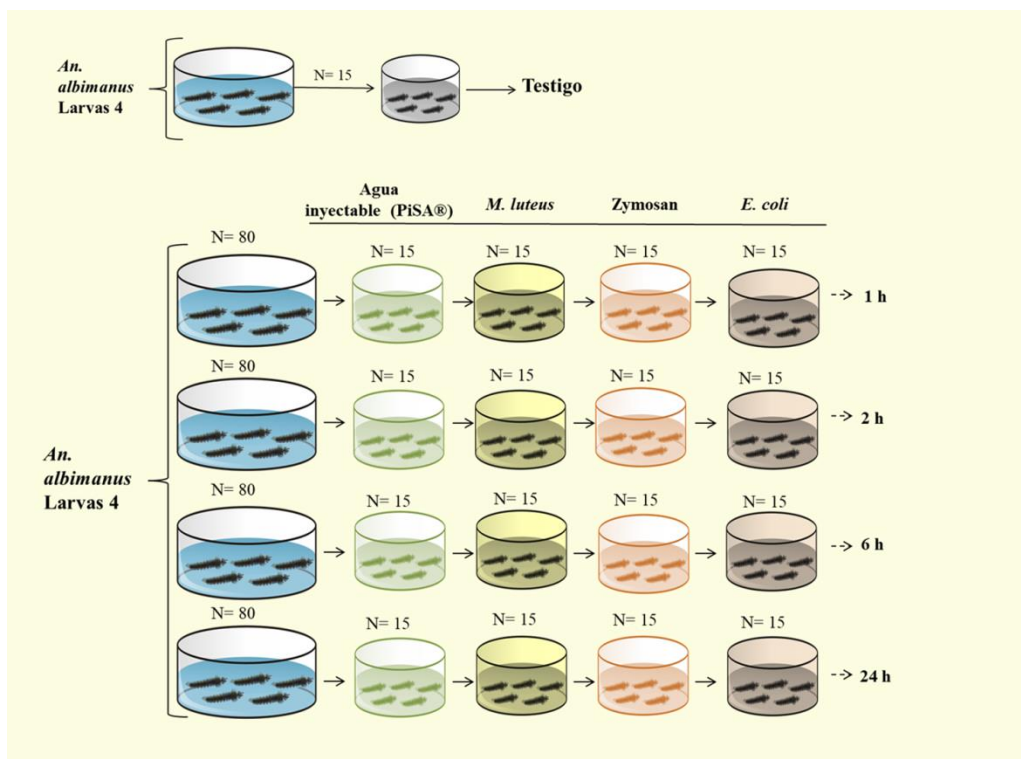


Figura 21. Esquema del diseño experimental del reto en larva 4 de *Anopheles albimanus*. Partiendo de cinco recipientes con 80 larvas en estadio 4 de *An. albimanus*, se tomaron 15 larvas para inocularlas con tres activadores de la respuesta inmune: *M. luteus* (5000 células en 0.2 uL) o *E. coli* (0.2 uL de un stock de 1×10^{10} células) o Zymosan (0.2 μ L de 4 μ g de equivalentes de glucosa/mL); así como el vehículo utilizado, agua inyectable PiSA® (0.2 uL de agua estéril libre de pirógenos). Los tiempos de incubación para posteriormente tomar la muestra fueron 1 hora, 2 horas, 6 horas y 24 horas. Así mismo como testigo se tomaron 15 larvas *An. albimanus*, sin retar.

Para la inoculación, se utilizó un microcapilar de 100 μ L, y un microscopio estereoscópico. Se usaron portaobjetos como base para la colocación de las larvas, a cada larva se le quitó el exceso de agua empleando papel absorbente y así inmovilizarlas y manipularlas de manera eficiente. Las larvas se colocaron en contenedores circulares con capacidad para 0.15 L de agua a temperatura ambiente, de 6 cm de profundidad y se mantuvieron ahí hasta completar los tiempos de incubación. Después del tiempo de incubación, se colectaron 15 larvas por grupo y se almacenaron en 500 μ L de TRIzol para la extracción de RNA. Al igual que la metodología de obtención de RNA, la síntesis de cDNA y los análisis de expresión se realizaron como ya se describió previamente.

7. RESULTADOS

7.1 Búsqueda y análisis *In silico* de una secuencia putativa de AKHR en el genoma de *Anopheles albimanus*.

La búsqueda *In silico* del receptor de AKH en *Anopheles albimanus*, empleando una secuencia ortóloga ya identificada y caracterizada como lo es el receptor de AKH en *Anopheles gambiae*, el mosquito vector de la malaria de origen africano, resultó en la identificación, por alineamiento, de la secuencia AALB008204, la cual se analizó para detectar características similares a la secuencia AGAP002156, la tabla 2 muestra la comparación de las dos secuencias, y la tabla 3 describe los dominios conservados que tiene cada una de estas moléculas.

Tabla 2. Comparación de secuencias de AKHR de *Anopheles gambiae* y *Anopheles albimanus*. Características compartidas entre la secuencia AGAP002156 de *An. gambiae* y AALB008204 de *An. albimanus*.

Características	AGAP002156	AALB008204
Descripción	Putative gonadotrophin releasing hormone receptor 1	---
Localización	Cromosoma2R: 16,572,378-16,574,313 forward strand.	Cromosoma 2R: 30,846,436-30,848,053 forward strand.
Ortólogos	44	44
Parálogos	5	5
No. Transcritos	1	1
	AGAP002156-RA	AALB008204-RA
Longitud en pares de bases	1467	1215
No. Exones	7	6
Biotipo	Codificante para proteína	Codificante para proteína
Longitud de la proteína en aminoácidos	354	404
No. Dominios y características	27	24

Tabla 3. Dominios compartidos entre AGAP002156 (AKHR) y AALB008204 (AKHR hipotético).

Dominios	AGAP002156-RA	AALB008204-RA
Prints	G protein-coupled receptor, rhodopsin-like	G protein-coupled receptor, rhodopsin-like
PROSITE patterns	G protein-coupled receptor, rhodopsin-like	G protein-coupled receptor, rhodopsin-like
PROSITE profiles	GPCR, rhodopsin-like, 7TM	GPCR, rhodopsin-like, 7TM
Prints	Vasopressin receptor	

La búsqueda de dominios en la secuencia de aminoácidos AALB008204 proporcionó una característica importante, la secuencia corresponde a un receptor acoplado a proteína G de la familia tipo I. Para confirmar el resultado y la identidad de esta molécula, se realizó un análisis para la predicción de topologías de proteínas de membrana, éste análisis confirmó la estructura de un GPCR (por sus siglas en inglés, *G protein-coupled receptors*), empleando el software TMHMM 2.0, Los resultados del análisis se observan en la figura 22.

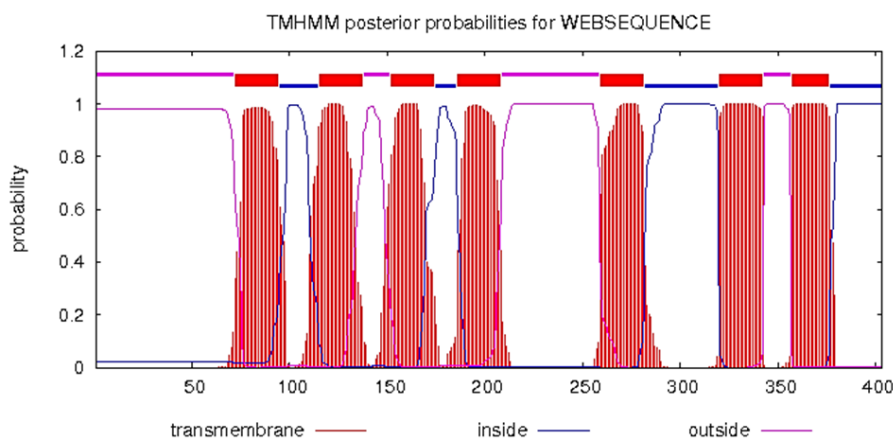


Figura 22. Análisis tipo TMHMM para la predicción de hélices transmembrana en secuencias proteicas. El eje de las ordenadas (Y) corresponde a la probabilidad de que el fragmento de la proteína se encuentre a travessando la membrana, en el interior o en el exterior. El análisis se hizo con la proteína putativa de la secuencia AALB008204. La molécula tiene siete hélices transmembrana y corresponde con la estructura de un GPCR.

En la tabla 4 se observan los intervalos de aminoácidos que corresponden a cada dominio hélice transmembrana.

Tabla 4. Posiciones de aminoácidos de cada dominio hélice transmembrana.

AGAP002156-RA			AALB008204-RA		
Tipo de característica	Inicio	Final	Tipo de característica	Inicio	Final
Seg	331	342	Seg	254	262
TMHMM	51	73	TMHMM	73	95
TMHMM	85	107	TMHMM	116	138
TMHMM	122	144	TMHMM	153	175
TMHMM	161	183	TMHMM	187	209
TMHMM	210	232	TMHMM	260	282
TMHMM	271	293	TMHMM	321	343
TMHMM	308	327	TMHMM	358	377

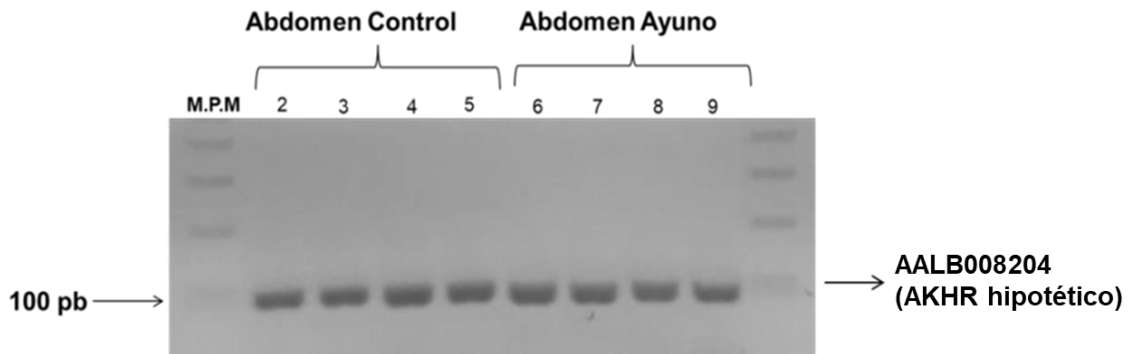
Posteriormente del análisis *In silico* de la secuencia AALB0082004, decidimos comenzar la búsqueda experimental de un fragmento transcripcional en abdomen e intestinos de mosquitos, para demostrar su presencia en *Anopheles albimanus*.

Como complemento, un segundo alineamiento, entre la secuencia aminoacídica codificante a partir de la secuencia 8204 de *An. albimanus* y 2156 de *An. gambiae*, se realizó con la herramienta jalview. Para la identificación de aminoácidos conservados entre 15 receptores identificados así como otros hipotéticos para AKH en otras especies de insectos (Anexo 1).

7.1.2 Amplificación de AKHR por punto final en abdómenes e intestinos de *Anopheles albimanus*.

Para validar la presencia de la secuencia AALB008204 en mosquitos *Anopheles albimanus*, se disectaron abdómenes (debido a que el órgano diana de la hormona adipocinética es el cuerpo grasoso y éste se encuentra en el abdomen).

Un fragmento de 111 pares de bases se amplificó de moscos alimentados con solución de sacarosa al 8% y moscos con privación del alimento por 18 horas como se muestra en la figura 23. Interesantemente el fragmento también se observó en intestinos de moscos en ayuno, órgano que no se considera diana de la hormona adipocinética por la función que se ha descrito para esta hormona



(figura 24).

Figura 23. Amplificación de AKHR hipotético en abdomen. Gel de agarosa al 2%, en él se observan las bandas de amplificación correspondientes a un fragmento del transcrito de la secuencia putativa para AKHR (111 pb) en abdómenes de mosquitos hembra *Anopheles albimanus*, previo a la purificación de las bandas para su secuenciación.

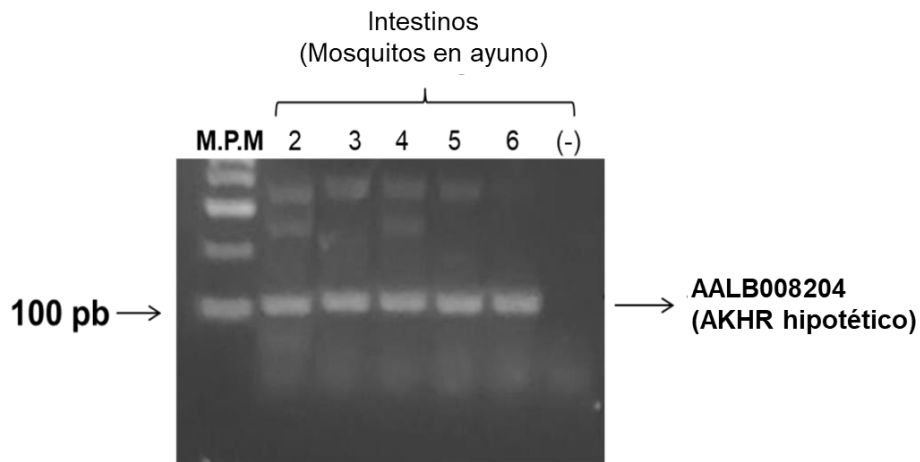


Figura 24. Amplificación de AKHR hipotético en intestinos. Gel de agarosa al 2%, se observa la amplificación del fragmento de la secuencia AALB008204 en intestino medio de mosquitos hembra en ayuno. La reacción se realizó en un gradiente de temperatura de alineamiento, carril 2: 58°C, carril 3: 60°C, Carril 4: 62°C, Carril 5: 63°C y Carril 6: 64°C, el carril 7 muestra el control negativo.

Para comprobar el resultado de la amplificación, el fragmento de 111 pb en abdómenes fue secuenciado, el análisis de la secuencia confirmó que corresponde a un segmento de AKHR de *An. albimanus*, figura 25.

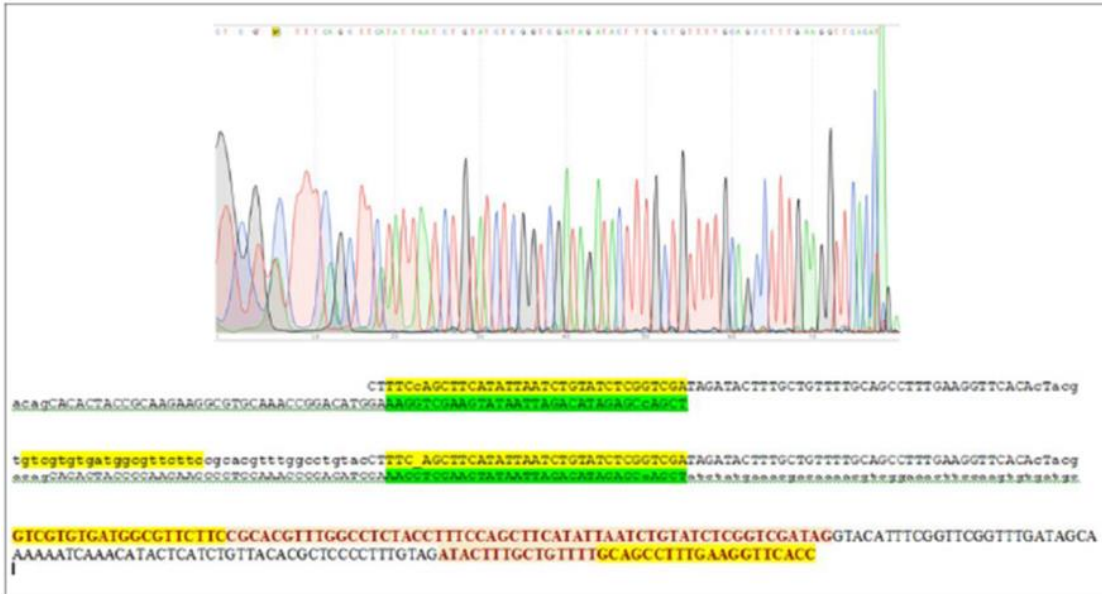


Figura 25. Electroferograma de la secuenciación de AKHR hipotético. La imagen muestra un fragmento del electroferograma que contiene parte de la secuencia de ALB008204 (AKHR). En amarillo y verde se muestra las secuencias de los oligos AKHRECEP-FW 5'- GTC GTG TGA TGG CGT TCT TC -3' y AKHRECEP-RV 5'- GGT GAA CCT TCA AAG GCT GC -3', identificados en la secuencia obtenida de la secuenciación del fragmento del receptor hipotético de la hormona adipocinética, así como las bases totales secuenciadas que empalman con la secuencia de la base de datos.

7.2 Amplificación de AKHR hipotético durante el desarrollo larval de *Anopheles albimanus*

Para demostrar la presencia de AKHR (AALB008204) en las etapas larvales y pupas de *An. albimanus*, se amplificó y analizó su expresión (figura 26 y 27). Estos resultados confirmaron la presencia de AKHR en larvas de *An. albimanus*.

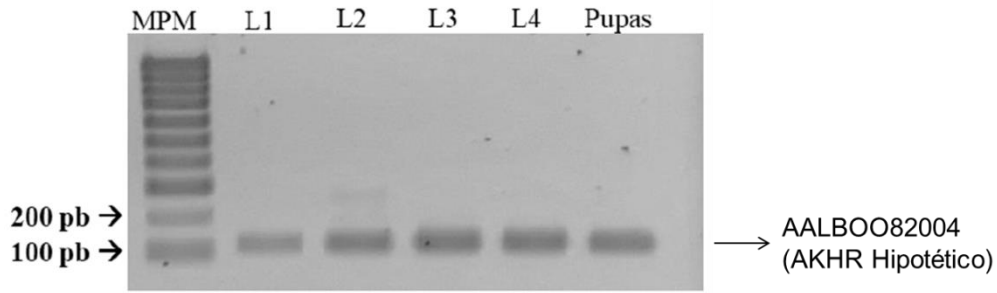


Figura 26. Amplificación de AKHR hipotético en larvas de *Anopheles albimanus*. Se observa la amplificación de AKHR hipotético en un gel de agarosa al 2% (8 uL de producto de PCR por pozo) en los cuatro estadios larvales y pupa de *Anopheles albimanus*.

Expresión de AKHR durante el desarrollo larval de *An.albimanus*

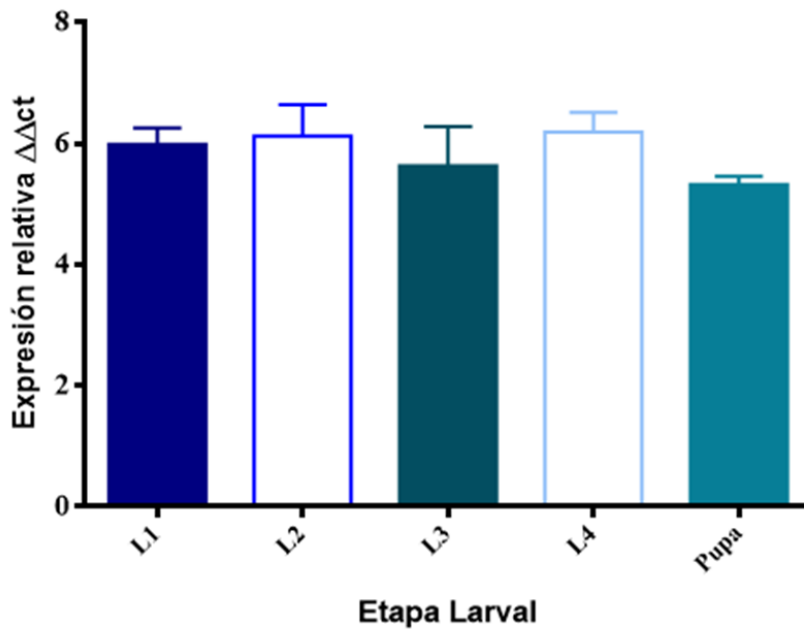


Figura 27. Expresión relativa ($\Delta\Delta Ct$) de AKHR hipotético durante el desarrollo larval. La gráfica muestra la media obtenida de la expresión de AKHR hipotético (AALB008204); L1 \bar{X} = 5.985, L2 \bar{X} = 6.125, L3 \bar{X} = 5.63, L4 \bar{X} = 6.19 y Pupa \bar{X} = 5.32, obteniendo de la prueba de anova de una vía el resultado de $F = 1.511$, $P > 0.05 = 0.3267$. Por lo tanto la expresión se mantiene constante sin variación significativa.

7.3 Expresión relativa del receptor hipotético de AKHR en la etapa larval 4 de *Anopheles albimanus*, después de un reto con *M.luteus*, *E.coli* o zymosan.

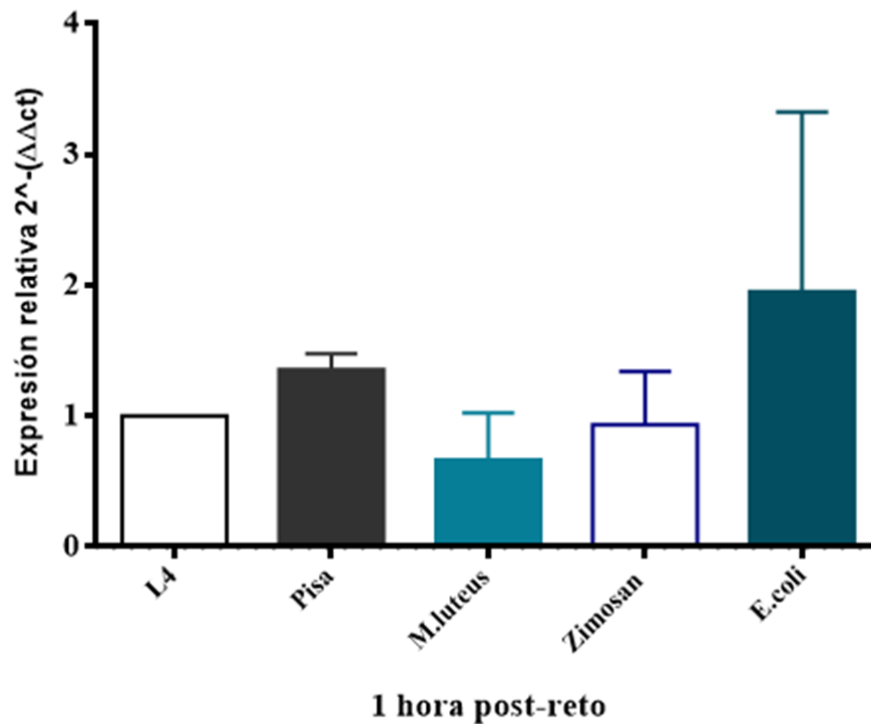
Como consecuencia de la evidencia del receptor hipotético de la hormona adipocinética en larvas. Se realizó un análisis de expresión de este receptor en larvas L4 después de un reto con *M. luteus* o *E. coli* o Zymosan (figura 28). La tabla 5 muestra las medias obtenidas de la expresión relativa de AKHR (AALB008204) durante los retos en una cinética de tiempo (1 hora, 2 horas, 6 horas y 24 horas).

En las larvas inoculadas con agua PiSA®, la expresión tuvo un pequeño aumento a 1 hora post-reto ($\bar{X}= 1.355$), sin embargo a las 2 horas y 6 horas los datos fluctuaron sin llegar a ser un cambio exacerbado. Con *M. luteus*, las medias se presentaron constantes, sin cambio en la expresión (1 hora $\bar{X}= 0.665$, 2 horas $\bar{X}= 0.33$, 6 horas $\bar{X}= 0.5$ y 24 horas $\bar{X}= 0.505$). En zymosan, a las 24 horas se presentó un mínimo aumento ($\bar{X}= 1.235$) considerando un posible efecto en tiempos prolongados. Por último, en *E.coli* las medias obtenidas exhibieron una aparente disminución de la expresión, en tiempos cortos (1 hora $\bar{X}= 1.95$, 2 horas $\bar{X}= 0.975$ y 6 horas $\bar{X}= 0.095$), no obstante a las 24 horas la expresión se recuperó. Sin embargo, con base en el análisis estadístico, únicamente a las 6 horas post-reto, mostraba diferencias significativas (anova de una vía, $F = 6.849$, $P < 0.05 = 0.0291$, $R^2 = 0.8457$, $IC = 95\%$). Aplicando un análisis de comparaciones múltiples con la prueba de Tukey ($P < 0.05 = 0.0398$, $IC = 95\%$), se logró identificar el grupo de larvas inoculadas con *E.coli* a las 6 horas post-reto, como el grupo que presentó una disminución significativa en la expresión de AKHR (AALB008204) respecto al control.

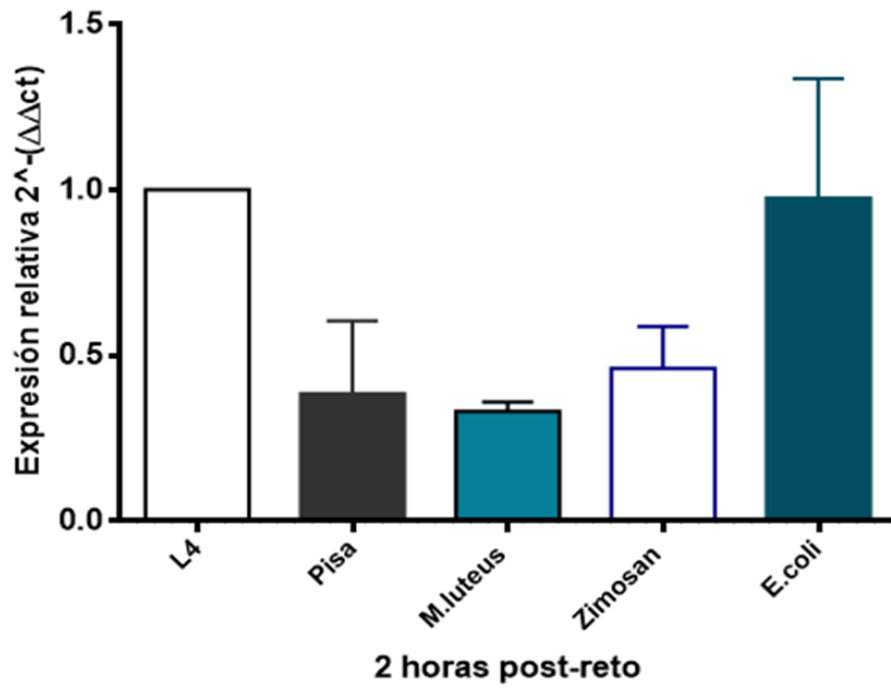
Tabla 5. Medias de la expresión relativa de AKHR hipotético después un reto en L4.

Media de la expresión relativa de AKHR hipotético durante un reto en larva 4.					
Tiempo post-reto	Tratamiento		Tiempo post-reto	Tratamiento	
1 h	Larva 4 (blanco)	1.000	2 h	Larva 4 (blanco)	1.000
	Pisa	1.355		Pisa	0.385
	<i>M. Luteus</i>	0.665		<i>M. Luteus</i>	0.33
	Zimosan	0.935		Zimosan	0.46
	<i>E coli</i>	1.95		<i>E coli</i>	0.975
6 h	Larva 4 (blanco)	1.000	24 h	Larva 4 (blanco)	1.000
	Pisa	0.905		Pisa	0.84
	<i>M. Luteus</i>	0.5		<i>M. Luteus</i>	0.505
	Zimosan	0.39		Zimosan	1.235
	<i>E coli</i>	0.095		<i>E coli</i>	0.25

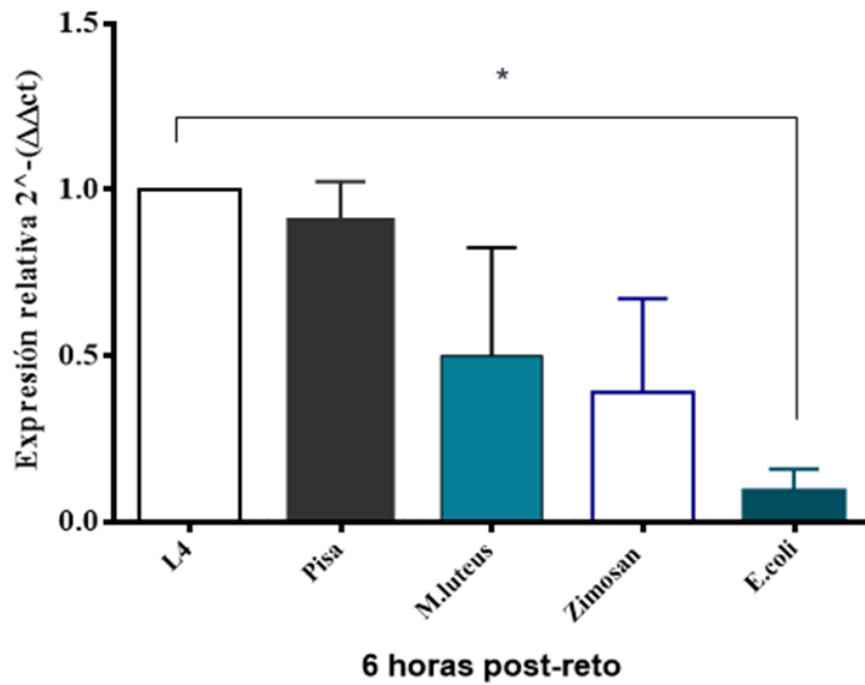
A) Expresión de AKHR en larva 4 de *An.albimanus*



B) Expresión de AKHR en larva 4 de *An.albimanus*



C) Expresión de AKHR en larva 4 de *An.albimanus*



D) Expresión de AKHR en larva 4 de *An.albimanus*

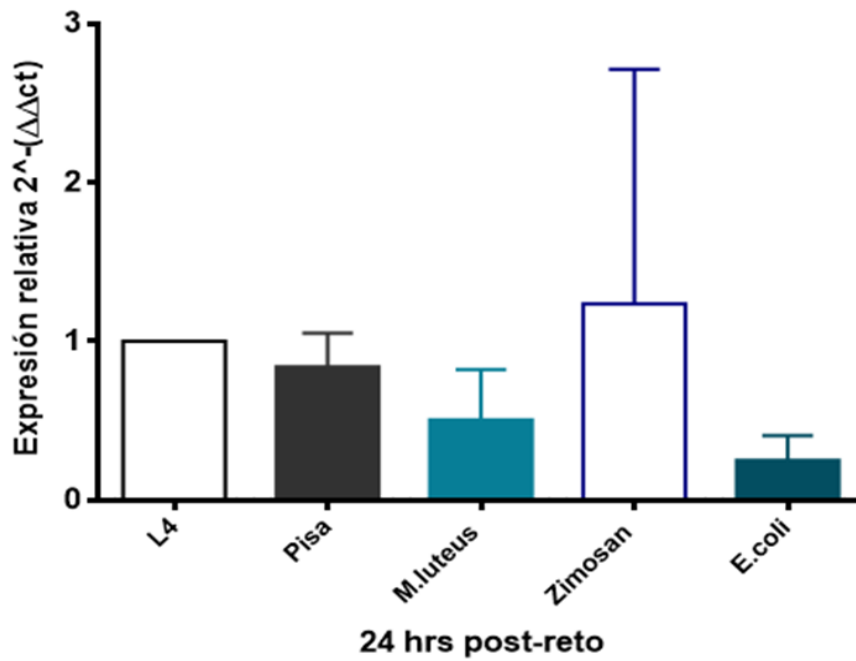


Figura 28. Gráficas de la expresión relativa ($2^{-\Delta\Delta ct}$) de larvas en etapa 4 durante un reto. El eje de las ordenadas corresponde al cambio en el número de veces que aumentó o disminuyó la expresión y el eje de las abscisas corresponde a los diferentes estímulos inoculados para inducir la respuesta inmune; L4 (Larvas control en etapa 4), PiSA (vehículo), *M.luteus* y *E.coli*. En la gráfica A), se observa la expresión de AKHR hipotético (AALB002804) a 1 hora post-reto; en B) 2 horas post-reto; gráfica C) 6 horas post-reto y en la gráfica D) 24 horas post-reto. En la gráfica C) únicamente en el grupo de larvas inoculadas con *E.coli*, la expresión de AKHR hipotético disminuye significativamente.

8. DISCUSIÓN

La biología de los organismos vectores de enfermedades, en general ha sido ampliamente estudiada, preferentemente en aquellos que tienen un gran impacto en la salud de la población y por ende presentan altas tasas de mortalidad. Los mosquitos, un grupo diverso por su número de especies, han captado la atención a nivel mundial, por su gran capacidad vectorial para transmitir una diversidad de especies patógenas al humano. *Anopheles albimanus* es uno de los vectores del paludismo o malaria que se encuentra en América y en México, por lo tanto, nuestro grupo de trabajo se ha dedicado a generar conocimiento para continuar comprendiendo el funcionamiento del vector.

Recientemente, decidimos incursionar en una nueva línea de investigación, con la cual pretendemos conocer la relación del sistema endócrino y el sistema inmune en mosquitos. Alvarado, A. y colaboradores (2016), observaron una sobreexpresión de neuropéptidos en cerebros de moscos *Anopheles albimanus*, infectados con *Plasmodium berghei*. Interesantemente, un neuropéptido que tuvo una alta expresión a nivel transcripcional, fue la hormona adipocinética, reguladora del metabolismo de lípidos y carbohidratos en insectos. No obstante, la función de moléculas producidas en el sistema nervioso, sobre el sistema inmune, ha sido muy poco explorada, pero existen trabajos que demuestran que neuropéptidos como la allatotropina, la allatostatina, los péptidos parecidos a la insulina y las hormonas adipocinéticas de mosquitos, podrían estar asociados a procesos inmunes (Goldsworthy, G. et al. 2002; Hernández, S. et al. 2017; Pietri, J. et al., 2015.).

Por consiguiente, hemos trabajado con las hormonas adipocinéticas y su efecto sobre la respuesta inmune. Datos presentados en este trabajo, proponen un efecto de la hormona adipocinética en el intestino medio de *Anopheles albimanus*, por lo tanto decidimos trabajar en la búsqueda e identificación de un receptor de AKH, así como en su dinámica de expresión durante el desarrollo larval y ante estímulos microbianos.

8.1 Búsqueda y análisis *In silico* de una secuencia putativa de AKHR en el genoma de *Anopheles albimanus*.

El receptor de la hormona adipocinética se ha descrito como un receptor acoplado a proteína G, por datos obtenidos a partir de estudios de modelado *In silico* de la estructura del AKHR de *Anopheles gambiae*; donde lo describen como una estructura con siete dominios hélices transmembrana, tomando como base las estructuras cristalizadas del receptor beta-2-adrenérgico y la rodopsina (Mugumbate, G., et al. 2010). Por lo tanto, estas características fueron las principales para la búsqueda e identificación de secuencias que presentan dominios similares.

El receptor de AKH ya ha sido identificado y caracterizado farmacológicamente, en ocho especies de insectos, *Bombyx mori*, *Aedes aegypti*, *Bactrocera dorsalis*, *Sarcofaga crassipalpis*, *Glossina morsitans*, *Rhodnius prolixus*, *Periplaneta americana* y *Drosophila melanogaster*, el presente trabajo, es el primer reporte de la identificación de una secuencia hipotética del receptor de AKH en el vector de la malaria *Anopheles albimanus*. Tomando como base la secuencia AGAP002156, la cual esta reportada como receptor putativo de la hormona liberadora de la gonadotropina (GnRH, por sus siglas en inglés: *Gonadotropin-releasing hormone*), la nomenclatura o descripción de esta secuencia se debe a la divergencia entre el receptor de AKH y el receptor de la GnRH, compartiendo un ancestro común.

El análisis de tipo blast, permitió obtener una secuencia que tuviera el mayor porcentaje de cobertura nucleotídica en *Anopheles gambiae*, la tabla 6 contiene los porcentajes de cobertura de las primeras doce secuencias obtenida del Blast.

Tabla 6. Secuencias obtenidas del análisis de tipo blastn.

Organismo	Ortólogo	Descripción	%ID del blanco	%ID de consulta	Puntaje GOC	Cobertura WGA
1 Aedes aegypti	AAEL011325-PC	Gonadotropin-releasing hormone receptor	46.76 %	57.06 %	n/a	76.94
2 Anopheles albimanus	AALB008204-RA	No descripción	69.31 %	79.10 %	75	97.38
3 Anopheles arabiensis	AARA006785-PA	No descripción	39.12 %	94.92 %	100	100.00
4 Anopheles coluzzi	ACOM042128-RA	No descripción	100.00 %	100.00 %	100	100.00
5 Anopheles darlingi	ADAC000763-RA	Gonadotropin-releasing hormone receptor	75.46 %	80.79 %	75	95.60
6 Anopheles stephensi	ASTE000730-RA	No descripción	32.74 %	82.77 %	100	100.00
7 Cimex lectularius	CLEC001064-RA	Adipokinetic hormone receptor	46.32 %	48.02 %	n/a	n/a
8 Drosophila Melanogaster	AkhR FBgn0025595 *AkhR- RB FBtr0079309 *AkhR- RD FBtr0332331 *AkhR- RA FBtr0079308 *AkhR- RC FBtr0079310	Adipokinetic hormone receptor AkhR-RB (443 AA'S) AkhR-RC (455 AA'S)	39.34 %	50.56 %	25	n/a
9 Glossina morsitans	GMOY008368-RA	Putative Adipokinetic hormone receptor isoform A	40.52 %	48.31 %	25	n/a
10 Musca domestica	MDOA004853-RB MDOA004853-RA 429 AA'S MDOA004853-RD 429 AA'S	gonadotropin-releasing hormone receptor	40.79 %	43.32 %	25	n/a
11 Pediculus humanus	PHUM370810-RA	Class A rhodopsin-like G-protein coupled receptor GPRgnr1, putative	52.10 %	46.04 %	n/a	n/a
12 Stomoxys calcitrans	SCAU014960-RA *SCAU014960-RB *SCAU014960-RC *SCAU014960-RD	Gonadotropin-releasing hormone receptor	41.81 %	43.56 %	n/a	n/a

Del análisis de alineamiento seleccionamos la secuencia AALB008204, por tener un porcentaje del 97% de similitud y por ser la única secuencia en el genoma de *Anopheles albimanus* que empalmara con la secuencia de *Anopheles gambiae*. Los análisis posteriores mostrados en la tabla 3 y 4 de la sección de resultados, permitieron tener datos más robustos para trabajar con la secuencia AALB008204. Por otro lado, podemos observar que existen secuencias que codifican para más de un transcrito, como es el ejemplo de *Drosophila melanogaster*, *Glossina morsitans*, *Musca domestica* y *Stomoxys calcitrans*, las cuales probablemente son

isoformas del gen, hay reportes donde argumentan que AKHR pose más de una isoformas dependiendo de la especie. Al realizar la estandarización de la amplificación en intestino medio de *An. albimanus*, a temperaturas de amplificación menores a 64°C (figura 25), obteníamos más de un producto por lo que especulamos que podrían ser isoformas de la secuencia, sin embargo la purificación y secuenciación sería necesaria para confirmar la presencia de isoformas.

En la base de datos *Vector Base*, el transcrito AALB008204-RA, presenta un dominio de receptor acoplado a proteína G parecido a la rodopsina, para confirmarlo realizamos un análisis en InterProScan, obteniendo cuatro dominios citoplasmáticos, cuatro dominios extracelulares más siete dominios transmembrana (figura 29).

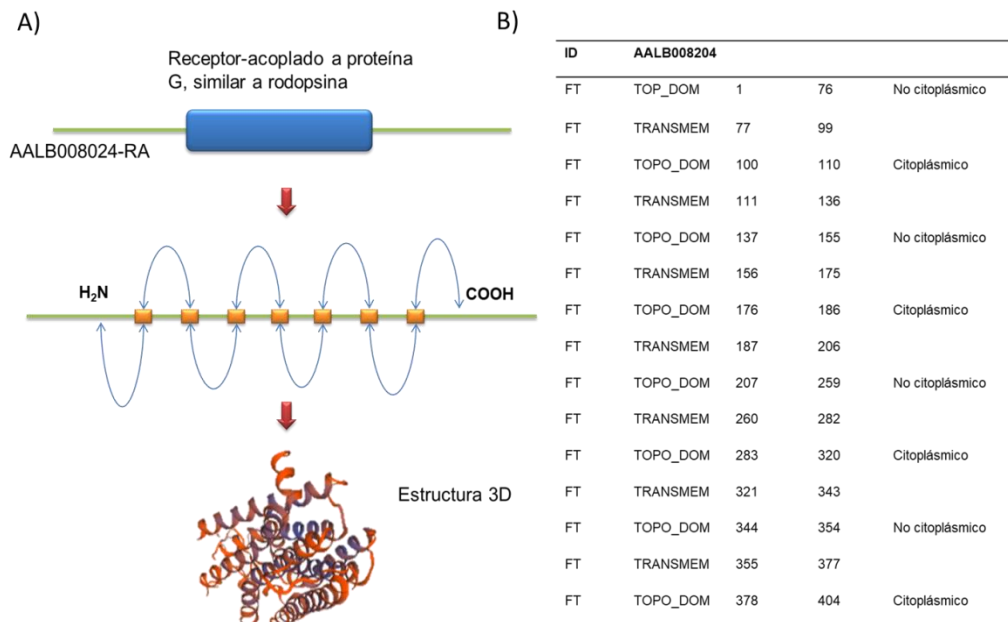


Figura 29. Estructura de AKHR hipotético en *Anopheles albimanus*. En el panel A) se observa una ilustración que corresponde a la estructura de AKHR y en el panel B), una tabla que contiene los dominios predictivos para la secuencia y su ubicación.

Con el análisis *In silico* realizado, logramos como primer reporte, la detección del gen AALB008204, como secuencia hipotética del receptor de AKH en *An. albimanus*, tomando en consideración nombrar la secuencia en la base de datos.

Por otra parte será necesario realizar ensayos bioquímicos para lograr una caracterización de la funcionalidad de la proteína traducida a partir de esta secuencia hipotética, con la finalidad de confirmar la presencia del receptor de AKH.

8.1.2 Amplificación de AKHR por punto final en abdómenes e intestinos de *Anopheles albimanus*.

Conocer la existencia de una secuencia hipotética que codifique para el receptor de AKH, surge a partir de datos obtenidos en el grupo de trabajo, los cuales podrían relacionar a las hormonas adipocinéticas con la respuesta inmune. Sin embargo específicamente en *Anopheles albimanus*, es un campo no explorado, por lo tanto, las moléculas o complejos que participan en la vía de señalización, desencadenada por la AKH no se conocen. Por tal motivo, decidimos buscar de manera experimental el receptor hipotético de la hormona, iniciando en abdómenes de mosquitos, ya que en su interior se encuentra el cuerpo graso, órgano diana de la hormona (Gäde, G., & Auerswald, L., 2003).

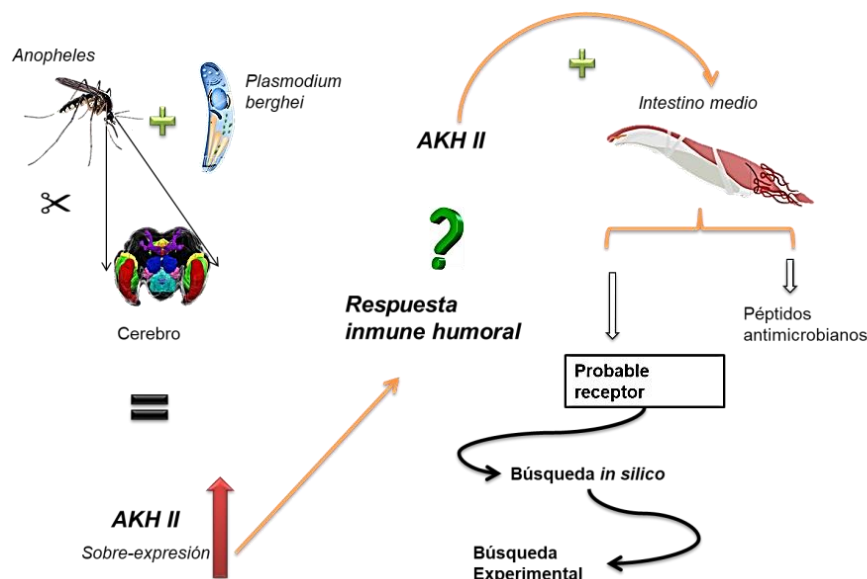


Figura 30. Esquema que ilustra el desarrollo de la propuesta experimental. Inicia con los datos obtenidos por Alvarado-Delgado y col, 2016; en cerebros de mosquitos *An. albimanus* infectados con *Plasmodium berghei* donde la expresión de las hormonas adipocinéticas aumenta. Con el objetivo de conocer si las AKH podrían relacionarse con la respuesta inmune, iniciamos por analizar su efecto en la respuesta inmune humoral, cuantificando la expresión de péptidos antimicrobianos en intestino medio y como consecuencia realizamos la búsqueda de una secuencia hipotética de AKHR en abdomen e intestino medio.

Para la amplificación por PCR punto final, se formaron dos grupos, mosquitos de seis días alimentados con solución de sacarosa y mosquitos con un ayuno prolongado de 18 horas (figura 31). La finalidad de la privación de alimento fue de potenciar la expresión del receptor de AKH, ya que la señalización por AKH regula tres principales sistemas metabólicos, el metabolismo basado en carbohidratos, el metabolismo basado en lípidos y el metabolismo a base de prolina (Gäde, G., & Auerswald, L., 2003), por lo tanto especulamos que una privación de alimento podría potenciar la expresión de AKHR hipotético.

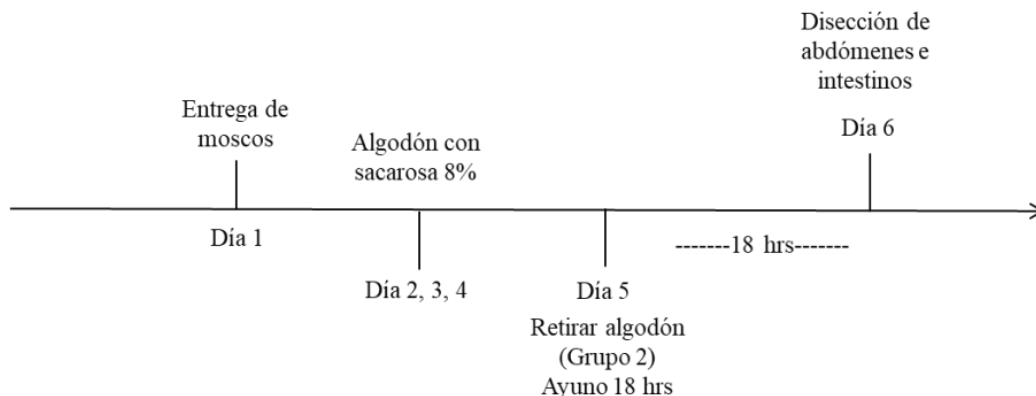


Figura 31. Diseño experimental para la amplificación de AKHR hipotético en abdomen e intestinos.

Sin embargo, el resultado obtenido de la amplificación únicamente por PCR punto final de abdómenes, propone una expresión constitutiva o sin diferencias cualitativas entre ambos grupos de mosquitos, probablemente es necesario prolongar por más tiempo el tiempo de ayuno para poder observar diferencias.

En síntesis, logramos la amplificación e identificación de un fragmento de la

secuencia AAL008204 en abdómenes intestino. Sin embargo, al realizar la estandarización de la amplificación en intestino medio de *An. albimanus*, a temperaturas de amplificación menores a 64°C (figura 32), obteníamos más de un producto por lo que especulamos que podrían ser isoformas de la secuencia, sin embargo la purificación y secuenciación sería necesaria para confirmar la presencia de isoformas. La toma del tejido se hizo únicamente extrayendo el intestino medio, separando el intestino posterior y los túbulos de Malpighi, no obstante pueda ser necesaria otra repetición experimental tomando en cuenta realizar lavados con PBS a los intestinos, para limpiar el tejido de restos de fluidos del hemocele. El trabajo realizado en la mosca de la carne *Sarcophaga crassipalpis* (Bil, M., et al; 2016), demuestra un perfil de distribución de la expresión de AKHR en diferentes tejidos de la mosca, logrando detectar la expresión en intestino medio lo cual sustenta nuestros resultados obtenidos en intestino medio de *Anopheles albimanus*.

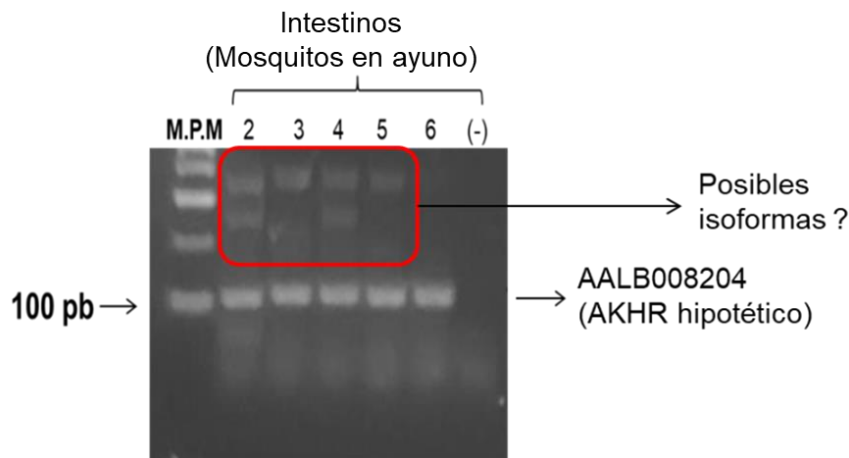


Figura 32. Amplificación de AKHR hipotético y posibles isoformas. Gel de agarosa al 2%. Producto de amplificación de 111 pb corresponden a la secuencia AALB008204. El recuadro rojo, marca las bandas de los carriles 2, 3, 4 y 5 amplificadas a temperaturas de 58°C, 60°C, 62°C, 63°C respetivamente. Los oligos diseñados reconocen un fragmento similar a la secuencia blanco lo que probablemente sugiere, sean isoformas del transcrito o secuencia conservada en genes que probablemente transcriben para otros receptores de características similares.

8.2 Amplificación de AKHR hipotético durante el desarrollo larval de *Anopheles albimanus*

La expresión de AKHR hipotético (AALB008204), se analizó en las etapas larvales de *Anopheles albimanus*, ya que su ligando, la hormona adipocinética se expresa durante toda la ontogenia de los insectos. En resumen, se logró la amplificación del fragmento en las cuatro etapas larvales en pupas, así mismo se cuantificó la expresión por un análisis tipo $\Delta\Delta\text{ct}$, los resultados obtenidos sugieren una expresión constante de AKHR hipotético en larvas, sin cambios exacerbados de aumento o disminución de la expresión en alguna etapa larval.

8.3 Analizar la expresión relativa del receptor hipotético de AKHR en la etapa larval 4 de *Anopheles albimanus*, después de un reto con *M.luteus* o *E.coli* o zymosan.

Para finalizar, con el objetivo de analizar la dinámica de la expresión de AKHR (AALB008204), durante un reto bacteriano, se seleccionaron larvas en etapa 4 de *Anopheles albimanus*, para la inoculación de bacterias como *Micrococcus luteus* y *Escherichia coli*, y un inductor de la respuesta inmune como lo es el Zymosan, un glucano con unidades repetidas de glucosa que se localiza en la superficie de las paredes celulares de las levaduras, formando un complejo con proteínas de superficie.

Datos demuestran una respuesta inmune eficiente contra la infección de *E.coli* y *M. luteus*, en larvas en estadio 4 de *Anopheles gambiae*, observando la fagocitosis de hemocitos y la activación de la fenoloxidasa, sustentando una respuesta ante estos microorganismos (League, G., et al; 2017). Reportes proponen una activación de péptidos antimicrobianos como atacina, cecropina y defensina, ante un reto con *E. coli*, 24 horas post-infección (Moreno, M., et al; 2015). Por lo tanto, se tomó la decisión de seleccionar a *M. luteus* y *E. coli*, como inductores de la respuesta inmune en el experimento, ya que nos proporcionaría información del efecto de la activación de la respuesta inmune sobre la expresión de AKHR. Importantemente, la realización del experimento contribuyó a la generación de datos iniciales para

nuestro grupo de trabajo, que relaciona por primera vez la expresión de un receptor de AKH con respuesta inmune.

Interesantemente la expresión de AKHR (AALB008204) disminuyó significativamente en larvas retadas con *E.coli* a las 6 horas. Por lo tanto *E.coli* fue el único estímulo que tuvo un efecto sobre la expresión. Observando la cinética completa de *E.coli*, esta comienza con un aumento en la expresión de AKHR y va disminuyendo conforme transcurre el tiempo, sin embargo parece comenzar a recuperarse a las 24 horas. No hay datos que demuestren la función de AKHR en respuesta inmune en insectos por lo que una comparación no es posible, no obstante la conjetura propuesta es un posible redireccionamiento de la energía durante un reto inmune. Las hormonas adipocinéticas funcionan como reguladoras del metabolismo energético tanto en larvas como en mosquitos adultos, sobre todo durante la inanición y gasto excesivo de energía. Durante el reto con *E.coli* la larva podría estar disminuyendo este mecanismo, ya que se encuentra en un estado comprometido que le demanda encender mecanismos inmunes que combatan al agente extraño circulante, por lo que la energía se direcciona absolutamente en eliminarlo.

Por otra parte, los resultados son de dos experimentos independientes, por lo que mejoras en la estandarización y una tercer replica contribuiría a esclarecer los resultados obtenidos. Así mismo, contribuyen a centrarse únicamente en un solo estímulo, la inoculación de larvas con *E.coli* y comprobar el efecto que tiene sobre AKHR.

9. CONCLUSIONES

- Se identificó *In silico*, la secuencia AALB008204 en *Anopheles albimanus* como ortólogo del gen AGAP002156 de *Anopheles gambiae*, que codifica para el receptor de la hormona adipocinética (AKHR).
- Se validó la presencia del transcrito para AKHR hipotético (AALB008204) en abdómenes e intestinos de mosquitos *Anopheles albimanus* y en las etapas larvales.
- La expresión de AKHR (AALB008204) disminuye significativamente a las 6 horas post-reto con *E.coli* respecto al control.

10. PERSPECTIVAS

Continuar con la caracterización experimental de la secuencia AALB008204, realizando ensayos de clonación y expresión de la proteína.

Realizar ensayos bioquímicos que determinen su función y validación de la secuencia AALB008204, como receptor de la hormona adipocinética en *Anopheles albimanus*.

Continuar con experimentos que aporten conocimiento de la condición de AKHR en un estado fisiológico comprometido por la introducción de microorganismos, daño o estrés.

Enriquecer y mejorar la metodología de inoculación de larvas *An.albimanus*, con microorganismos, utilizando un método que proporcione más precisión con la finalidad de disminuir la variación al momento de la introducción de un microcapilar en el tejido.

11. ANEXOS

1. Alineamiento, entre la secuencia aminoacídica codificante a partir de la secuencia AALB008204 de *An. albimanus* y AGAP002156 de *An. gambiae*, para la identificación de aminoácidos conservados entre 15 receptores identificados así como otros hipotéticos para AKH en otras especies de insectos.

221 PTHNSVGAQSF I HVE THPNITGYOCCVTYHYFFEE IYE I IYVNLVGLGAGFVAVLP VVILVYCGS IYVE IFSRTNPR -- NLESFRSS IDVLGRAKRTLRMT I I V I V F V V C W M P
180 AF I HLEGHPIITGYOCCVTYHYFFEE IYQ I IYVNLVGLVAVLWVPL I V L V C G S I Y V E I F S R T N P R -- N L E S F R S S I D V L G R A K R K T L R M T M I V I V F V C W M P 283
205 P I HVE IHPIITGYOCCVTYHYFFEE IY I IYVNLVGLVAVLWVPL L T I C G S A S I Y V E I F R I S R U P -- N S E G F R S S I D V L G R A K R K T L R M T M I V I V F V C W M P 283
180 AF I HLEGHPIITGYOCCVTYHYFFEE IY I IYVNLVGLVAVLWVPL I V L V C G S I Y V E I F S R T N P R -- N L E S F R S S I D V L G R A K R K T L R M T M I V I V F V C W M P 283
205 SF I HVE THPNITGYOCCVTYHYFFEE IY I IYVNLVGLVAVLWVPL I V L V C G S I Y V E I F S R T N P R -- N L E S F R S S I D V L G R A K R K T L R M T M I V I V F V C W M P 284
181 AF I HLEGHPIITGYOCCVTYHYFFEE IY I IYVNLVGLVAVLWVPL I V L V C G S I Y V E I F S R T N P R -- N L E S F R S S I D V L G R A K R K T L R M T M I V I V F V C W M P 284
182 AF I HLEGHPIITGYOCCVTYHYFFEE IY I IYVNLVGLVAVLWVPL I V L V C G S I Y V E I F S R T N P R -- N L E S F R S S I D V L G R A K R K T L R M T M I V I V F V C W M P 285
180 AF I HLEGHPIITGYOCCVTYHYFFEE IY I IYVNLVGLVAVLWVPL I V L V C G S I Y V E I F S R T N P R -- N L E S F R S S I D V L G R A K R K T L R M T M I V I V F V C W M P 283
204 SF I HVE THPNITGYOCCVTYHYFFEE IY I IYVNLVGLVAVLWVPL I V L V C G S I Y V E I F S R T N P R -- N L E S F R S S I D V L G R A K R K T L R M T M I V I V F V C W M P 307
180 AF I HLEGHPIITGYOCCVTYHYFFEE IY I IYVNLVGLVAVLWVPL I V L V C G S I Y V E I F S R T N P R -- N L E S F R S S I D V L G R A K R K T L R M T M I V I V F V C W M P 283
176 SF I HLEGHPIITGYOCCVTYHYFFEE IY I IYVNLVGLVAVLWVPL I V L V C G S I Y V E I F S R T N P R -- N L E S F R S S I D V L G R A K R K T L R M T M I V I V F V C W M P 279
181 SF I HLEGHPIITGYOCCVTYHYFFEE IY I IYVNLVGLVAVLWVPL I V L V C G S I Y V E I F S R T N P R -- N L E S F R S S I D V L G R A K R K T L R M T M I V I V F V C W M P 284
172 SF I HLEGHPIITGYOCCVTYHYFFEE IY I IYVNLVGLVAVLWVPL I V L V C G S I Y V E I F S R T N P R -- N L E S F R S S I D V L G R A K R K T L R M T M I V I V F V C W M P 275
171 T I V HLE THPNITWYOCVTYHYFFEE IY I IYVNLVGLVAVLWVPL I V L V C G S I Y V E I F S R T N P R -- N L E S F R S S I D V L G R A K R K T L R M T M I V I V F V C W M P 274
172 T I V HLE THPNITWYOCVTYHYFFEE IY I IYVNLVGLVAVLWVPL I V L V C G S I Y V E I F S R T N P R -- N L E S F R S S I D V L G R A K R K T L R M T M I V I V F V C W M P 275
176 S F I I V E E I P E V K G N Y O C V T Y H Y F F E E I Y Q I I Y V N L V G L I M A V P I V S T L V C S A A L F E I I R A N T A -- N D K M R R S G V I L G R A K R T L R M T M I V I V F T C M P 278
177 V V S Y K R I P N I T W E O C I T M D S Y N N H D V T Y S F G T V M V I P F E L I L T V C S S I L A E I C R T R E P -- N A E K F R S N I G F L G A K R T L R M T M I L T F F C M P 280
177 A L L H L E G H P N K N Y O C V M F D A L - S Q F O S I F N M T T C A Y A C P I T F I Y C G A I Y L K I Y R E S K R M K G V E R F R S N D D V L C R A K R T L R M T M I V I V I I C M P 281
176 A L L H L D H P R V K Y O C V I F G A F A N Q O D V L Y N M I T C A Y A C P I E T F I Y C G A I Y L K I Y R E S K R M K G V E R F R S N D D V L C R A K R T L R M T M I V I V I I C M P 231
177 A L L H L G E I P N V K S Y O C V M F D L - S Q F O S I L Y N M T T C A Y A C P I T F I Y C G A I Y L K I Y R E S K R M K G V E R F R S N D D V L C R A K R T L R M T M I V I V I I C M P 281
177 A L L H L G E I P N V K N Y O C V M F D A L - S Q F O S I F N M T T C A Y A C P I T F I Y C G A I Y L K I Y R E S K R M K G V E R F R S N D D V L C R A K R T L R M T M I V I V I I C M P 281
177 A L L H L G E I P N V K Y O C V M F D L - S Q F O S I L Y N M T T C A Y A C P I T F I Y C G A I Y L K I Y R E S K R M K G V E R F R S N D D V L C R A K R T L R M T M I V I V I I C M P 281
173 S F I H L E H P D V K G Y O C V Y G S G L P T V H H E A F L V N I I M V I P V S M I Y C S A A L L E I I K R A N T S -- N D K M R R S G V I L G R A K R T L R M T M I V I V F T C M P 275
175 A Y F H L E E H P K Y S G Y O C V T F H S F P S E H H I V Q I A T C A Y A C P I T F I Y C G S I Y L E I Y R A S Q R I V K G I E R F R S N D D V L S R A K R T L R M T M I V I V L I C M P 280
176 W I W A K I P N Y T S Y E Q C V I F A S F N E F M E L Y Y F G I M A Y L P W I L L T S S I L L K I Y K F R C O D E G T F R S N A G F F G R A K I R T L K M T M I V I V I I C M P 281
175 A Y V H L E E H P K V G Y O C V T F H S F A S E F H K F Y N A N G A Y A C P I T F I Y C G A I Y L E I Y R A S O R I V K G I E R F R S N D D V L S R A K R T L R M T M I V I V I I C M P 280
161 M V E H V E S H P N T W Y O C V Y N S F P S K L E Y S I G F G N M A Y G I P A V I F S T I L G E I Y R S R E F -- S D D R F R S S I G F I G R A K I R T L K M T M I V I V F I C M P 264
175 A Y F H L E S H P T V I D Y O C V L F H A F A E L O E N I C S L T I G M V P V T I F G S I Y L E I Y R A S I R I V K G V E R F R S N D D V L S R A K R T L R M T M I V I V E I C M P 280

PTHNSVGAQAF I HLEEHIPN+TGYOCCVTYH+FEET IYE I IYVNLVGLVAVLWVPL I V L V C G S I Y V E I F S R T N P R + K N L E S F R S S I D V L G R A K R R T L R M T I I V I V F V C W M P
334 Y Y V M S L W W L D K E S A K N V D O R I O K G I F L F A C T N S C A M P V Y G I F N V K R T K T V K L O E -- O R S G G S H I T M - K V -- 404
284 Y Y V M S L W W L D K E S A K N V D O R I O K G I F L F A S T N S C A M P V Y G V E N E K K H T K L L A T T H -- E K S G G S H I T M - R A -- 354
309 Y Y V M S L W W L D O K S A E N V D O R V O K I E I F A C T N S C A M P I Y V N L B K K K P H S R Q M K L E I H R R N S C I G S D G V K S G O S -- S V I R N S -- A K Y T H S E S I R - S S S D -- 414
284 Y Y V M S L W W L D K E S A K N V D O R I O K G I F L F A S T N S C A M P V Y G I F N V K R K T K T V K L O E -- O R S G G S H I T M - R A -- 354
309 Y Y V M S L W W L D K E S A K N V D O R I O K G I F L F A C T N S C A M P V Y G I F N V K R K T K T V K L O E -- O R S G G S H I T M - K V -- 379
285 Y Y V M S L W W L D K E S A K N V D O R I O K G I F L F A S T N S C A M P V Y G I Y N V R K H T - K N H L K G Q -- D K S G G S H I T M - K V -- 354
286 Y Y V M S L W W L D K E S A K N V D O R I O K G I F L F A S T N S C A M P V Y G I Y N V R K K H T A K N H L K V Q -- D K S G G S H I T M - K V -- 356
284 Y Y V M S L W W L D K E S A K N V D O R I O K G I F L F A S T N S C A M P V Y G V E N E K K H T K L L A T T H -- E K S G G S H I T M - R A -- 354
308 Y Y V M S L W W L D K E S A R N V D O R I O K G I F L F A S T N S C A M P V Y G I Y N V R K K I T - K N H L K T Q -- D K S G G S H I T M - K V -- 377
284 Y Y V M S L W W L D K E S A K N V D O R I O K G I F L F A S T N S C A M P V Y G V E N E K K H T K L L A T T H -- E K S G G S H I T M - R A -- 354
280 Y Y V M S L W W L D K E S A K N V D O R I O K G I F L F A C T N S C A M P V Y G I Y N V E K R T A S - P L K Q Q -- E K S G G S H T N V - K V -- 349
285 Y Y V M S L W W L D R N S A Y K I D O R I O K G I F L F A S T N S C A M P V Y G V Y N V D O K H T A K N H L K V Q -- D K S G G S H I T M - K V -- 355
276 Y Y V M S L W W L D R N S A Y K I D O R I O K G I F L F A C T N S C A M P I Y G A F N I D R N K T S A R P T I E T - R -- V T P L S I S L - K L L D -- 349
275 Y Y V M S L W W L D R N S A Y K I D O R I O K G I F L F A C T N S C A M P I Y G A F N I D R N K T S R T P T I E T - R -- V T P L S I S L - K L L D -- 348
276 Y Y V M S L W W L D R N S A Y K I D O R I O K G I F L F A C T N S C A M P I Y G A F N I D R N K T S A R P T I E T - R -- V T P L S I S L - K L L D -- 349
279 Y Y C Y L W W L D K E S I K N L D P A L O K A W L F S C I N S G A P I Y G V F N R W A R A K G T O N G R C R S G O R -- K G S R I P H -- G E -- S -- T E I S A A T I S R A H S N G S D H N G R R -- 378
281 Y I I M A F W W L D K E S A K N I N L K I O K G I E L F A C T N S I N P I Y G V F N I R Q R O T K R E N H I T F -- T E I R E N -- Q L S S N K L S L O K N S N N L -- 367
282 Y I I C M F W W L D Y N T A R S P L L R A L I F A C T N S C A M P I Y G A F N I G R O D N - N A S S S N R A P S V Y O R G C S S - S O I P A S L L -- N L - S H E S N K L P P T R S T N -- 378
232 Y I I C A W W L D Y N T A R S P L R A L I F A C T N S C A M P I Y G I F N I G R O G K - T A N S S N R N T S V Y H R A D S S - S O I P A S T L -- N L - S H E S H K L P P T R A S T N -- 328
282 Y I I C M F W W L D Y N T A R S P L R A L I F A C T N S C A M P I Y G A F N I G R O D N - N A S S S N R A P S V Y O R G C S S - S O I P T S P F -- N L - N H T E S N K I P P T R T S T N -- 378
282 Y I I C M F W W L D Y N T A R S P L L R A L I F A C T N S C A M P I Y G A F N I G R O D N - N A S S S N R A P S V Y O R G C S S - S O I P A S L L -- N L - S H E S N K I P P T R T S T N -- 378
282 Y I I C M F W W L D Y N T A R S P L L R A L I F A C T N S C A M P I Y G A F N I G R O D N - N A S S S N R A P S V Y O R G C S S - S O I P T S P F -- N L - N H T E S N K I P P T R T S T N -- 378
276 Y Y C Y L W W L D K E S I K N L D P A L O K A W L F A C T N S C A M P I Y G A F N I G R O D N - N A S S S N R A P S V Y O R G C S S - S O I P A S L L -- N L - N H T E S N K I P P T R S T N -- 378
281 Y I I A W W L D K A T S V D K Y S A L V S K I F A C T N S C A M P I Y G A F N I G R I G N - N A S T I S N R H T S L Y N R C O S S - N O I P K H L L -- S -- M E I S A A T L N R A S L G S D R G R R -- 373
282 Y Y C L W W L D K E S A K L I D O R I O K G I F L F A S T N S C A M P I Y G I F N I A G K G E K E N S A L A C H N -- S T K I S I S V - S I S S H -- N L - S E G A K T G S T H I -- N O T D T D I S I N 364
281 Y I I C A W W L D K A S S V D E V S S L I R S K I F A C T N S C A M P I Y G A F N I G R I N H N T S T M S N R H T S L Y O R G C S S - N O I P K H L L -- N I - N G S D S K I A T N S I V S O E N N G N K G T N 389
265 Y Y I C M L W W L D A D S A M K I D F R L O S L E I F A C T N S C A M P I Y G A F N I A R P O R G O K G K O O G Y T S -- R S G R G V K I C L I V S H K P P G A O D R P Y V C S S G O G A D R T E -- 369
281 Y I I S A W W L D K A T S V D K I S S L U R E S I F A C T N S C A M P I A S E V F N I B G R V G K - E T S T T S N R H T S L Y N R C O S S - N O I P K H L L -- N S - I C D S V N V K T T T L L -- L E S E S D L P M N G N 385

Y Y V M S L W W L D K E S A K N V D O R I O K G I F L F A C T N S C A M P I Y G V F N I R K R A T K K N -- T T S N R N T S V Y O R G K S G G S H L + M S K L + * + * K + N L + S H S S S N K L P P T R S S T N S + D N G R R + * + *
Consensus

Anopheles_albanus/1-404	
Anopheles_gambiae/1-354	
Aedes_aegypti/1-421	415 VSSV...VL-D.....	421
Anopheles_coluzzii/1-354	
Anopheles_darwini/1-379	
Anopheles_dirus/1-354	
Anopheles_maculipes/1-355	
Anopheles_melas/1-354	
Anopheles_minimus/1-377	
Anopheles_quadrimaculatus/1-354	
Anopheles_sinesis_China_strain/1-349	
Anopheles_stephensi_indo_strain/1-355	
Apis_dorsalis/1-349	
Apis_florea/1-348	
Apis_mellifera/1-349	
Bombus_mori/1-405	379 DSSY...ANQGPQKHMNTINNHHVTNGMY.....	405
Cimex lectularius/1-367	
Glossina_austoni/1-422	379 DKLV.....DSPLAKL-NKAD...TLPMICISCGDSIELTNIQKSCNTNSSGK	422
Glossina_brevipalpis/1-359	329 DKLL.....ESPLAKL-NKEDTH-TLPMICISLAWADG.....	359
Glossina_burkhardi/1-422	379 DKLV.....NSSLAKL-NKAD...TLPMICISCGDSIELTNIQKSCNTNSSGK	422
Glossina_morontiana/1-422	379 DKLV.....DSPLAKL-NKAD...TLPMICISCGDSIELTNIQKSCNTNSSGK	422
Glossina_nipalis/1-422	379 DKLV.....NSSLAKL-NKAD...TLPMICISCGDSIELTNIQKSCNTNSSGK	422
Manduca sexta/1-400	374 DSAF...NTYNGTKHMNTINNHHVSNGMV.....	400
Musca_domestica/1-429	385 HKINETTTTAVGCTEISNKVDEVS-GSPVICINCVDSELSNRQKS.....	429
Psyllidius_furmenus/1-357	
Sarcophaga_cristipalpis/1-429	389 LNKSEKQKD...NDATTQVSMV-SPPMICISCGDSIEMANLQOKT.....	429
Schistocerca_gregaria/1-371	370 AR.....	371
Stomoxys_calitrans/1-421	388 HKIKS.....AELTKVVDVT-DSPVICINCVDSELSNRQKS.....	421

Consensus

DKLVE+++T+NSPLAKLNYKADNRVTLPLMICISCGDSIELTNIQKSCNTNSSGK

12. REFERENCIAS

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, K.. (2008). Molecular Biology Of The Cell. USA: GarlandS cienc.
- Altstein, M. and Nässel D. (2010). Neuropeptide Signaling in Insects. Neuropeptide systems as targets for parasite and pest control (155-164). USA: Springer US.
- Alvarado, A., Perales, G., Tello, A., Encarnación, S., Conde, R., Martinez, A., Moran, K. & Lanz, H. (2016). Infection with *Plasmodium berghei* ookinetes alters protein expression in the brain of *Anopheles albimanus* mosquitoes. *Parasit Vectors*, 9, 542.
- Bil, M., Timmermans, I., Verlinden, H., & Huybrechts, R. (2016). Characterization of the adipokinetic hormone receptor of the anautogenous flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*. *Journal of Insect Physiology*, 89, 52–59.
- Bogerd, J., Kooiman, F., Pijnenburg, M., Hekking, L., Oudejans, R., y Van der Horst, D. (1995). Molecular Cloning of Three Distinct cDNAs, Each Encoding a Different Adipokinetic Hormone Precursor, of the Migratory Locust, *Locusta migratoria*. *The Journal Biological Chemistry*, 270, 23038–23043
- Bown, D.N. y M. Nelson. 1993. Anopheline vectors of human plasmodia in Parasitic Protozoa, Vol. 5. J.P. Kreier (ed.), 2a. edición. Academic Press Inc., Nueva York.
- Caer, J., Peaters, L., Janssen, T., De haes, W., Gade, G., & Schoofs, L. (2012). Structure-activity studies of *Drosophila* adipokinetic hormone (AKH) by a cellular expression system of dipteran AKH receptors.. *General and Comparative Endocrinology*, 177(3), 332-337.

Casas Martínez, M., A. Orozco Bonilla y J. G. Bond Compeán. 2012. Diversidad y distribución geográfica de las especies de culícidos de importancia médica en la región centro–occidental de México. Instituto Nacional de Salud Pública. Centro Regional de Investigación en Salud Pública. Informe final SNIB-CONABIO, proyecto No. FE009. México, D.F

Casas, M., y Bonilla, A., (2006). Diversidad y distribución geográfica del género *Anopheles* en el sur de México. CONABIO. *Biodiversitas*, 67. 12-15.

Clements, A. (1992). *Development, nutrition and reproduction*. Reino Unido: Chapman and Hall. Pp. 206-2015.

Dimopoulos, G. (2003). *Insect immunity and its implication in mosquito–malaria interactions*. Blackwell Publishing, 5. 3-14.

Fredriksson, R., Lagerstrom, M., Lundin, L., & Schioth, H. 2003. The G-protein coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol. Pharmacol.* 63 1256–1272.

Gade, G. & Hoffman, K. (2005). Neuropeptides regulating development and reproduction in insects. *Physiological Entomology*, 30, 103–121.

Gäde, G. (1990). The adipokinetic hormone/red pigment-concentrating hormone peptide family: structures, interrelationships and functions. *Insect Physiology*, 36, 1-12.

Gäde, G., and Auerswald, L. (2003). Mode of action of neuropeptides from the adipokinetic hormone family. *General and Comparative Endocrinology*, 132, 10-20.

Gállego, J. (2006). Manual de parasitología. Morfología y biología de los parásitos de interés sanitario. España: Ediciones de la Universitat de Barcelona.

Gillott, C., 2005. Entomology, tercera edición. Springer, New York, NY, 831 pp.

Goldsworthy, G., Opoku-Ware, K., y Mullen, L. (2002). Adipokinetic hormone enhances laminarin and bacterial lipopolysaccharide-induced activation of the prophenoloxidase cascade in the African migratory locust, *Locusta migratoria*. *Insect Physiology*, 48, 601-608.

Gullan, P. y Cranston, P. (2010). The insects an outline of entomology. Malaysia: Wiley-Blackwell. Pp. 60-79.

Guzmán, A. & García, J. (2018). Receptores acoplados a proteínas G y sus múltiples facetas. *Mensaje Bioquímico*, 42, 118-129.

Ha, S., Kataoka, H., Suzuki, A., Kim, B., Kim, H., Hwang, S., Kong, J., 2000. Cloning and sequence analysis of cDNA for diuretic hormone receptor from the *Bombyx mori*. *Mol. Cells* 10, 13–17.

Hartenstein, V. (2006). The neuroendocrine system of invertebrates: a developmental and evolutionary perspective. *Journal of Endocrinology*, 190, 555–570.

Hekimi, S., y O'shea, M. (1989). Biosynthesis of adipokinetic hormones (AKHs): further characterization of precursors and identification of novel products of processing. *The Journal of Neuroscience*, 9, 996-1003.

Hernández, S., Sánchez, M., Brito, K., Herrera, A., Ons, S. & Noriega, F. (2017). Allatotropin: A pleiotropic neuropeptide that elicits mosquito immune

responses. PLoS One, 12, 1-21.

Kaufmann, C., Merzendorfer, H., y Gäde, G. (2009). The adipokinetic hormone system in Culicinae (Diptera: Culicidae): Molecular identification and characterization of two adipokinetic hormone (AKH) precursors from *Aedes aegypti* and *Culex pipiens* and two putative AKH receptor variants from *A. aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 39, 770-781

League, G., Estévez, T., Yan, Y., García, A. & Hillyer, J. (2017). *Anopheles gambiae* larvae mount stronger immune responses against bacterial infection than adults: evidence of adaptive decoupling in mosquitoes. *Parasites & Vectors*, 10(367), 1-19.

Li, S., Hauser, F., Skadborg, S., Nielsen, S., Kirketerp, N. & Grimmelikhuijze, C. (2016). Adipokinetic hormones and their G protein-coupled receptors emerged in Lophotrochozoa. *Nature Scientific Reports*, 6:32789, 1-13.

Moreno, M., Vargas, V., Ramirez, I., Hernández, G. & Lanz, M. (2015). Bacterial Exposure at the Larval Stage Induced Sexual Immune Dimorphism and Priming in Adult *Aedes aegypti* Mosquitoes. *PLoS ONE*, 10(7), 1-19.

Mugumbate, G., Jackson, G. & Van der Spoel, D. (2010). Open conformation of adipokinetic hormone receptor from the malaria mosquito facilitates hormone binding. *PEPTIDES*, 32, 553–559.

Nässel, D. (2002). Neuropeptides in the nervous system of *Drosophila* and other insects: multiple roles as neuromodulators and neurohormones. *Progress in Neurobiology*, 61, 1-84.

Nouzova, M., Brockhoff, A., Mayoral, J., Goodwin, M., Meyerhof, W. & Noriega, F. (2012). Functional characterization of an allatotropin receptor expressed in the

corpora allata of mosquitoes. *Peptides* 34, 201–208.

Park, Y., Kim, Y. & Adams, M. 2002. Identification of G protein-coupled receptors for *Drosophila* PRXamide peptides, CCAP, corazonin, and AKH supports a theory of ligand-receptor coevolution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 11423–11428.

Pietri, J., Pietri, E., Potts, R., Riehle, M. & Luckhart, S. (2015). Plasmodium falciparum suppresses the host immune response by inducing the synthesis of insulin-like peptides (ILPs) in the mosquito Anopheles stephensi. *Developmental And Comparative Immunology*, 53, 134-144.

Rayne, R., & O'shea M. (1994). Reconstitution of adipokinetic hormone biosynthesis in vitro indicates steps in prohormone processing. *European Journal Biochemistry*, 219, 781-789.

Reyes, G. & Sánchez, R. (2014). Manual Técnico de Entomología para el Programa de Paludismo. Septiembre 26, 2019, de Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades Sitio web: http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/vectores/descargas/pdf/manual_entomologia_paludismo.pdf

Riehle, M. & Brown, M. 1999. Insulin stimulates ecdysteroid production through a conserved signaling cascade in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 29, 855–860.

Rolff, J., y Reynolds, S. (2009). *Insect infection and immunity. Evolution, ecology and mechanisms.* USA: Oxford University Press.

Ruppert, E., Barnes, R., y Fox, R. (2004). *Invertebrate zoology. A functional evolutionary approach.* Canada: Brooks/Cole Cengage learning. Pp. 529-

532.

- Shi Y., Huang, H., Deng, X., He, X., Yang, J., Yang, H., Shi, L., Mei, L., Gao, J. & Zhou, N. (2011). Identification and functional characterization of two orphan G-protein-coupled receptors for adipokinetic hormones from silkworm *Bombyx mori*. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(49), 390-402.
- Sim, S., Jupatanakul, N., y Dimopoulos, G. (2014). Mosquito Immunity against Arboviruses. *Viruses Open Access Journal*, 6, 4479-4504.
- Smith, R., Vega, J., y Jacobs, M. (2014). The Plasmodium bottleneck: malaria parasite losses in the mosquito vector, *SciELO-Parasitology*, 109, 644–661.
- Triplehorn, C. & Johnson, N. (2005). *Study Of Insects*. USA: Thomson Brooks/Cole.
- Van Der Horst, D. (2003). Insect adipokinetic hormones: release and integration of flight energy metabolism. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 136, 217–226.
- Veelaert D, Schoofs L & De Loof A. (1998). Peptidergic Control of the Corpus Cardiacum-Corpora Allata Complex of *Locusts*. *International Review of Cytology*, 182, 249–302.
- Verlinden, H., Vleugels, R., Zels, S., Dillen, S., Lenaerts, C., Crabbé, K., Spit, J. & Vanden Broeck, J. (2014). Receptors for Neuronal or Endocrine Signalling Molecules as Potential Targets for the Control of Insect Pests. *Advances in Insect Physiology*., Volume 46, pp.1-50.
- Wiesner, A., Losen, S., Kopáček, P., Weise, C. & Gots, P. (1997). Isolated Apolipoprotein III from *Galleria mellonella* Stimulates the Immune Reactions of This Insect. *Journal Insect Physiology*, 43, 383-391.

World Health Organization. (2016). World Malaria Report 2016. Octubre 10, 2017, de WHO Sitio web: <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2016/report/es/>.

World Health Organization. (2018). World Malaria Report. Septiembre 25, 2019, de World Health Organization Sitio web: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/275867/9789241565653-eng.pdf?ua=1>.

Yamanaka, N., Yamamoto, S., Zitnan, D., Watanabe, K., Kawada, T., Satake, H., Kaneko, Y., Hiruma, K., Tanaka, Y., Shinoda, T. & Kataoka, H. 2008. Neuropeptide receptor transcriptome reveals unidentified neuroendocrine pathways. PLoS One 3, 30-48.

Yapici, N., Kim, Y., Ribeiro, C. & Dickson, B. 2008. A receptor that mediates the postmating switch in *Drosophila* reproductive behavior. Nature 451, 33–37.





Ziegler, R., Isoe, J., Moore, W., Riehle, M. & Wells, M. (2011). The putative AKH receptor of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, and its expression. Journal of Insects Science, 11(40), 1-20.

Ziegler, R., Jasensky, R. & Morimoto, H. 1995. (1995). Characterization of the adipokinetic hormone receptor from the fat body of *Manduca sexta*. Regulatory Peptides, 53(7), 329-38.

DR. VICTOR BARBA LÓPEZ
COORDINADOR DEL POSGRADO EN CIENCIAS
PRESENTE

Atendiendo a la solicitud para emitir DICTAMEN sobre la revisión de la TESIS titulada "Búsqueda y expresión de un receptor hipotético de la hormona adipocinética en *Anopheles albimanus*" que presenta la alumna Grecia Gabriela Hernández Díaz (10009549) para obtener el título de **Maestro en Ciencias**.

Nos permitimos informarle que nuestro voto es:

NOMBRE	DICTAMEN	FIRMA
Dr. Alejandro Alvarado Delgado CISEI-INSP	Aprobado	
Dra. Verónica Mercedes Narváez Padilla CIDC-UAEM	Aprobado	
Dra. María Angélica Santana Calderón CIDC-UAEM	Aprobado	
Dr. Cuauhtémoc Juan Humberto Lanz Mendoza CISEI-INSP	Aprobado	
Dr. Rodrigo Said Razo Hernández CIDC-UAEM	Aprobado	