



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**BIOLOGÍA EVOLUTIVA**

**PREPARACIÓN Y ESPECIFICIDAD INMUNOLÓGICA CONTRA  
BACTERIAS EN EL MOSQUITO *Aedes aegypti* (DÍPTERA:  
CULICIDAE)**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**VALERIA VARGAS PONCE DE LEÓN**

**TUTOR PRINCIPAL:**

DR. HUMBERTO LANZ MENDOZA  
FACULTAD DE MEDICINA

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:**

DRA. INGEBORG BECKER FAUSER  
FACULTAD DE MEDICINA

DR. ALEJANDRO CÓRDOBA AGUILAR  
INSTITUTO DE ECOLOGÍA

**MÉXICO, D. F., MARZO 2014**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**BIOLOGÍA EVOLUTIVA**

**PREPARACIÓN Y ESPECIFICIDAD INMUNOLÓGICA CONTRA  
BACTERIAS EN EL MOSQUITO *Aedes aegypti* (DÍPTERA:  
CULICIDAE)**

## **TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**VALERIA VARGAS PONCE DE LEÓN**

**TUTOR PRINCIPAL:**

DR. HUMBERTO LANZ MENDOZA  
FACULTAD DE MEDICINA

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:**

DRA. INGEBORG BECKER FAUSER  
FACULTAD DE MEDICINA

DR. ALEJANDRO CÓRDOBA AGUILAR  
INSTITUTO DE ECOLOGÍA

**MÉXICO, D. F., MARZO 2014**

**Dr. Isidro Ávila Martínez**  
**Director General de Administración Escolar, UNAM**  
**Presente**

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 13 de enero de 2014, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **VARGAS PONCE DE LEÓN VALERIA** con número de cuenta **512026893**, con la tesis titulada **“PREPARACIÓN Y ESPECIFICIDAD INMUNOLÓGICA CONTRA BACTERIAS EN EL MOSQUITO *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)”**, realizada bajo la dirección del **DR. HUMBERTO LANZ MENDOZA**:

Presidente: DRA. INGEBORG DOROTHEA BECKER FAUSER  
Vocal: DR. RAÚL CUEVA DEL CASTILLO MENDOZA  
Secretario: DR. CARLOS RAFAEL CORDERO MACEDO  
Suplente: DR. JULIO CÉSAR CARRERO SÁNCHEZ  
Suplente: DR. ALEJANDRO CÓRDOBA AGUILAR

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”**  
Cd. Universitaria, D.F., a 05 de marzo de 2014

*M. del Coro Arizme*

**DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA**  
**COORDINADORA DEL PROGRAMA**

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Posgrado de Ciencias Biológicas, Facultad de Medicina, UNAM.

A CONACYT (CVU/Becario No. 399721/269766)

Al Dr. Humberto Lanz por la dirección y apoyo académico para la realización de esta tesis, gracias por sus acertados consejos en los experimentos y la interpretación de resultados.

A la Dra. Ingeborg Becker y Dr. Alejandro Córdoba por haber aceptado ser parte del Comité tutorial. Muchas gracias por sus sugerencias que hicieron crecer enormemente este trabajo.

## **AGRADECIMIENTOS PERSONALES**

A mi amigo y asesor de tesis el Dr. Miguel A. Moreno García, muchas gracias por todo el apoyo académico y personal durante todo este tiempo. Gracias por confiar en mí y principalmente por tu amistad.

A los miembros del Jurado de examen, Dr. Raúl Cueva, Dr. Carlos Cordero y Dr. Julio Carrero muchas gracias por el tiempo invertido en la revisión de este trabajo.

A los investigadores del Instituto Nacional de Salud Pública (CISEI), Dr. Alfredo Lagunas Martínez por su paciencia, consejos y enseñanza para el desarrollo de los resultados de esta tesis. A la Dra. María Elena Velázquez Meza por los resultados obtenidos de la microbiota del mosquito.

Al grupo de Virus Dengue: Dr. Renaud Conde, Dra. Martha Argüello y Dr. Javier Izquierdo por compartir sus conocimientos, sugerencias y buenos ratos fuera del laboratorio.

A mis amigos y compañeros del L3PA: Marianita, Inci, Nalú, Erika, Lupita, Alex, Faby, Javier y Benito por haberme brindado su amistad y por todo el apoyo laboral durante este trabajo. En particular quiero agradecer a Lolita Méndez por su apoyo administrativo, personal y cariño inigualable que me ha brindado.

Al personal del laboratorio de la Dra. Ana I. Burguete, principalmente a Gaby Martínez y Citlalli Orbe por las facilidades otorgadas para el material de laboratorio y por su amistad.

A mis amigos de la UAEM que estuvieron cerca de mi durante este tiempo: Yokiko, Jimena, Marina, Silvia, Jaime, Pacheco, Leonis y Toño. Los quiero mucho chicos.

## **DEDICATORIA**

### **A mis padres**

Gina Ponce de León y Alberto Vargas por todo el amor incondicional y apoyo que me han brindado durante todo este tiempo. Los amo.

### **A mi hermana**

Victoria Vargas por todo tu apoyo, cariño y comprensión, pero principalmente por ser mi mejor amiga.

### **A mi amor**

Miguel Talavera por compartir tu vida conmigo, por tu gran amor, paciencia y apoyo que me brindas. Amarte profundamente me da fuerza, pero sentirme amada profundamente por ti me da valor...Te amo mi amor.

## ÍNDICE

RESUMEN	i
ABSTRACT	iii
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	2
Respuesta inmune en insectos	2
Péptidos antimicrobianos	4
Preparación inmunológica en insectos	9
Especie en estudio: <i>Aedes aegypti</i>	11
Respuesta inmune <i>A. aegypti</i>	13
JUSTIFICACIÓN	15
HIPÓTESIS	16
Predicciones	16
OBJETIVO GENERAL	16
Objetivos particulares	16
MATERIAL Y MÉTODOS	17
Crianza de mosquitos de <i>A. aegypti</i>	17
Crecimiento y cuantificación de bacterias	17
Inyección de los mosquitos	18
DISEÑO EXPERIMENTAL	18
Determinación de dosis de infección de bacterias	19
Análisis de supervivencia de <i>A. aegypti</i>	19
Cuantificación de la expresión de PAMs mediante qPCR	20
Análisis estadísticos	22
RESULTADOS	23
PREPARACIÓN Y ESPECIFICIDAD INMUNOLÓGICA DE <i>A. aegypti</i>	23
Análisis de supervivencia	23
Preparación y especificada inmunológica en <i>A. aegypti</i> contra <i>E. coli</i>	26
Preparación y especificada inmunológica en <i>A. aegypti</i> contra <i>S. aureus</i>	31

<b>DISCUSIÓN</b>	<b>37</b>
<b>CONCLUSIÓN</b>	<b>47</b>
<b>ANEXO</b>	<b>48</b>
<b>LITERATURA CITADA</b>	<b>49</b>

## LISTA DE TABLAS.

**Tabla 1:** Clasificación de los principales PAMs en Dípteros.

**Tabla 2:** Cantidades de alimento dependiente del estado larval.

**Tabla 3:** Secuencia de oligonucleótidos derivados PAMs que se utilizaron como marcadores de la respuesta inmune de *A. aegypti*.

**Tabla 4:** Distintas combinaciones en las curvas de supervivencia en infecciones bacterianas en el mosquito.

## LISTA DE FIGURAS.

- Figura 1:** A) *Aedes aegypti*, hembras adultas. B) Ciclo de vida de *A. aegypti*.
- Figura 2:** Diseño experimental y dosis de infección para evaluar la preparación y grado de especificidad inmunológicas de *A. aegypti*.
- Figura 3:** Análisis de supervivencia “Log-rank  $X^2$ ” de *A. aegypti* con RPMI (que no tuvieron la dosis de la preparación inmunológica) e infectados posteriormente en *E. coli* y *S. aureus*.
- Figura 4:** Análisis de supervivencia “Log-rank  $X^2$ ” de mosquito *A. aegypti* después del 2º Reto (Día 0). Evidencia de preparación inmunológica contra E.COLI-E.COLI (A) y S.AUREUS-S.AUREUS (B). Especificidad inmunológica contra E.COLI-S.AUREUS (C) y S.AUREUS-E.COLI (D).
- Figura 5:** Expresión relativa de PAMs en *A. aegypti* durante infecciones simples con *E. coli* antes y después de la preparación inmunológica y 2º Reto.
- Figura 6:** Expresión relativa de PAMs en *A. aegypti* durante infecciones simples y mixtas con *E. coli* antes y después de la preparación inmunológica y 2º Reto.
- Figura 7:** Expresión relativa de PAMs en *A. aegypti* durante infecciones simples y con *S. aureus* antes y después de la preparación inmunológica y 2º Reto.
- Figura 8:** Expresión relativa de PAMs en *A. aegypti* durante infecciones simples y mixtas con *S. aureus* antes y después de la preparación inmunológica y 2º Reto.
- Figura 9:** Expresión relativa de PAMs en *A. aegypti* entre diferentes infecciones mixtas con *E. coli* y *S. aureus* antes y después de la preparación inmunológica y 2º Reto.
- Figura 10:** Modelo de preparación inmunológica con cierto grado de especificidad inducida por *E. coli* y no inducido por preparación inmunológica por *S. aureus* en *A. aegypti*.

## RESUMEN

Recientes estudios han propuesto a la denominada “preparación inmunológica” (en inglés, immune priming) en invertebrados como un análogo a la respuesta inmune de memoria de los vertebrados, ya que se ha observado que algunos insectos tienen la capacidad de intensificar o mejorar la eficacia de la respuesta inmune después de un contacto previo con el activador de ésta; este fenómeno puede ser rápido y/o específico, que a su vez se vuelve más eficiente para eliminar al patógeno. Sin embargo, la preparación inmunológica ha sido criticada debido a la falta de conocimiento sobre los mecanismos específicos de defensa contra patógenos en invertebrados. Se ha propuesto a los péptidos antimicrobianos (PAMs) como marcadores de la respuesta inmune capaces de reconocer a patógenos específicos e intensificar la respuesta inmune en contra de patógenos, debido a sus características como son: diversidad estructural, actividad antimicrobiana, regulación por vías de señalización y permanecer más de tres semanas en la hemolinfa; se sugiere que están estrechamente relacionados con el grado de especificidad en la preparación inmunológica de los insectos.

En este trabajo se evaluó el fenómeno de preparación inmunológica contra infecciones mixtas bacterianas en términos de supervivencia en mosquitos hembras de *Aedes aegypti*, debido a que es el principal vector del virus Dengue. Además, se desconoce cómo es que se comporta la respuesta inmune en presencia de infecciones mixtas bacterianas, así como el grado de especificidad de la preparación inmunológica.

Se propone como hipótesis la existencia de preparación inmunológica específica contra bacterias en el mosquito *A. aegypti*. Los objetivos de este trabajo son 1) evidenciar la preparación y el grado de especificidad inmunológica de *A. aegypti* durante infecciones bacterianas mixtas con *E. coli* y *Staphylococcus aureus*, utilizando como marcadores de la respuesta inmune a los PAMs; y 2) evaluar si existe un efecto sobre la supervivencia de *A. aegypti* durante estas infecciones mixtas.

Los resultados mostraron, una menor tasa de mortalidad en los individuos que tuvieron un contacto previo con *E. coli* en comparación con los individuos que no fueron previamente expuestos con el patógeno (RPMI); sin embargo, los mosquitos que fueron infectados con *S. aureus*, no fueron capaces de sobrevivir a una segunda reinfección. Además, los mosquitos que fueron infectados con una dosis baja de *E. coli*, mostraron un mayor grado de supervivencia cuando fueron reinfectados con una dosis alta de *E. coli* y *S. aureus*, en comparación con los individuos que no tuvieron un contacto previo con *E. coli*. En dosis baja, *E. coli* puede inducir la preparación inmunológica con cierto grado de especificidad, mientras que *S. aureus* es incapaz de generar preparación, ni especificidad inmunológica. El análisis de expresión de PAMs mostró activación de la respuesta inmune de *A. aegypti* ante dosis bajas de infección para ambas bacterias, sin embargo, hubo mayor expresión de péptidos en *S. aureus*. En infecciones simples en dosis alta con *E. coli*, se incrementa la expresión de PAMs en la reinfección en comparación con el primer reto, mientras que en la infección con *S. aureus* se suprime la respuesta inmune; ante infecciones mixtas, la expresión de transcritos es significativamente mayor que en infecciones simples.

Se concluye que el fenómeno de preparación inmunológica en *A. aegypti* dependerá del tipo de patógeno con el que fue activada la respuesta inmune. Se sugiere que los mosquitos de *A. aegypti* se encuentran más familiarizados con bacterias Gram-negativas, debido a que la microbiota del mosquito está mayormente compuesta por este tipo de bacterias. Además, se demostró cierto grado de especificidad inmunológica en mosquitos infectados previamente con *E. coli*, dado que protege tanto para sí misma como para *S. aureus*.

## ABSTRACT

Insects have the ability to enhance or intensify the effectiveness of the immune response after a previous contact with an elicitor of the immune response. This phenomenon is called immune priming and can be analogous to the immune memory of vertebrates. However, immune priming has been criticized because of the lack of specificity. Antimicrobial peptides (AMP's) are molecules that, probably, are produced differentially and could enhance immune response against pathogens. AMP's have important characteristics, including structural diversity, antimicrobial activity, signaling pathways regulation, and they can be found in the hemolymph several weeks post-infection. For these reasons, we propose that AMP's could be participating in the immune and specific priming in insects.

In this study we used female *Aedes aegypti* mosquitoes, the main vector of Dengue virus. We have found immune priming against *Escherichia coli* (in terms of survival). However, it is unknown how immune response develops in presence of mixed bacterial infections and the specificity of the response. Our goals are to demonstrate the immune specific priming in *A. aegypti* against mixed bacterial infections with *E. coli* and *Staphylococcus aureus* (1) using AMP's transcripts as immune response markers, and (2) if there is an effect on terms of survival of *A. aegypti* during mixed infections.

Survival analysis showed a lower mortality rate in individuals who had prior contact with *E. coli* compared to individuals who were not challenged with the same pathogen (RPMI). However, mosquitoes infected with *S.aureus*, were not able to survive a second reinfection. In addition, mosquitoes that were infected with low doses of *E. coli*, showed a higher survival rate when they were reinfected with lethal doses of *E. coli* and *S. aureus*, compared with individuals who had no prior challenge with *E. coli*. In low doses, *E. coli* may induce immune priming with some specificity, whereas *S. aureus* is incapable of eliciting priming. We also observed AMP's activation of the immune response of *A. aegypti* to low doses of infection for both bacteria, but there was greater expression of AMP's on *S. aureus*. In simple

infections with high doses of *E. coli*, the expression of AMP's is increased compared with the first challenge, while *S. aureus* infection the immune response is suppressed. Furthermore, in mixed infections the expression of transcripts is significantly greater than in simple infections.

We conclude that the phenomenon of immune priming in *A. aegypti* depends on the kind of pathogen which activates immune responses. It is suggested that *A. aegypti* mosquitoes are more related with Gram-negative bacteria, because mosquito's microbiota is mostly comprised of these bacteria. In addition, some degree of immune specificity was demonstrated in mosquitoes previously infected with *E. coli*, since it protects both for itself and for *S. aureus*.

## INTRODUCCIÓN

Hasta hace unos años se creía que los insectos no presentaban memoria inmunológica. Sin embargo, estudios recientes han demostrado una mejora de la respuesta inmune, después de un contacto previo con el patógeno (Pham *et al.*, 2007). Este fenómeno es análogo a la respuesta inmune adquirida en vertebrados. A esta inmunidad adquirida en invertebrados, se le ha dado el nombre de “immunological priming” o “preparación inmunológica”; que se define como la capacidad de un individuo de intensificar o mejorar la eficacia de la respuesta inmune después de un contacto previo con el activador de la respuesta inmune (Pham y Schneider, 2008), con la finalidad de controlar los efectos negativos causados por el patógeno.

Por otro lado, la efectividad de la respuesta inmune no solo se traduce en la rapidez e intensidad para controlar la infección, sino también con el grado de especificidad en el reconocimiento del patógeno después de un contacto previo. A esto se le llama “especificidad inmunológica”. La relevancia de que un insecto tenga cierto grado de especificidad en la preparación inmunológica, está relacionada con la alta probabilidad de reencontrarse con un mismo patógeno, ya que algunos grupos de insectos, como *A. aegypti*, tienen una limitada capacidad de dispersión. Por otro lado, el reducido costo energético asociado al grado de especificidad de la respuesta hacia patógenos puede favorecer el reconocimiento y eliminación rápida del patógeno, sin necesidad de mantener la respuesta inmune prendida (Little y Kraaijeveld, 2004); es decir, el costo energético de la especificidad inmunológica es menor en comparación con una respuesta inmune que estuviese continuamente activada (Pham y Schneider, 2008).

El término de grado de especificidad inmunológica en insectos ha sido fuertemente criticada (Klein, 1997), debido a la falta de conocimiento sobre los mecanismos de reconocimiento y activación específica de la respuesta inmune en los invertebrados. De aquí, la importancia de realizar estudios sobre marcadores de la

respuesta inmune de insectos capaces de controlar diferencialmente a patógenos; como es el caso de los péptidos antimicrobianos (PAMs).

Los PAMs son moléculas efectoras con un amplio espectro de actividad antimicrobiana (Haine *et al.*, 2008), que presentan diversidad estructural (Bulet *et al.*, 1999; Bulet y Stocklin, 2005), capacidad regulatoria de las vías de señalización específica (Otvos, 2000) y pueden permanecer más de tres semana en la hemolinfa de los insectos (Schmid-Hempel, 2005). Por esto se consideran a los PAMs como marcadores de la respuesta inmune capaces de jugar un papel importante en la preparación inmunológica específica en los insectos (Pham *et al.*, 2007; Rodríguez *et al.*, 2010).

Actualmente existen pocos estudios sobre la preparación inmunológica con cierto grado de especificidad en insectos. Entre estos se encuentran estudios en *Drosophila melanogaster* (Pham *et al.*, 2007); *Anopheles gambiae* (Rodríguez *et al.*, 2010); *An. albimanus* (Contreras-Garduño *et al.*, en revisión) y *A. aegypti* (Moreno-García *et al.*, 2010; Moreno-García, 2011). Estos estudios han demostrado una mayor eficacia de la respuesta inmune de los insectos contra reinfecciones con un mismo patógeno, pero no contra infecciones mixtas con diferentes patógenos. Es importante seguir desarrollando estudios relacionados con la respuesta inmune de los insectos, debido a que las presiones selectivas que constantemente ejercen los patógenos, pudieran reflejar las estrategias de la respuesta inmune de los insectos.

## **ANTECEDENTES**

### **Respuesta inmune en insectos**

Los mecanismos de defensa de los insectos en contra de los patógenos consisten en tres grupos principales: barreras estructurales, respuesta celular y respuesta humoral. La primera línea de defensa está representada por barreras

estructurales, las cuales incluyen el exoesqueleto y las células epiteliales; estas últimas no solo representan una barrera física, sino también produce moléculas antimicrobianas. El exoesqueleto protege los órganos internos de los insectos y la hemolinfa de la exposición directa de patógenos del ambiente (Hillyer, 2010). Las células epiteliales recubren diversos órganos que protegen al producir moléculas tóxicas que se encargan de eliminar al patógeno (Hillyer, 2010; Schmid-Hempel, 2005). Si un patógeno logra atravesar las barreras estructurales del insecto, se activa la respuesta celular y humoral. La respuesta celular está dada por los hemocitos (células de la respuesta inmune encargadas de reconocer y combatir al patógeno). Su función principal es la fagocitosis de los patógenos y células muertas (Nelson *et al.*, 1999; Asha *et al.*, 2003). En el mosquito *Anopheles albimanus* se han encontrado tres tipos de hemocitos diferentes, prohemocitos, plasmotocitos y células granulares (Hernández-Martínez *et al.*, 2002). Castillo y colaboradores (2006) reportaron que *An. gambiae* y *A. aegypti* presentan dos tipos diferentes de hemocitos diferenciados, con funciones diferentes, los granulocitos y oenocitoides. Los granulocitos, son células muy abundantes, fuertemente adhesivas y con gran capacidad fagocítica. Los oenocitoides son células poco abundantes, no adhesivas, pero que expresan constitutivamente la actividad de la cascada de fenoloxidasa (FO). Se ha reportado tanto para *A. aegypti* y *An. gambiae* el proceso de nodulación y encapsulación de patógenos por parte de la unión de hemocitos que producen melanina, pero sin la necesidad de formar la capa melanótica (Hillyer y Christensen, 2002; Castillo *et al.*, 2006); no obstante *An. albimanus* mostró la encapsulación de bacterias mediante la melanización sin la unión de células de hemocitos (Hernández-Martínez *et al.*, 2002). Por último, el mecanismo de defensa humoral induce la síntesis de péptidos antimicrobianos (PAMs) y lisoenzimas; así como la producción de intermediarios de oxígeno y nitrógeno (óxido nítrico y especies reactivas de oxígeno) y la formación de melanina en la cascada de la FO (Hyller y Christensen, 2002; Castillo *et al.*, 2006; Hillyer, 2010). Los mecanismos de defensa humorales y celulares son activados por receptores de reconocimientos de patógenos (PRRs), capaces de unirse con cierto grado de especificidad a los patrones asociados a la membrana de

patógenos (PAMPs), tales como los lipolisacáridos (LPS) y peptidoglicanos (PGLC) (Janeway y Medzhitov, 2002). Ambos receptores pueden estar estrechamente relacionados con el grado de especificidad inmunológica de los insectos, debido al reconocimiento específico de los patógenos que a su vez activan las diferentes vías de señalización de la respuesta inmune.

La respuesta inmune está coordinada por las vías de señalización de los insectos que son Toll, IMD (Immune Deficiency; siglas en ingles) y JAK/STAT (Janus kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription). Hasta ahora se sabe que las vías de señalización de Toll e IMD son las responsables de inducir la síntesis de los PAMs. La mayoría de los componentes de estas vías de señalización y regulación son evolutivamente conservados en dípteros (Hillyer, 2010).

### **Péptidos antimicrobianos**

Los péptidos antimicrobianos (PAMs) son moléculas efectoras del sistema inmune, cuyas familias se encuentran en casi todos los organismos, desde bacterias hasta mamíferos. Generalmente, contienen menos de 150-200 aminoácidos y pueden clasificarse según su estructura secundaria y composición (Bulet y Stocklin, 2005).

Los PAMs se caracterizan por su rápida síntesis y secreción hacia la hemolinfa a las 24 horas post-infección (Bartholomay *et al.*, 2004) y porque sus genes se encuentran principalmente activos en el cuerpo graso y los hemocitos (Hillyer, 2010). Frecuentemente los PAMs adoptan estructuras anfipáticas con extremos hidrofóbicos que encaran otros hidrofílicos, lo que les confiere propiedades para interaccionar con la membrana del patógeno (Bulet y Stocklin, 2005). Actualmente, se han reportado más de 170 isoformas diferentes de PAMs en insectos (Bulet *et al.*, 1999) presentando un amplio espectro antimicrobiano y múltiples mecanismos de acción, así como actividad antiviral, antifúngica y antibacteriana (Téllez y Castaño, 2009). Esta característica puede estar relacionada con la especificidad inmunológica hacia grupos generales de patógenos (e.j. Gram-negativos, Gram-

positivos, hongos, etc). Los PAMs presentan mecanismos de eliminación mediante la desintegración de la membrana plasmática de los patógenos; mientras que otros interfieren en la síntesis de moléculas vitales (Otvos, 2000). Se ha reportado que los PAMs pueden permanecer en la hemolinfa por más de tres semanas (Schmid-Hempel, 2005), lo cual es conveniente en caso de un posible reencuentro con el patógeno. Sin embargo, la presencia de PAMs en la hemolinfa no es suficiente para combatir reinfecciones agudas con el mismo patógeno u otro; por lo tanto es necesario el incremento de la expresión de transcritos para producir mayor número de péptidos activos en la hemolinfa (Bartholomay *et al.*, 2004).

La inducción del proceso de síntesis de los PAMs es similar entre insectos. Se ha estudiado particularmente en la mosca de la fruta *D. melanogaster*, donde se ha demostrado que los genes que producen PAMs son regulados con cierto grado de especificidad por las vías de señalización de Toll e IMD (Hoffmann y Reichhart, 2002). La vía Toll, en *D. melanogaster*, específicamente se activa contra bacterias Gram-positivas y hongos, de manera que permite la transcripción de péptidos antifúngicos como la Drosomicina; mientras que la vía IMD activa la transcripción de Drosocinas y Diptericina, que son efectivos contra bacterias Gram-negativas.

En los mosquitos, los genes regulados por la vía de señalización de Toll son controlados por el factor de transcripción Relish 1 (homólogo de Dorsal en *Drosophila*). Esta vía de señalización es inducida por hongos, bacterias Gram-positivas, virus dengue y *Plasmodium spp* (Frolet *et al.*, 2006; Zou *et al.*, 2008; Xi *et al.*, 2008). La unión de Relish 1 y Cactus induce la regulación negativa de la vía de Toll por silenciamiento (Frolet *et al.*, 2006). La vía de señalización de IMD es controlada por el factor de transcripción Relish 2, el cual está involucrado en la respuesta inmune en contra de las bacterias Gram-negativas y *Plasmodium spp*. (Frolet *et al.*, 2006; Meister *et al.*, 2005). Curiosamente, mientras Toll e IMD están involucradas en la inmunidad de *An. gambiae* contra *P. berghei*, *P. falciparum* es controlado principalmente por la vía de IMD (Garver *et al.*, 2009). La vía JAK/STAT es la menos estudiada. En recientes estudios, se ha demostrado que en *A. aegypti*

la vía JAK/STAT está implicada en la respuesta inmune en contra del virus dengue (Souza, 2009).

Hasta ahora, se han identificado 24 péptidos en la hemolinfa de *D. melanogaster* con actividad antimicrobiana y regulada por las vías IMD y Toll. En los mosquitos, se encuentran principalmente la familia de los genes de Cecropina, Defensina y Gambicina (Hillyer, 2010). El genoma de *An. gambiae* contiene 4 genes de defensina y 4 de cecropina (Christophides *et al.*, 2002). En análisis in vitro, se ha demostrado que Cecropina y Gambicina son bactericidas principalmente contra bacterias Gram-negativas y Defensinas contra bacterias Gram-positivas (Hillyer, 2010). Coggins y colaboradores (2012), compararon la expresión de los PAMs en *Aedes aegypti* y *An. gambiae* después de haber sido infectados con diferentes bacterias; se observó que *A. aegypti* es más resistente a bacterias que *An. gambiae*, que correlacionó con un mayor incremento en la expresión de Cecropina y Defensina.

En la Tabla 1, se muestra la clasificación de los principales péptidos antimicrobianos de algunos dípteros según su estructura y mecanismos de acción.

**Tabla 1:** Clasificación de los principales PAMs en Dípteros

<b>PAMs</b>	<b>Estructura</b>	<b>Especie</b>	<b>Mecanismo de acción</b>	<b>Referencias</b>
<b>Defensina</b>	3-disulfuro, alfa-hélice y beta-plegada (11 isoformas)	<i>A. aegypti</i> (4 isoformas)	Actividad antimicrobiana gram (+) y gram (-) Actividad antiplasmódica	Hillyer, (2010), Kokoza <i>et al.</i> , (2010), Bartholomay <i>et al.</i> , (2004), Coggins <i>et al.</i> , (2012)
		<i>D. melanogaster</i>	Actividad antimicrobiana contra gram (+)	Bulet y Stocklin, (2005)
<b>Cecropina</b>	Alfa-hélice (23 isoformas)	<i>A. aegypti</i> (10 isoformas)	Actividad antimicrobiana contra gram (-) Modula virus dengue Actividad antiplasmódica	Xi <i>et al.</i> , (2005), Kokoza <i>et al.</i> , (2010), Coggins <i>et al.</i> , (2012),
		<i>D. melanogaster</i>	Actividad antimicrobiana contra gram (-)	Hoffman y Reichhart, (2002)
		<i>Anopheles sp</i>	Actividad antiplasmódica	Hillyer, (2010)
<b>Gambicina</b>	Rica en cisteínas (3 isoformas)	<i>A. aegypti</i> (1 isoforma)	Actividad antimicrobiana gram (-) Modula virus dengue	Xi <i>et al.</i> , (2005), Coggins <i>et al.</i> , (2012)
		<i>Anopheles sp</i>	Actividad antimicrobiana gram (-) y gram (+)	Vizioli <i>et al.</i> , (2001), Coggins <i>et al.</i> , (2012)
<b>Atacina</b>	Rica en glicina y prolina (6 isoformas)	<i>A. aegypti</i> (1 isoforma)	Actividad antimicrobiana gram (-)	Ramirez <i>et al.</i> , (2012)
		<i>D. melanogaster</i>	Actividad antimicrobiano gram (-)	Hoffman y Reichhart, (2002)

El sistema inmune de los mosquitos está mediado por receptores que diferencialmente reconocen patógenos y que potencialmente pueden inducir distintos tipos de respuesta en función del tipo de agente infeccioso reconocido. Es por esto que los PAMs constituyen un grupo de moléculas que han evolucionado debido a la compleja interacción entre el huésped y el patógeno, teniendo un espectro de actividad amplio (pero diferencial) y mecanismos de acción complejos (Téllez y Castaño, 2010). El estudio de la expresión de los PAMs podría ser una herramienta útil para evaluar la intensidad y rapidez de la respuesta inmune antes, durante y después del proceso de preparación inmunológica en contra de infecciones bacterianas. De igual forma permitirá evaluar si existe cierto grado de especificidad inmunológica asociado al reconocimiento de las bacterias en caso de una infección bacteriana mixta.

Las bacterias han jugado un papel importante en la evolución de la respuesta inmune innata y adaptativa de vertebrados (Lee y Mazmanian, 2010). En insectos, las bacterias son capaces de iniciar la respuesta inmune (ej. Lowenberger, 2001; Coggins *et al.*, en prensa); de tal manera que no solo juegan un papel muy importante como patógenos, sino también se ha visto que la flora bacteriana del mosquito puede modular otras infecciones como el virus dengue en *Aedes aegypti* (Xi *et al.*, 2008). También se ha demostrado que la bacteria *Wolbachia* puede inducir incompatibilidad citoplasmática (fenómeno por el cual las células gaméticas del mosquito son incapaces de desarrollar una progenie viable), además de ser capaz de bloquear la transmisión del virus dengue en *Aedes albopictus* (Blagrove *et al.*, 2012). Por esto, las bacterias son organismos utilizados para entender la relación patogénica o mutualista con los hospederos insectos (e.g. Moret y Schmid-Hempel, 2001; Moret y Siva-Jothy, 2003). Sin embargo, es poca la información que se tiene del comportamiento de los PAMs ante infecciones recurrentes por bacterias

## **Preparación inmunológica en insectos**

Salt (1970) en su revisión, propone que la respuesta celular de los insectos está adaptada para llevar a cabo diversas funciones ante infecciones por patógenos. Por ejemplo, Werner y Jones (1969), observaron que *Galleria mellonella* incrementa rápidamente el número de células fagocíticas entre 1 y 3 horas después de la infección con bacteria, y cuando todas las bacterias habían sido fagocitadas, se observó una disminución drástica de hemocitos entre 48 y 72 horas post-infección. El mismo fenómeno se observó en varios insectos infectados con parásitos (Tauber y Yeager, 1935). Por tal motivo, Salt (1970) sugiere que, ante una segunda o consecutivas infecciones con el mismo patógeno, es posible observar un incremento en el número de hemocitos, debido a que habrá más células de éstos presentes en circulación para el proceso de fagocitosis. En algunos de sus experimentos en *Tenebrio molitor* (Salt, 1957) y *Diataraxia sp* (Salt, 1960) no observó un incremento de hemocitos después de la segunda infección en un lapso corto de tiempo; sin embargo, no fue hasta que prolongó el tiempo de recuperación hasta por 1-2 semanas post-infección, cuando pudo observar diferencias significativas en el número de hemocitos entre la primera y la segunda infección. Por lo tanto, Salt (1970) sugiere que la eficiencia contra la segunda reinfección dependerá del tiempo de reconocimiento de la primera infección por parte de la respuesta inmune del hospedero. Otro claro ejemplo fue el realizado por Fisher (1961), donde demostró que *Ephestia sp.*, ante una segunda reinfección del parásito *Nemeritis sp.* (comúnmente letal para el hospedero), incrementó la eficiencia de la respuesta de los hemocitos contra el parásito, después de haber sido expuesto previamente con el parásito muerto por calor. Más tarde Karp y Lawrence (1980) reportaron que machos de *Periplaneta americana* infectados previamente con una toxina de abejas, incrementaron la respuesta inmune en un lapso de tiempo más corto y protección durante un tiempo prolongado después haber sido reinfectados con la misma toxina, mostrando el patrón bifásico típico de la respuesta inmune de memoria en vertebrados. Hoy en día conocemos este fenómeno como “preparación inmunológica” en invertebrados, el cual ha sido de gran relevancia para los inmunoecólogos y fisiólogos. Dada su

importancia, ha provisto de nuevas explicaciones para la evolución y la ecología de la respuesta inmune en los insectos (Little y Kraaijeveld, 2004).

Las larvas de *Tenebrio molitor* que tuvieron contacto previo con el hongo *Metarhizium anisopliae*, presentan una mayor tasa de supervivencia y actividad antimicrobiana en comparación con individuos que no fueron expuestos previamente al mencionado hongo (Moret y Siva-Jothy, 2003). El abejorro *Bombus terrestris*, mostró un incremento en la protección en contra de diferentes bacterias después de un contacto previo (Sadd y Schmid-Hempel, 2006). De igual forma se ha evidenciado la preparación inmunológica en individuos adulto de *Plodia interpunctella* (Lepidóptera) en contra de virus. Además, esta mejora de la respuesta inmune fue heredada a las siguientes generaciones (Tidbury, Perderson y Boots, 2010). Recientemente, también se ha evidenciado la preparación inmunológica en dípteros; como es el caso de *D. melanogaster* fue capaz de incrementar la tasa de supervivencia y actividad fagocítica en contra de *Streptococcus pneumoniae* y *Beauveria bassiana* después de un contacto previo (Pham y colaboradores, 2007). Sin embargo, no se ha demostrado preparación inmunológica en otros insectos, como es el caso de *Hetaerina americana* contra *Serratia marcescens*, *Micrococcus luteus* y *M. lysodeikticus* (González-Tokman *et al.*, 2010) y en *Formica selysi* contra *B. bassiana* (Reber y Chapuisat, 2012).

A pesar de que la preparación inmune es un fenómeno común en insectos, existen pocos estudios que evidencien el grado de especificidad inmunológica en insectos. En *Periplaneta americana* (Rheins *et al.*, 1980), se demostró protección inmune específica contra una solución tóxica proteica. También *Tribolium castaneum*, reveló resistencia específica a *Escherichia coli*, *Bacillus thuringiensis* y *B. subtilis* en términos de supervivencia (Roth *et al.*, 2008).

En dípteros, el conocimiento sobre el grado de especificidad inmunológica es aún más limitado. Por ejemplo, Pham *et al.*, (2007) sugieren que *D. melanogaster* presenta la preparación inmunológica específica, ya que a pesar de no mostrar

preparación inmunológica contra *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium marinum* y *Salmonella typhimurium*, demostró especificidad inmunológica contra *S. pneumoniae* y *B. bassiana* después de una reinfección con el mismo patógeno. *An. gambiae* mostró un incremento en el número de granulocitos y una disminución en la tasa de mortalidad en individuos que fueron infectados previamente con *Plasmodium berghei* y *P. falciparum*; sin embargo, esta preparación inmune fue debida a la microbiota del intestino (Rodríguez *et al.*, 2010). Contreras-Garduño y colaboradores (en revisión) demostraron que *A. albimanus* incrementa el número de transcritos de PAMs después de haber tenido contacto previo con *P. berghei*, en comparación con individuos que no tuvieron contacto previo con el mismo patógeno. *A. aegypti* se mostró una disminución en la tasa de mortalidad en individuos que tuvieron una primera infección con *E. coli* que en individuos que no estuvieron en contacto con el patógeno (Moreno-García *et al.*, 2010; Moreno-García, 2011). Sin embargo, aún se desconoce el comportamiento de la respuesta inmune durante infecciones mixtas recurrentes.

### **Especie de estudio: *Aedes aegypti***

El mosquito *Aedes aegypti* (Fig. 1A) pertenece a la familia Culicidae, presenta una amplia distribución entre los trópicos y zonas subtropicales (Badii *et al.*, 2007). Por lo general, habita en regiones con una temperatura media anual entre 17 – 30°C (Ibáñez-Bernal y Gómez-Dantés, 1995), con rango altitudinal que llega hasta los 2400 m.s.n.m. (Badii *et al.*, 2007). En México, el rango de distribución abarca hasta 29 estados (Ibáñez-Bernal y Gómez-Dantés, 1995).

*A. aegypti* presenta cuatro estadios en su desarrollo postembrionario que consiste en: huevo, larva, pupa y mosquito adulto (Fig. 1B). Los huevos son puestos en sustratos sólidos ubicados en la interface entre agua-tierra. La melanización de los huevos se da después de que ha ocurrido la ovoposición, lo cual le confiere resistencia a la desecación y pueden permanecer hasta 2 años viables

(Christophers, 1960). Cada hembra puede llegar a depositar entre 100 y 120 huevos por puesta (Apostol *et al.*, 1994) con un éxito de eclosión muy alto.

La larva recién eclosionada es completamente acuática y pasa por 4 fases. Las primeras tres fases de desarrollo son rápidas, mientras que la última es más prolongada ya que es cuando la larva aumenta su tamaño y peso que necesitará para el proceso de metamorfosis (Nasci, 1986). Por lo general, el tiempo de desarrollo de la etapa larval es de una semana (Christophers, 1960), pero en condiciones de baja temperatura o escasez de alimento, puede llegar a prolongarse hasta por varias semanas (Tun-Lin *et al.*, 1992). Su fuente de alimentación consiste principalmente de microorganismos, particularmente hongos, algas, protozoarios e insectos diminutos (Merrit *et al.*, 1992).

La pupa es la fase del proceso de metamorfosis, la cual tiene la capacidad de desplazarse en el agua en respuesta a estímulos externos como vibraciones o cambios de intensidad luminosa. Esta etapa del ciclo de vida dura aproximadamente de dos a tres días (Christophers, 1960). Las larvas y pupas de los machos se desarrollan más rápido que las hembras.

El mosquito adulto recién emergido pasa sus primeras horas en reposo (Clements, 1999). El mosquito adulto presenta dimorfismo sexual, las hembras son más grandes que los machos, sus antenas tienen vellos cortos y escasos, y los palpos son más pequeños (Busvine, 1975). Los machos presentan un patrón de apareamiento poligínico, mientras que las hembras son monándricas. Un apareamiento es suficiente para fecundar sus huevos. La conducta reproductiva y de alimentación de sangre (en hembras) es entre las 24 y 72 horas post-emergencia adulta (Clements, 1999). Los machos se alimentan de néctar de las flores. Después de cada alimentación sanguínea se desarrolla un lote de huevos; a las 48 a 72 horas post-alimentación se realiza la oviposición (Carrada *et al.*, 1984). El mosquito adulto en condiciones naturales sobrevive en promedio de 15 a 30 días (Badii *et al.*, 2007).

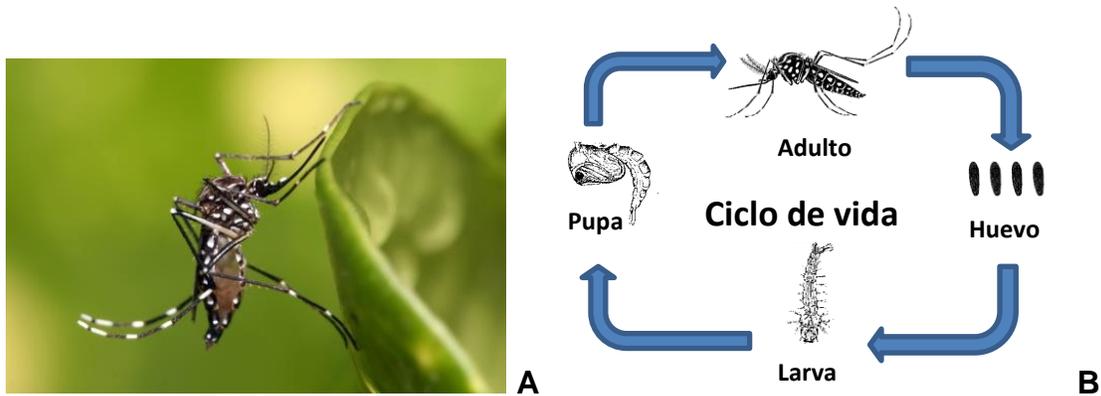
*A. aegypti* es el principal vector del virus dengue (Clarke, 2002). La invasión del virus al mosquito ocurre solo en la hembra ya que es quien presenta alimentación sanguínea. Esto conlleva a una alta probabilidad de contagiarse con algún patógeno, debido al contacto directo con la piel del hospedero en la alimentación.

En este trabajo se propone como modelo de estudio a mosquitos hembras de *Aedes aegypti* debido a la evidencia que existe sobre el fenómeno de “preparación inmunológica” en términos de supervivencia (Moreno-García *et al.*, 2010; Moreno-García, 2011). La limitada capacidad de dispersión (<200 m de distancia en sitios urbanos; Russell *et al.*, 2005), lo hace vulnerable a reinfectarse con un mismo patógeno a lo largo de su vida; así como también de presentar infecciones mixtas, debido al constante contacto que tiene sobre la piel del hospedero causado por la alimentación sanguínea.

### **Respuesta inmune de *A. aegypti***

En la respuesta celular de *A. aegypti*, se ha descrito tres tipos hemocitos: los prohemocitos, granulocitos y los oenocitoides. Los prohemocitos son hemocitos no diferenciados, mientras que los granulocitos son los hemocitos principales del proceso de fagocitosis de patógenos y células muertas, mediante la encapsulación melanótica o no de melanina (Hillyer *et al.*, 2004; Castillo *et al.*, 2006). Los oenocitoides son los responsables de la producción de melanina a través de la cascada de FO (Hyller y Christensen, 2002; Hillyer *et al.*, 2004; Castillo *et al.*, 2006). En la respuesta humoral, se ha reportado la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno contra infecciones bacterianas (Moreno-García *et al.*, 2010; Ramírez, 2013), además la producción de péptidos antimicrobianos como Defensina, Cecropina, Atacina, Gambicina y Dipterisina. Aunque no es muy clara la actividad antimicrobiana de los PAMs del mosquito, se ha observado que de Defensina está relacionada contra bacterias Gram-positivas (Bartholomay *et al.*, 2004; Chalk *et al.*, 1994; Lowenberger *et al.*, 1999b), mientras que en

Cecropina (Lowenberger *et al.*, 1999a), Atacina, Gambicina (Ramirez *et al.*, 2012) y Diptericina (Xi *et al.*, 2008) presentan actividad lítica contra bacterias Gram-negativas. Los PAMs están regulados principalmente por las vías de señalización de Toll e IMD, sin embargo a diferencia de *D. melanogaster*, *A. aegypti* muestra que las vías de señalización se entrecruzan entre ellas para la síntesis de PAMs (Xi *et al.*, 2008).



**Figura 1.** A) *Aedes aegypti*, hembra adulta. B) Ciclo de vida de *A. aegypti*

## JUSTIFICACIÓN

Debido al descubrimiento del fenómeno de “preparación inmunológica”, es necesario seguir realizando estudios sobre las estrategias de supervivencia para combatir a los patógenos, como es el caso del estudio del grado de especificidad inmunológica. Por tal motivo, el desarrollo del conocimiento sobre las diferentes estrategias de la respuesta inmune en los insectos, nos permitirá entender el éxito evolutivo y ecológico de los invertebrados.

*A. aegypti* es el principal vector del virus dengue, lo cual lo hace de gran importancia debido al impacto que tiene sobre la salud pública en México y en el mundo. El enriquecimiento del conocimiento sobre la respuesta inmune en *A. aegypti*, permitirá desarrollar estrategias de control integrales y racionales sobre el vector del virus dengue, creando un beneficio en la salud pública.

## **HIPÓTESIS**

Existe preparación inmunológica específica contra bacterias en mosquitos hembras de *Aedes aegypti*.

### **Predicciones:**

- i. Si existe el fenómeno de “preparación inmunológica específica”, se esperaría un incremento y/o rapidez de la respuesta inmune después de un contacto previo con el mismo patógeno.
- ii. Si existe el fenómeno de “preparación inmunológica no específica”, se esperaría un incremento y/o rapidez de la respuesta inmune después de un contacto previo indistintamente del patógeno.
- iii. Si no existe “preparación ni especificidad inmunológica”, la respuesta inmune sería menor o igual en comparación con individuos que no tuvieron un contacto previo con el patógeno.

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar la preparación y especificidad inmunológica de mosquitos hembras de *Aedes aegypti* durante infecciones bacterianas mixtas.

### **Objetivos particulares**

- i. Evaluar la existencia de la preparación inmunológica de *A. aegypti* contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, usando como marcador de la respuesta inmune a los péptidos antimicrobianos.
- ii. Evaluar la existencia de la especificidad inmunológica de *A. aegypti*, mediante infecciones mixtas de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, usando los péptidos antimicrobianos.
- iii. Determinar el valor adaptativo del proceso de preparación inmunológica a través de la evaluación de la supervivencia de *A. aegypti* con infecciones mixtas.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Crianza de mosquitos de *A. aegypti*

Los mosquitos hembras fueron criados bajo condiciones controladas en el insectario del Instituto Nacional de Salud Pública (INSP) en Cuernavaca, Morelos. Se mantuvieron a 26 – 28°C con una humedad relativa de 50 – 80% y fotoperiodo de 12:12 horas. Las larvas fueron alimentadas con una dieta compuesta por lactoalbúmina, croquetas de ratón y extracto de levadura (1:1:1). Se colocaron 200 larvas en tinas con 2 Litros de agua potable y alimentadas de acuerdo al estadio larval en que se encuentren (Tabla 2). Los adultos recién emergidos fueron alimentados con una solución de sacarosa *ad libitum*.

**Tabla 2:** Cantidad de alimento dependiente del estado larval.

Estadio larval (L)	Cantidad de alimento (µl)
L1	500
L2	1000
L3	1500 - 2000
L4	1000 - 2000

### Crecimiento y cuantificación de bacterias

Para este trabajo se utilizaron dos bacterias: *Staphylococcus aureus* (1MR resistente a Meticilina y Oxacilina) como Gram-positiva, (donada por Dra. María Elena Velázquez Meza; del Centro de Investigaciones Sobre Enfermedades Infecciosas, CISEI) y *Escherichia coli* (01268; resistente a Ampicilina) como Gram-negativa (donada por Dr. Jesús Silva; CISEI). La primera bacteria se encuentra comúnmente en la piel de los humanos, por lo tanto hay una alta probabilidad de contacto con el mosquito durante la alimentación sanguínea y *E. coli* que es una bacteria ampliamente utilizada en el estudio de la respuesta inmune en mosquitos (Vicente, 2006; Castillo, 2011; Coggins *et al.*, 2012). El interés por utilizar una bacteria Gram-positiva y una Gram-negativa para este trabajo, surge de la idea de

conocer el grado de especificidad inmunológica que puede presentar *A. aegypti* ante reinfecciones bacterianas contra si misma u otra bacteria distinta.

Para obtener la solución de trabajo que se utilizó para las infecciones, se colocaron 10 µl del stock (en glicerol) de cada bacteria en 4 ml de medio LB (Luria-Bertani), el tubo se incubó a 37°C con agitación de 200 rpm (revoluciones por minuto) durante 3:15 horas para *E. coli* y 4 horas para *S. aureus*; esto para obtener la fase exponencial de cada bacteria. Posteriormente se determinó las dosis de infección de *E. coli* y *S. aureus* para el diseño experimental, mediante la estimación de dosis letales (DL) para ambas bacterias en mosquitos infectados de *A. aegypti*.

### **Inyección de los mosquitos**

Para los experimentos se usaron mosquitos hembras de *A. aegypti* de 3-5 días post emergencia a fase adulta. Para su manipulación, los organismos fueron colocados en refrigeración a 4°C durante 15 min. La infección para cada tratamiento se realizó mediante la inyección en el hemocele atravesando la cutícula abdominal con un capilar moldeado como aguja y acoplado a una jeringa Drummond. Todo proceso de inyección se efectuó bajo un estereoscopio. Se eliminaron del experimento los mosquitos que fallecieron a las 24 horas post inyección debido a los efectos de la manipulación, obteniendo un 90% de éxito en la supervivencia. Después de las inyecciones, los mosquitos se dejaron a 27°C en el insectario y se alimentaron con solución de sacarosa *ad libitum*.

### **DISEÑO EXPERIMENTAL**

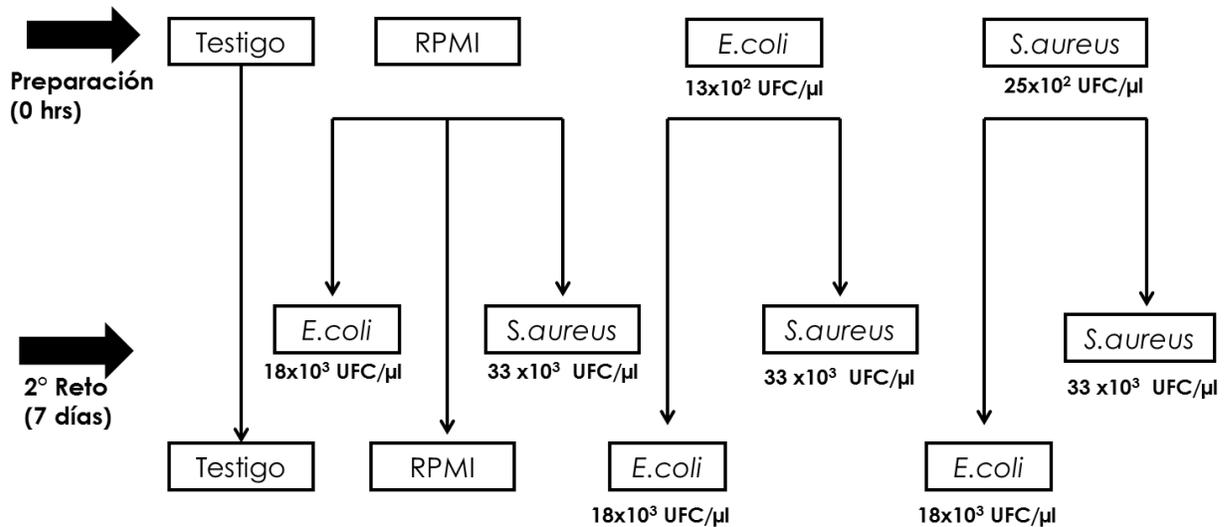
El diseño experimental (Fig. 2) consistió en determinar el grado de supervivencia de mosquitos hembras de *A. aegypti* con y sin preparación inmunológica, así como con infecciones mixtas. De igual, se cuantificó la respuesta inmune utilizando la expresión relativa de transcritos de PAMs.

### **Determinación de dosis de infección con bacterias.**

A partir de la cuantificación de UFC, la estandarización de las dosis letales y la expresión mínima de PAMs dependiente de la dosis de infección, se determinaron las dosis de infección para la preparación inmunológica y 2º Reto para ambas bacterias. Para inducir la preparación inmunológica se utilizó una dosis de  $13 \times 10^2$  UFC/ $\mu$ l para *E. coli* y una dosis de  $25 \times 10^2$  UCF/ $\mu$ l para *S. aureus*. Estas dosis son capaces de activar la respuesta inmune del mosquito. Para el 2º Reto se re infectaron los mosquitos con dosis más alta de *E. coli* ( $18 \times 10^3$  UFC/ $\mu$ l) y *S. aureus* ( $33 \times 10^3$  UFC/ $\mu$ l) (ver Fig. 2).

### **Análisis de supervivencia de *A. aegypti***

Para estimar la supervivencia de *A. aegypti* se obtuvieron 4 grupos de mosquitos: el grupo Testigo (el cual no recibió manipulación alguna) y tres tratamientos experimentales (Fig. 2). Para el primer tratamiento se inyectaron 300 individuos de *A. aegypti* con RPMI (medio de cultivo celular); el segundo grupo (N=200) fue inyectado con *E. coli*. El tercer grupo (N=200) fue inyectado con *S. aureus*. A los 7 días post-infección (2º Reto), al grupo Testigo no se le realizó ninguna manipulación. El grupo RPMI se dividió en tres tratamientos diferentes con 100 individuos cada tratamiento en donde se inyectó RPMI, *E. coli* y *S. aureus*, respectivamente. Para el grupo de *E. coli*, se volvió a inyectar 100 mosquitos con la misma bacteria y otros 100 individuos con *S. aureus*. De la misma manera fue para el grupo de *S. aureus*, donde 100 individuos fueron inyectados con la misma bacteria y otros 100 con *E. coli*. El análisis de supervivencia de los individuos se realizó 35 días post-inyección del 2º Reto.



**Figura 2.** Diseño experimental y dosis de infección para evaluar la preparación y grado de especificidad inmunológica de *A. aegypti*.

\*Preparación inmunológica (primera infección)

\*\*2º Reto (segunda infección).

### Cuantificación de la expresión de PAMs mediante qPCR en *A. aegypti*

Siguiendo el mismo diseño experimental (Fig. 2), se tomaron 7 tiempos diferentes para cada tratamiento durante todo el experimento: a las 0 horas (pre-inyección); a las 10, 24 horas y 7 días (post-preparación) y a las 10, 24 horas y 7 días (post-2º Reto).

Para cada tratamiento y punto de colecta se utilizaron pools de 10 individuos por muestra, cada muestra se colocaron 500 μl de Trizol (Invitrogen) en tubo eppendorf de 1.5 ml estériles para la obtención de RNA (Anexo 1). Se cuantificó la cantidad y calidad del RNA, mediante el uso de un NANODROP. Para verificar la integridad del RNA se tomó de 1-15 μl de la muestra (dependiendo de la concentración de RNA) y se corrió por electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Se generó el cDNA para cada muestra normalizando a 1 μg de RNA<sub>total</sub>. Se añadió en un microtubo de 200 μl, 500 ng/μl de RNA<sub>total</sub>, 1 μl de hexámeros (Thermo Scientific) a 50 μg/ml, 1 μl de dNTPs 10 mM y se aforó con 7 μl de H<sub>2</sub>O<sub>Depec</sub>. Se incubaron a 65°C por 5 minutos en el termociclador y luego se colocaron en hielo. Posteriormente, se agregó 2 μl de Buffer 5X (Thermo Scientific), 0.5 μl de RNase

inhibitorlock a 40 U/μl (Thermo Scientific), 0.5 μl de RT a 200 U/μl (Thermo Scientific) y aforó a un volumen final de 10 μl de H<sub>2</sub>O<sub>Depec</sub>. Se incubó a 25°C durante 10 minutos, 37°C a 60 minutos y 70°C por 10 minutos. Las muestras se almacenaron a -20°C.

El cDNA se utilizó como templado para la amplificación de 4 péptidos antimicrobianos (PAMs) como marcadores de la respuesta inmune y la subunidad ribosomal S7 como un control interno (Tabla 3). Dichos oligonucleótidos fueron diseñados para *A. aegypti* (Vector base) y han sido utilizados para evaluar la respuesta inmune de este mosquito (Xi *et al.*, 2008).

**Tabla 3:** Secuencia de oligonucleótidos derivados de PAMs que se utilizaron como marcadores de la respuesta inmune de *A. aegypti* (Xi *et al.*, 2008)

<b>PAMs</b>	<b>ID Transcritos</b>	<b>Secuencia</b>	<b>pb</b>
<b>Defensina</b>	AAEL003832-RA	FW: 5'-TTGTTTGCTTCGTTGCTCTTT-3' RV: 5'-ATCTCCTACACCGAACCCACT-3'	200
<b>Atacina</b>	AAEL003389-RA	FW: 5'-TTGGCAGGCACGGAATGTCTTG-3' RV: 5'-TGTTGTCGGGACCGGGAAGTG-3'	231
<b>Gambicina</b>	AAEL004522-RA	FW: 5'-GCCAAAACCTGTTCTCTTG-3' RV: 5'-CGATGTAGCATTGCGGTGATG-3'	180
<b>Cecropina</b>	AAEL015515-RA	FW: 5'-TCACAAAGTTATTTCTCCTGATCG-3' RV: 5'-GCTTTAGCCCCAGCTACAAC-3'	160
<b>S7</b>	AAEL009496-RA	FW: 5'-GGGACAAATCGGCCAGGCTATC-3' RV: 5'-TCGTGGACGCTTCTGCTTGTTG-3'	190

La cuantificación de la expresión relativa de los PAMs de interés, se realizó mediante la técnica de PCR tiempo real (qPCR). Se utilizó Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2) (Thermo Scientific) y ABI Detection System ABI Prism 700 (Applied Biosystems). Todas las reacciones de qPCR para cada muestra se hicieron por duplicado. El gen de proteína ribosomal S7 se usó para normalizar el templado del cDNA.

### **Análisis estadísticos**

Para el análisis de supervivencia se usó el estadístico “Log-rank  $\chi^2$ ” para detectar las diferencias entre las curvas de supervivencia. El análisis se realizó con el programa JMP 7.0 (SAS Institute, 2007). Los valores Log-rank  $\chi^2$ , y  $P$ , que se muestran en la sección de resultados son específicamente para los grupos que se mencionan.

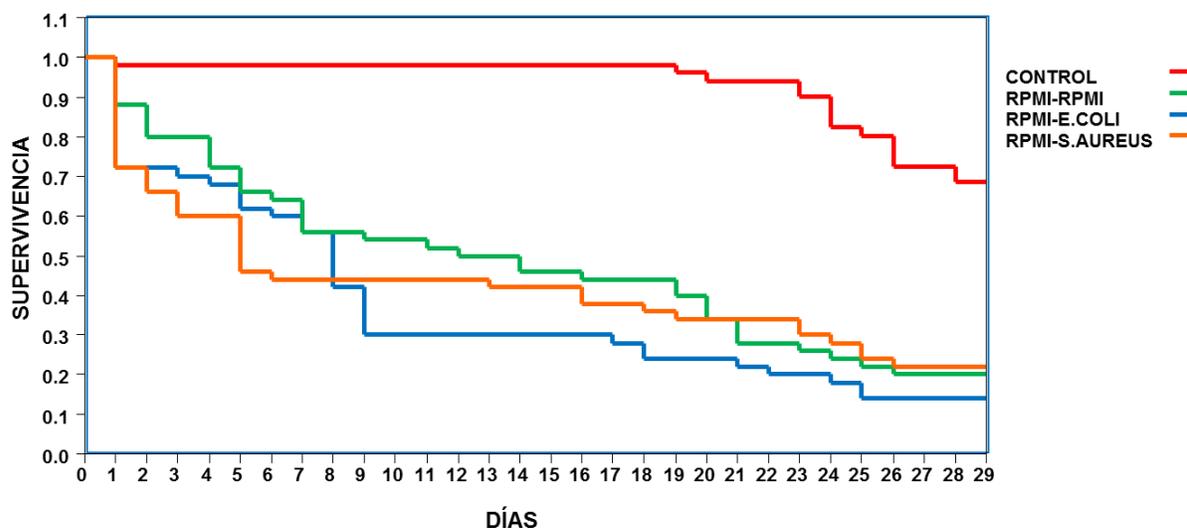
La cuantificación de la expresión relativa de los mRNA, se realizó por el método  $2\Delta\Delta_{Ct}$  (valores umbral del ciclo) que estima la proporción relativa de la expresión de los transcritos bajo estudio (Pfaffl, 2001). El método  $2\Delta\Delta_{Ct}$  expresa la proporción obtenida de la relación entre los valores  $Ct$  de la muestra (péptidos) y los valores  $Ct$  del control interno (S7) (Livak y Schmittgen, 2001). Utilizando los valores del  $2\Delta\Delta_{Ct}$  de cada PAM, se realizó una ANOVA de una vía para estimar diferencias estadísticas entre tratamientos y tiempos de cuantificación. Una vez que se determinó que existen diferencias en el modelo general de ANOVA, se aplicó la prueba Post hoc LSD-Fisher mediante el programa de Statistica (versión 7). Esta prueba Post hoc, nos permitió estimar los valores de  $P$  (*que son los que se muestran en los resultados*) evaluando las diferencias que existieron entre pares de valores relativos de expresión (por lo tanto los grados de libertad serán igual a 1) para cada péptido.

## RESULTADOS

### PREPARACIÓN Y ESPECIFICIDAD INMUNOLÓGICA DE *A. aegypti*

#### Análisis de supervivencia

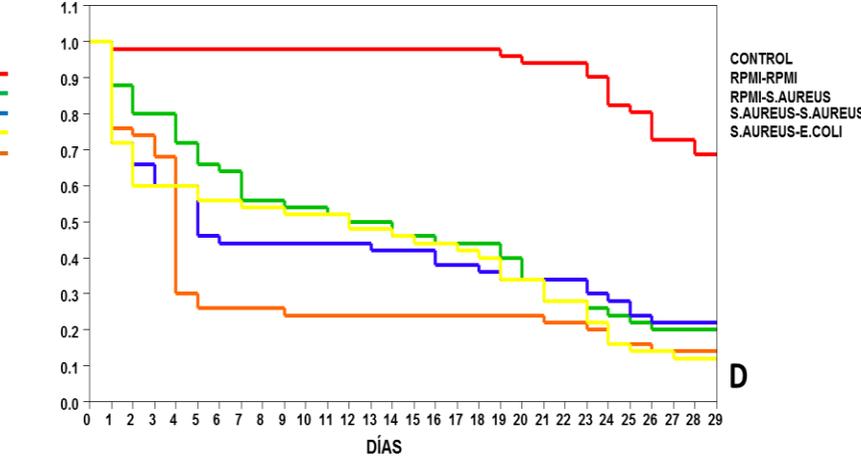
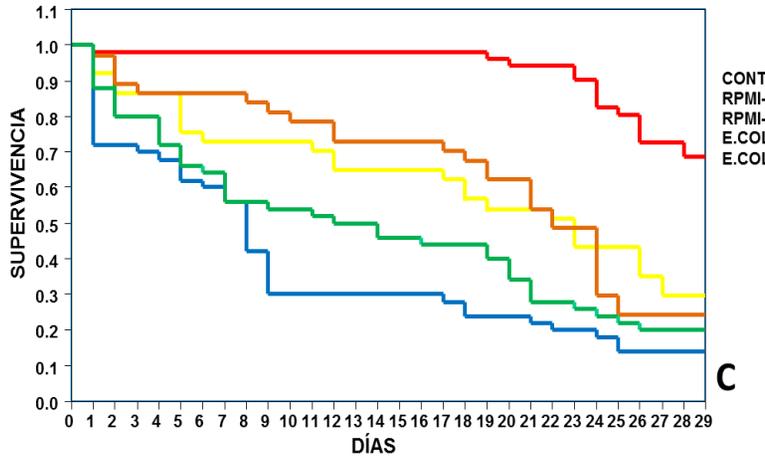
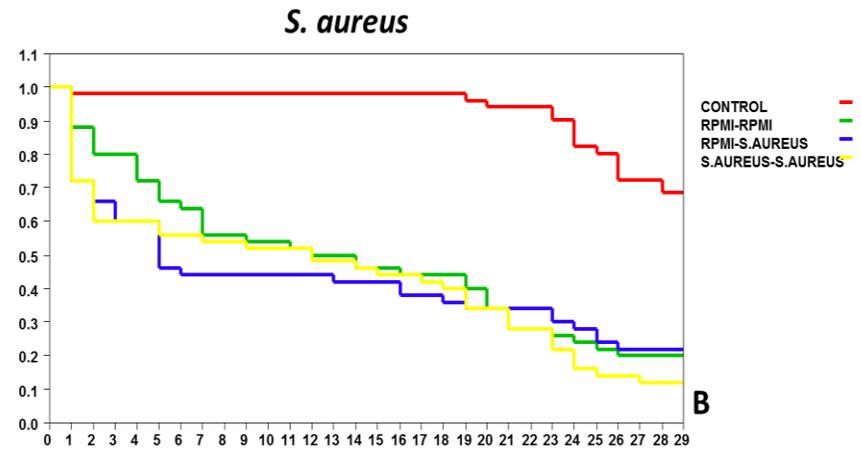
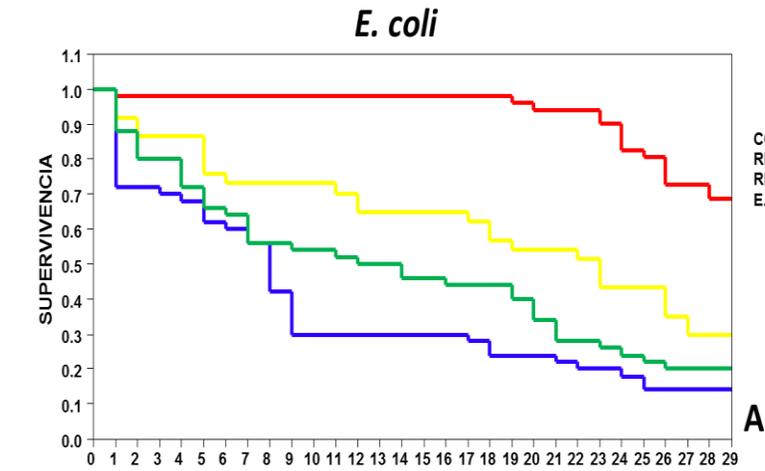
Una vez obtenida la dosis de infección para la inducción de la preparación inmunológica y la dosis del 2º Reto, se llevó a cabo el experimento de supervivencia de *A. aegypti*. El análisis de supervivencia mostró que *A. aegypti* mantiene tasas de supervivencia similares tanto para infecciones con *E. coli* como con *S. aureus* (Log-rank  $\chi^2=1.344$ ,  $P=0.510$ ) (Fig. 3). Esto indica que a pesar de que *E. coli* y *S. aureus* presentan virulencias distintas, las dosis en ambas bacterias tuvieron letalidades similares en el 2º Reto (RPMI-E-COLI; RPMI-S.AUREUS). A pesar de que RPMI-RPMI se consideró como un control positivo, se observó un incremento en la mortalidad de *A. aegypti*, probablemente debido a la magnitud del daño causado por la inyección en el hemocele del mosquito.



**Figura 3.** Análisis de supervivencia “Log-rank  $\chi^2$ ” de *A. aegypti* con RPMI (que no tuvieron la dosis de la preparación inmunológica) e infectados posteriormente con *E. coli* y *S.aureus*

El análisis de supervivencia mostró el fenómeno de preparación inmunológica contra *E. coli*. Existe un incremento estadísticamente significativo en la supervivencia de los mosquitos que fueron inyectados previamente con *E. coli* (E.COLI-E.COLI); esto en comparación con individuos que no tuvieron un contacto previo con el patógeno (RPMI-E.COLI ; Log-rank  $X^2=7.601$ ,  $P<0.022$ ) (Fig. 4A, Tabla 4). Sin embargo, para *S. aureus* no se encontraron diferencias significativas entre mosquitos preparados inmunológicamente con *S. aureus* en comparación con los individuos que fueron inyectados con RPMI y posteriormente infectados con *S. aureus* (Log-rank  $X^2=1.014$ ,  $P=0.602$ ) (Fig. 4B, Tabla 4). RPMI-RPMI mostró un decremento en la supervivencia, debido al daño ocasionado por la inoculación del medio de cultivo celular y el daño físico al inyectar, rompiendo la cutícula del hemocele del mosquito.

Además, *E. coli* mostró que puede inducir preparación inmunológica con cierto grado de especificidad; es decir, que *E. coli* es capaz de proteger al mosquito cuando hay una reinfección con la misma bacteria o con *S. aureus* (Fig. 4C). Existe una menor mortalidad para los individuos que fueron inyectados previamente con *E. coli* y que fueron reinfectados tanto con *E. coli* como con *S. aureus* (Log-rank  $X^2=12.117$ ,  $P<0.002$ , Tabla 4), mientras que *S. aureus* no fue capaz de proteger al *A. aegypti* cuando hay una reinfección de la misma bacteria o de *E. coli* (Log-rank  $X^2=3.718$ ,  $P=0.293$ ) (Fig. 4D).



**Figura 4.** Análisis de supervivencia “Log-rank  $\chi^2$ ” de mosquitos *A. aegypti* después del 2º Reto (Día 0). Evidencia de preparación inmunológica contra E.COLI-E.COLI (A) y S.AUREUS-S.AUREUS (B). Especificidad inmunológica contra E.COLI-S.AUREUS (C) y S.AUREUS-E.COLI (D).

La Tabla 4 muestra las diferentes combinaciones que se realizaron para comparar las diferencias significativas en infecciones simples, mixtas y sin preparación inmunológica en *A. aegypti*.

**Tabla 4.** Distintas combinaciones en las curvas de supervivencia en infecciones bacterianas en el mosquito.

Combinaciones	Diferencias	<i>P</i> ( <i>g.l.=1</i> )
RPMI-E.COLI / RPMI-S.AUREUS	No hay diferencias	<i>P</i> =0.510
RPMI-E.COLI / E.COLI-E.COLI	E.COLI-E.COLI mayor supervivencia	<i>P</i> <0.022
RPMI-E.COLI / E.COLI-S.AUREUS	E.COLI-S.AUREUS mayor supervivencia	<i>P</i> <0.002
E.COLI-E.COLI / E.COLI-S.AUREUS	No hay diferencias	<i>P</i> =0.501
RPMI-S.AUREUS / S.AUREUS-S.AUREUS	No hay diferencias	<i>P</i> =0.602
RPMI-S.AUREUS / S.AUREUS-E.COLI	No hay diferencias	<i>P</i> =0.293
S.AUREUS-S.AUREUS / S.AUREUS-E.COLI	No hay diferencias	<i>P</i> =0.429

### **Preparación y especificidad inmunológica en *A. aegypti* contra *E. coli***

Los resultados mostraron que los PAMs (Atacina, Cecropina, Defensina) presentan tendencias similares en las cinéticas de expresión durante las infecciones con *E. coli*, mientras que la expresión de Gambicina no mostró ninguna tendencia (Fig. 5); probablemente Gambicina no es un buen marcador de la respuesta inmune para nuestro diseño experimental.

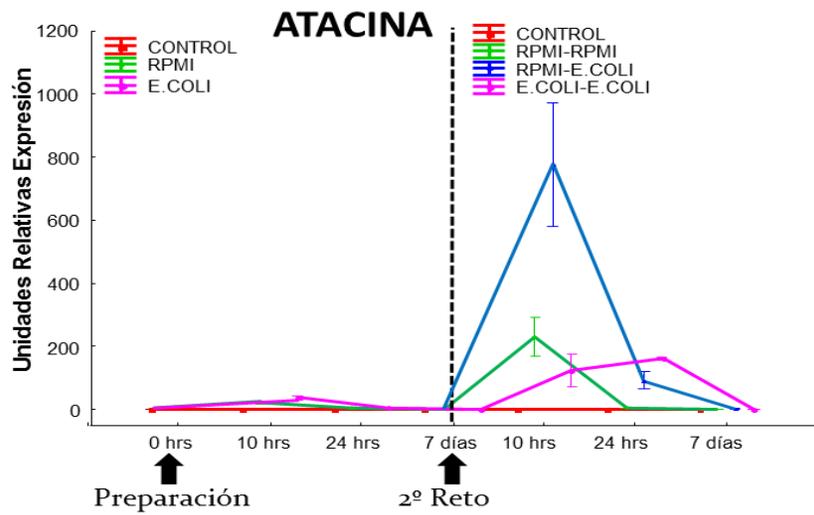
Ante una dosis no letal de *E. coli* ( $13 \times 10^2$  UFC/ $\mu$ l; dosis preparación inmunológica) se induce la expresión de los cuatro PAMs (Atacina, Cecropina, Defensina y Gambicina) a las 10 hrs post-preparación en comparación con individuos que no fueron inyectados con *E. coli* (RPMI) (Fig. 5). Cecropina mostró 42 veces más de URE (Unidades Relativas de Expresión) que los mosquitos inyectados con RPMI,

(Fig. 5B); seguido de Atacina (14 URE veces más que los mosquitos con RPMI; Fig. 5A); sin embargo, para ambos péptidos las diferencias no fueron significativas ( $P=0.10$ ;  $P=0.72$ , respectivamente). Defensina mostró diferencias significativas (7 veces más que los mosquitos con RPMI,  $P=0.00001$ ; Fig. 5C). A las 24 hrs la expresión relativa de los PAMs disminuye drásticamente y al 7º día post-preparación disminuye hasta llegar a 1 URE. El grupo RPMI aumenta su expresión a las 10 hrs post-priming, seguido de la disminución de la expresión a las 24 hrs post-priming hasta el 7º día.

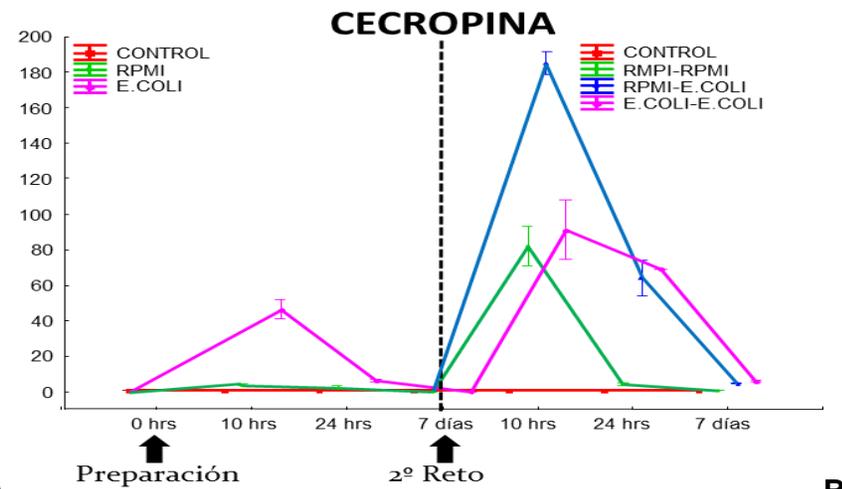
Posterior al 2º Reto, los niveles de expresión de PAMs (Atacina, Cecropina y Defensina) de los individuos que no tuvieron un contacto previo con *E. coli* (RPMI-E.COLI) aumentan significativamente a las 10 hrs, en comparación con los mosquitos que fueron infectados previamente con *E. coli* (E.COLI-E.COLI) (Fig. 5). En Atacina RPMI-E.COLI mostró 654 URE veces mayor expresión que E.COLI-E.COLI ( $P=0.00001$ ; Fig. 5A). Cecropina expresó 94 URE veces más que E.COLI-E.COLI ( $P=0.0001$ ; Fig. 5B), mientras que en Defensina no mostró diferencias significativas entre mosquitos tratados con RPMI-E.COLI versus E.COLI-E.COLI (Fig. 5C). Sin embargo, E.COLI-E.COLI mostró un aumento significativo en Atacina, Cecropina y Defensina, esto en comparación con la primera infección con E.COLI ( $P=0.003$ ;  $P=0.001$ ;  $P=0.001$ , respectivamente). Por otro lado, Atacina, Cecropina y Defensina demostraron que a las 24 hrs post-2º Reto, RPMI-E.COLI disminuye significativamente hasta llegar a 1 URE en el 7º día post-infección ( $P=0.00001$ ), mientras que E.COLI-E.COLI mantiene su expresión a las 24 hrs post-2º Reto y disminuye hasta los 7 días post-infección del 2º Reto. Como se mencionó anteriormente, RPMI-RPMI se consideró como control positivo; sin embargo, mostró un incremento en la expresión relativa en Atacina, Cecropina y Defensina, siendo Atacina el de mayor expresión.

Para determinar la especificidad inmunológica de *A. aegypti*, se comparó la expresión relativa entre mosquitos re infectados con dosis alta de la misma bacteria *E. coli* (E.COLI-E.COLI) y mosquitos infectados con dosis alta de *S. aureus*

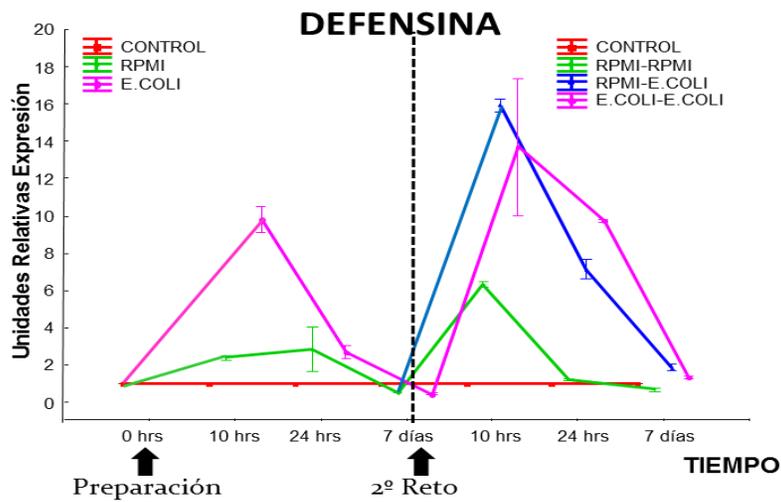
(E.COLI-S.AUREUS). Los niveles de expresión en Cecropina y Defensina en E.COLI-S.AUREUS fueron significativamente mayores a las 24 horas post-2º Reto en comparación con E.COLI-E.COLI ( $P=0.00001$ ; Fig. 6B y C, respectivamente), siendo Cecropina el de mayor número de expresiones relativas. Mientras que Atacina mostró mayor expresión de transcritos en E.COLI-E.COLI que mosquitos infectados E.COLI-S.AUREUS ( $P=0.002$ ; Fig. 6A).



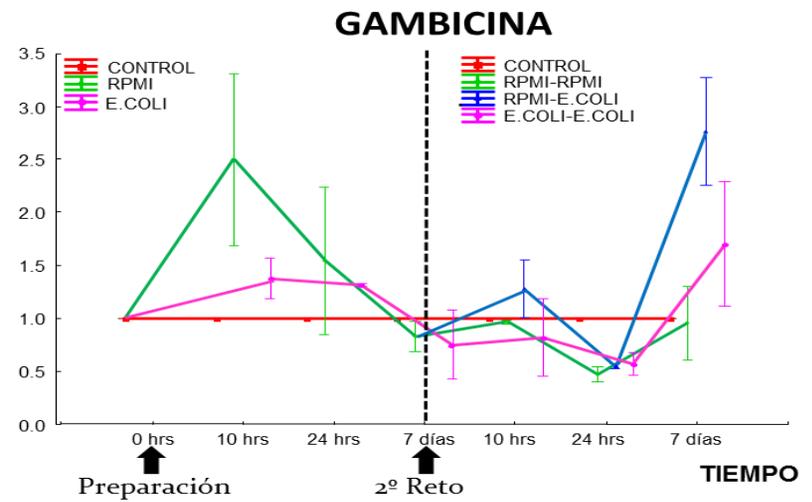
A



B

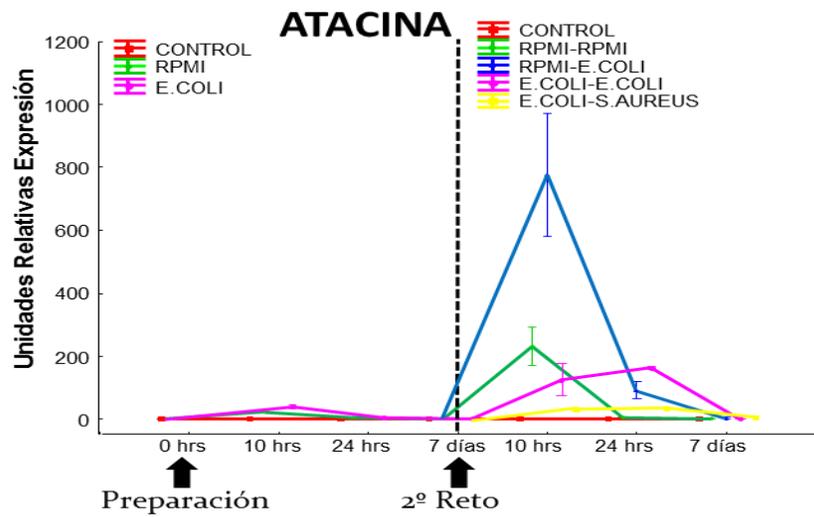


C

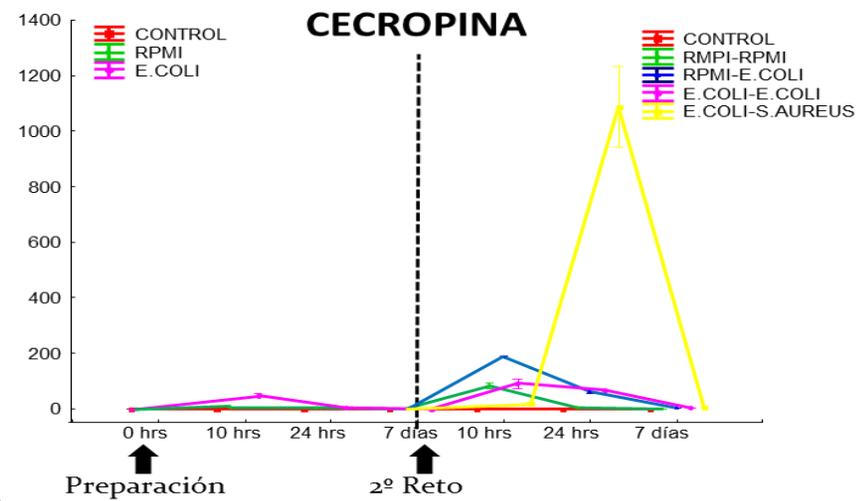


D

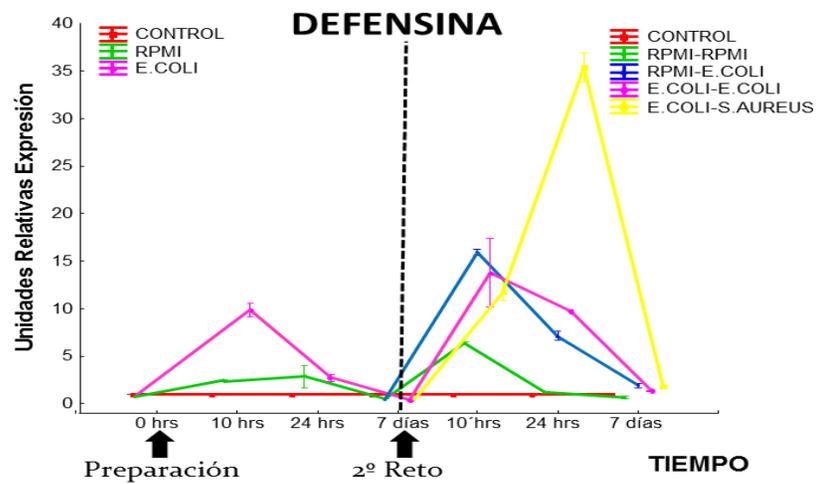
**Figura 5:** Expresión relativa de PAMs en *A. aegypti* durante infecciones simples con *E. coli* antes y después de la preparación inmunológica y 2º Reto.



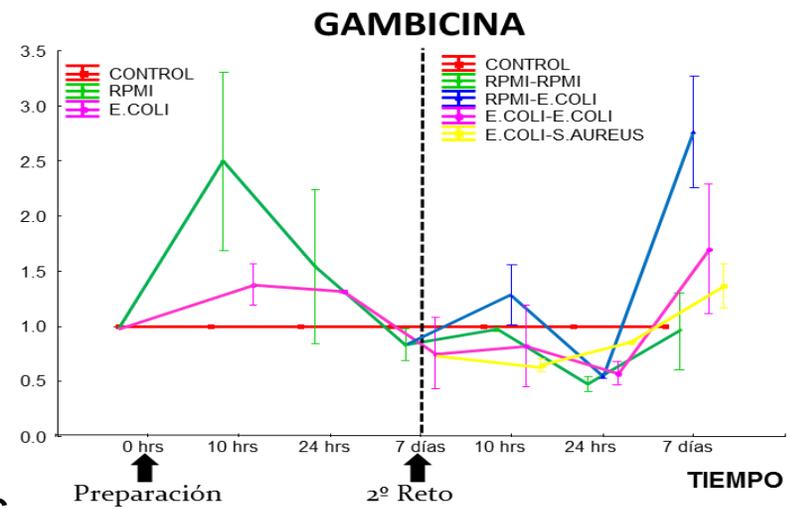
A



B



C



D

**Figura 6:** Expresión relativa de PAMs en *A. aegypti* durante infecciones simples y mixtas con *E. coli* antes y después de la preparación inmunológica y 2º Reto.

## **Preparación inmunológica y grado de especificidad en *A. aegypti* contra *S. aureus***

A diferencia de los resultados en *E. coli*, los resultados en *S. aureus* (Fig. 7) no mostraron ninguna tendencia entre los diferentes PAMs (Atacina, Cecropina, Defensina). Al igual que en *E. coli*, Gambicina tampoco demostró ninguna tendencia biológica.

Los niveles de expresión de los PAMs mostraron que una dosis no letal de *S. aureus* ( $25 \times 10^2$  UFC/ $\mu$ l), activa la respuesta inmune de *A. aegypti*, alcanzando su mayor expresión a las 10 hrs post-preparación. Sin embargo, el nivel de transcritos inducidos por esta primera infección con *S. aureus* fue mayor en comparación con la expresión inducida por *E. coli*. Los mosquitos inyectados con RPMI también incrementan su expresión relativa a las 10 hrs (sin embargo, no difieren con el grupo TESTIGO), seguido de una disminución a las 24 hrs post-preparación (Fig. 7A, B y C). No obstante, se observaron diferencias significativas entre mosquitos infectados con *S. aureus* y mosquitos inyectados con RPMI en Cecropina y Defensina ( $P=0.009$  y  $P=0.00001$ , respectivamente; Fig. 7B y C), mientras que en Atacina no existen diferencias significativas (Fig. 7A). Posterior a las 24 hrs post-preparación hay una disminución de la expresión relativa de los PAMs hasta llegar a 1 URE en el día 7 post-preparación para todos los PAMs, a excepción de Gambicina.

Después del 2º Reto, Atacina (Fig. 7A) mostró mayor expresión relativa a las 10 hrs post-2º Reto en mosquitos tratados con RPMI-RPMI en comparación con mosquitos RPMI-S.AUREUS ( $P=0.0005$ ) y S.AUREUS-S.AUREUS ( $P=0.00001$ ). A las 24 hrs, los diferentes tratamientos disminuyen significativamente hasta llegar 1 URE a los 7 días post-infección 2º Reto ( $P=0.00001$ ). En Cecropina (Fig. 7B) se encontró mayor expresión a las 10 hrs post-2º Reto en individuos infectados con RPMI-S.AUREUS en comparación con S.AUREUS-S.AUREUS ( $P=0.00001$ ). Sin embargo, a las 24 hrs solo RPMI-S.AUREUS y RPMI-RPMI disminuyen significativamente su expresión ( $P=0.00001$  y  $P=0.005$ , respectivamente), mientras

que S.AUREUS-S.AUREUS mantiene su expresión relativa hasta los 7 días post-2º Reto. A diferencia de los demás PAMs, Defensina (Fig. 7C) demostró una mayor expresión a las 24 hrs en S.AUREUS-S.AUREUS en comparación con RPMI-S.AUREUS ( $P=0.00001$ ). Además, se observó que S.AUREUS-S.AUREUS disminuyó su expresión hasta el 7º día, mientras que RPMI-S.AUREUS y RPMI-RPMI disminuyó a las 24 hrs post-2º Reto.

Al igual que en *E. coli*, se evaluó el grado de especificidad inmunológica de *A. aegypti* comparando mosquitos re infectados con la misma bacteria (S.AUREUS-S.AUREUS) y mosquitos con infecciones mixtas (S.AUREUS-E.COLI). (Fig. 8). Para Atacina, Cecropina y Defensina se observó que a las 10 horas post-2º Reto hubo una mayor expresión relativa en mosquitos tratados con infecciones mixtas S.AUREUS-E.COLI que mosquitos re infectados con la misma bacteria S.AUREUS-S.AUREUS ( $P=0.00001$ ; Figura 8A, B y C); siendo Atacina la que mostró mayor diferencia significativa entre tratamientos (545 veces más,  $P=0.00001$ ; Fig. 8A), seguido de Cecropina (172 veces más,  $P=0.00001$ ; Fig. 8B) y Defensina (15 veces más,  $P=0.00001$ ; Fig. 8C). A las 24 horas tanto Atacina, Cecropina y Defensina disminuyen significativamente con respecto a las 10 horas ( $P=0.00001$ ) llegando a 1 URE al 7º día.

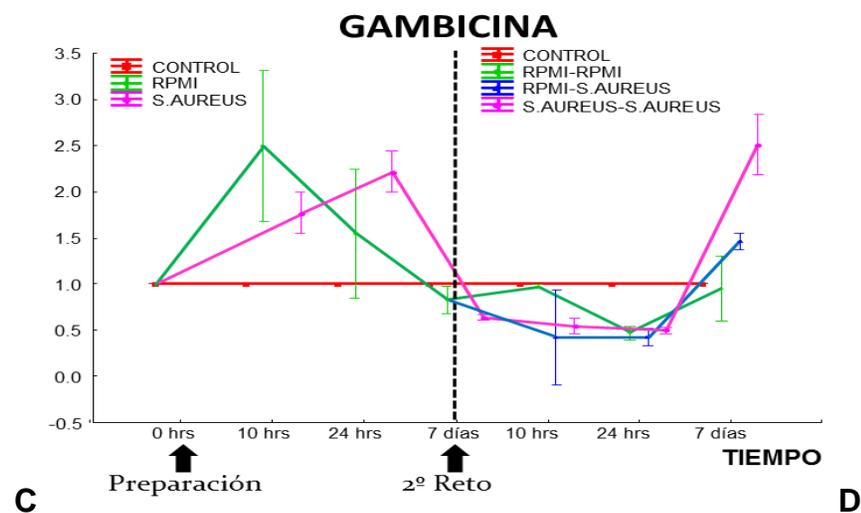
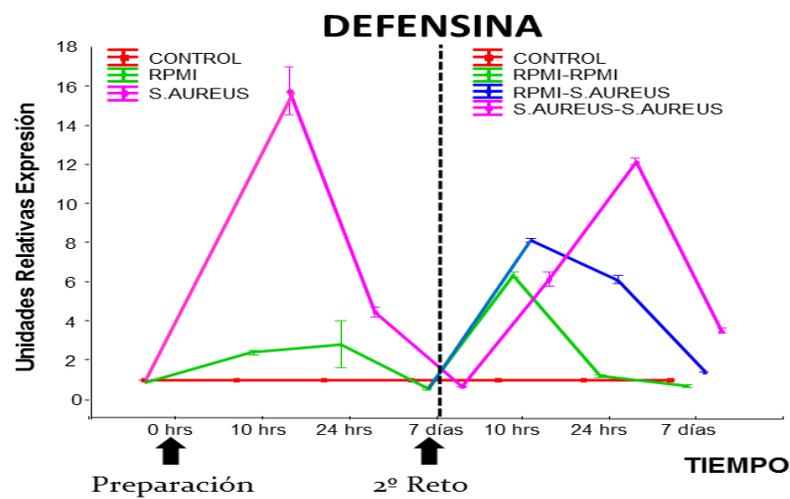
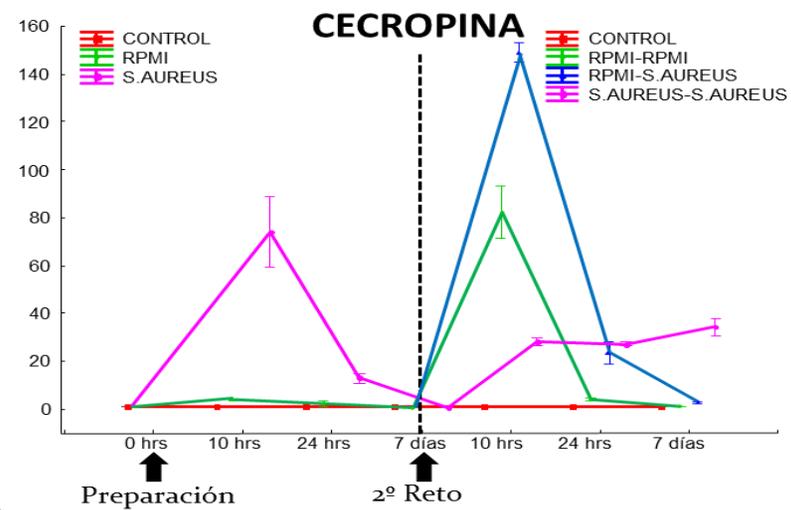
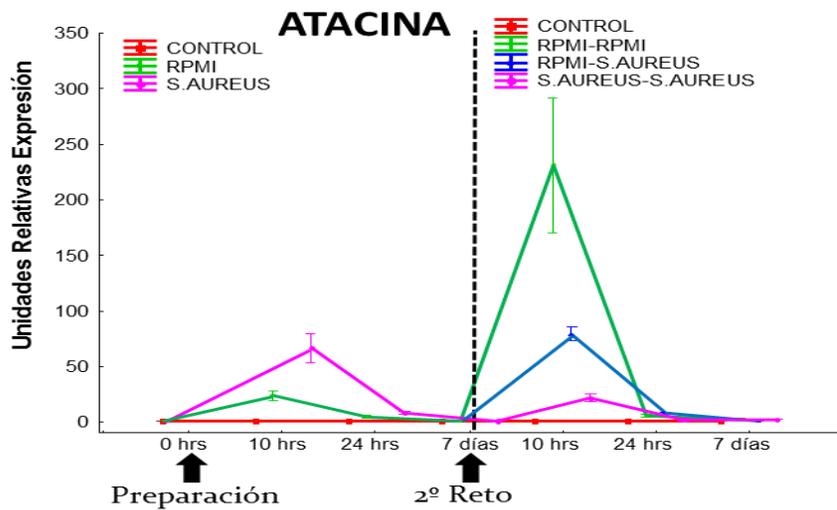
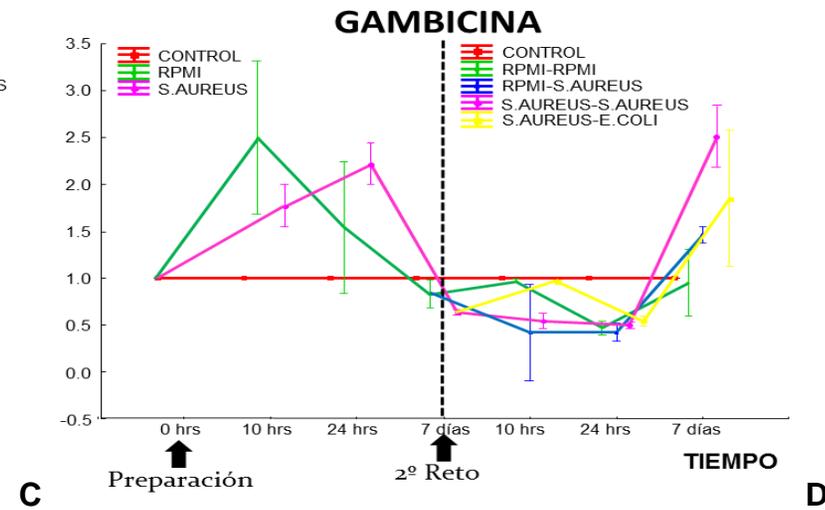
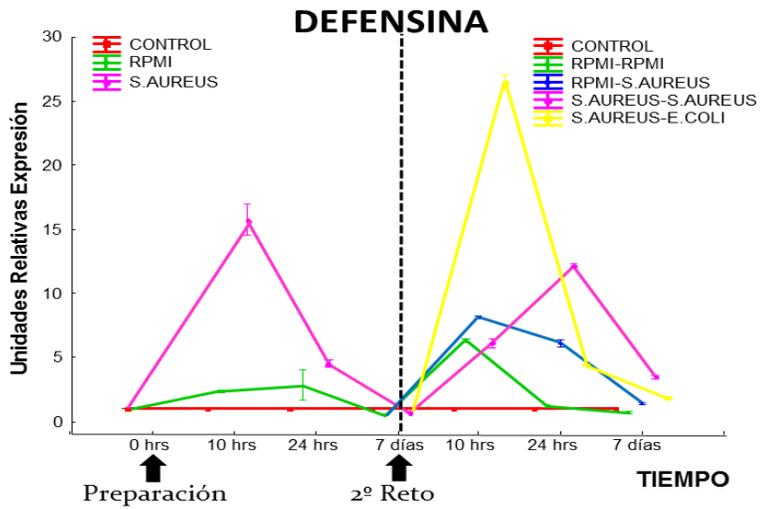
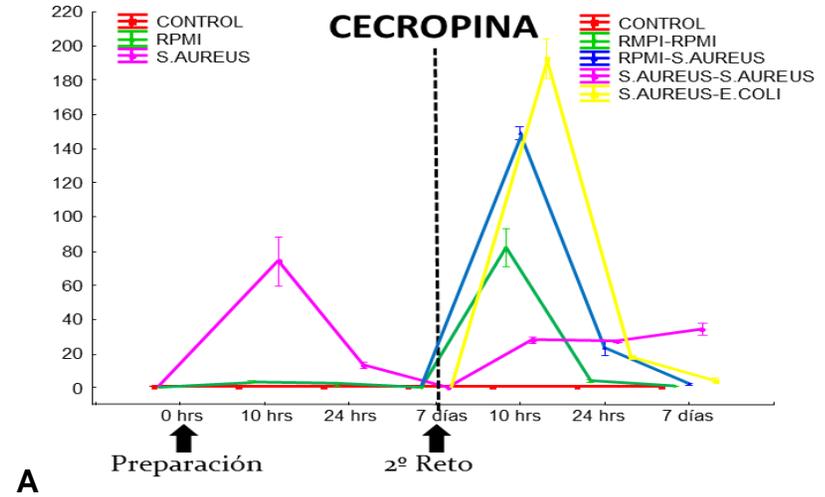
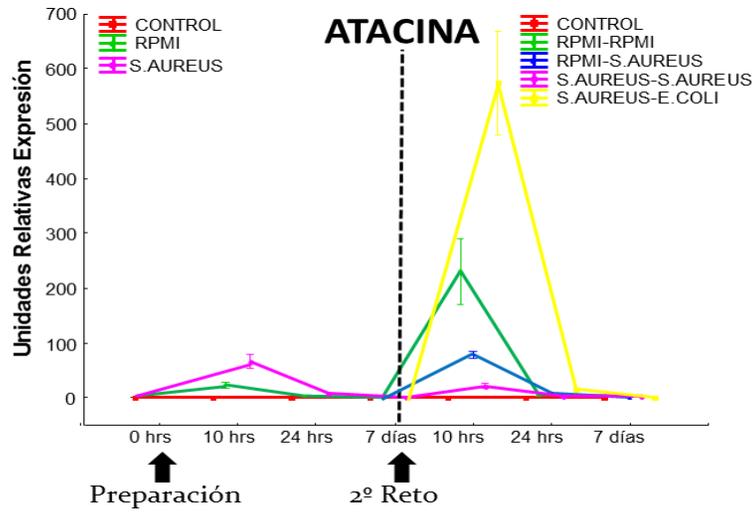
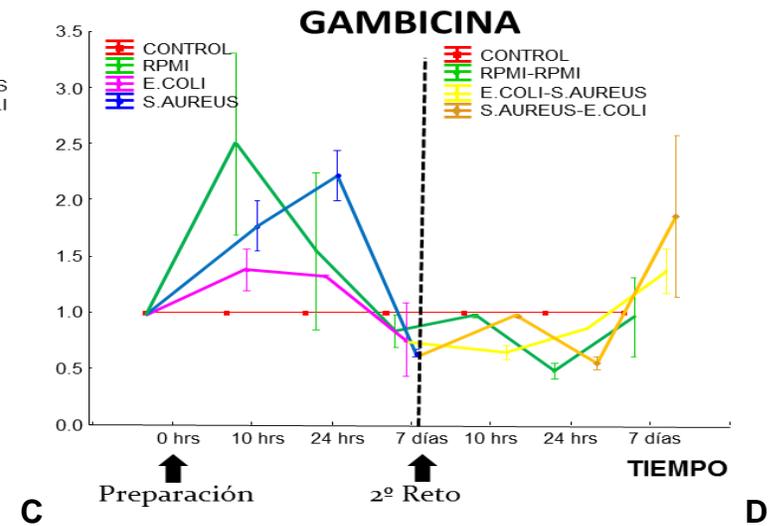
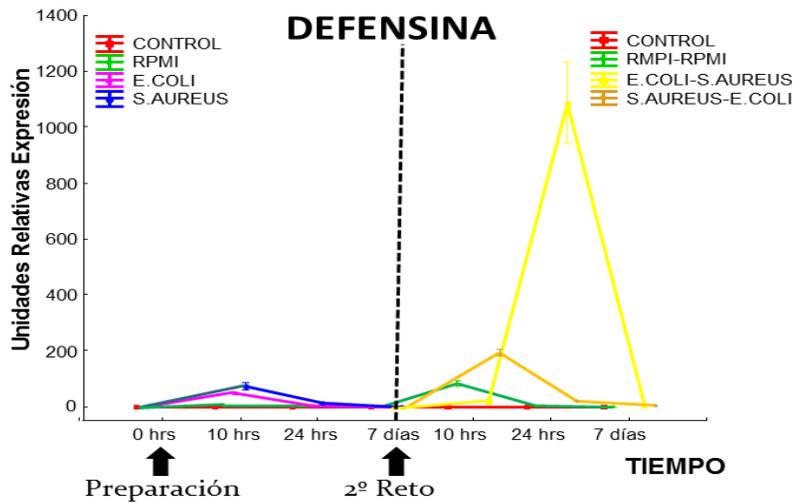
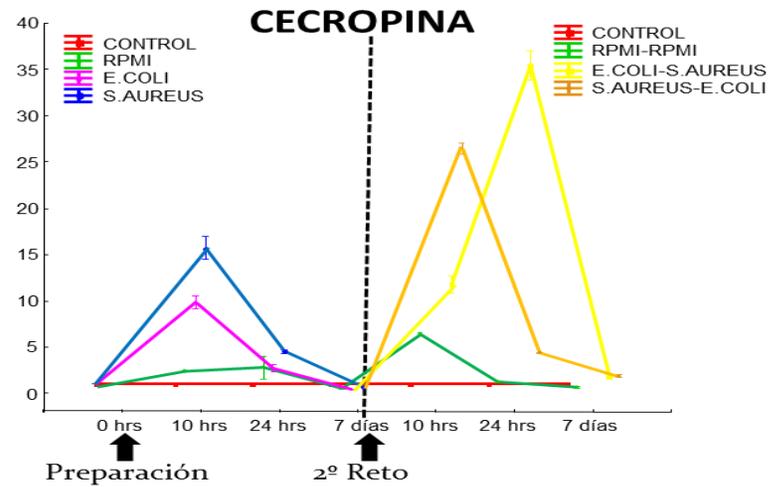
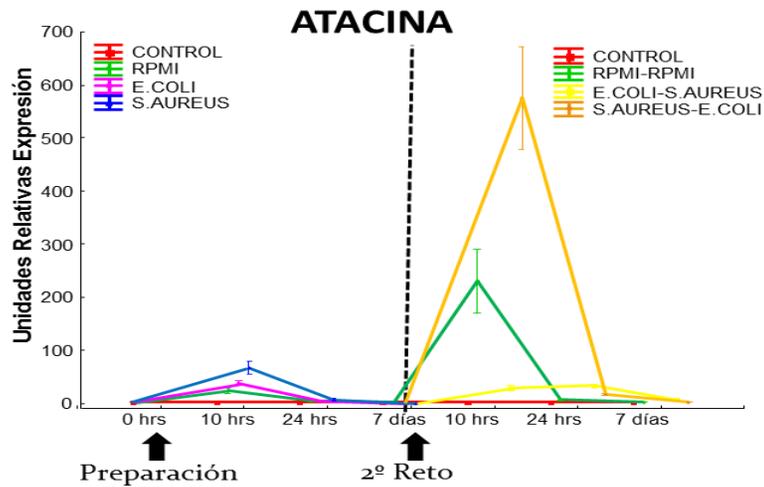


Figura 7: Expresión relativa de PAMs en *A. aegypti* durante infecciones simples con *S. aureus* antes y después de la preparación inmunológica y 2º Reto.



**Figura 8:** Expresión relativa de PAMs en *A. aegypti* durante infecciones simples y mixtas con *S. aureus* antes y después de la preparación inmunológica y 2º Reto.

Por último, se comparó la expresión relativa de los PAMs entre las diferentes infecciones mixtas E.COLI-S.AUREUS y S.AUREUS-E.COLI (Fig. 9). Se observaron diferencias significativas entre los dos tratamientos para todos los PAMs. A excepción de Gambicina no se encontró ninguna tendencia clara para este experimento. Cecropina y Defensina (Fig. 9B y C; respectivamente) tuvieron mayor expresión relativa en mosquitos E.COLI-S.AUREUS en comparación con individuos tratados S.AUREUS-E.COLI a las 24 hrs post-2º Reto ( $P=0.00001$ ; ambos PAMs); posteriormente disminuye significativamente su expresión hasta las 7 días post-infección del 2º Reto ( $P=0.00001$ ). De manera contraria, Atacina (Fig. 9A) mostró a las 10 hrs post-2º Reto mayor expresión relativa en mosquitos infectados con S.AUREUS-E.COLI en comparación con E.COLI-S.AUREUS ( $P=0.00001$ ) y ambas disminuyen significativamente a las 24 hrs post-infección del 2º Reto (con respecto a las 10 hrs;  $P=0.00001$ ).



**Figura 9:** Expresión relativa de PAMs en *A. aegypti* entre diferentes infecciones mixtas con *E. coli* y *S. aureus* antes y después de la preparación inmunológica y 2ºReto.

## DISCUSIÓN

Los resultados encontrados en supervivencia indican que existe preparación inmunológica en hembras del mosquito *Aedes aegypti*. Sin embargo, la preparación inmune es dependiente del patógeno. Cuando *E. coli* infecta a *A. aegypti* (a bajas dosis), le confiere protección al mosquito contra sí misma y contra *S. aureus*, mostrando que la preparación inmunológica no es completamente específica en *A. aegypti*, sino más generalista. Estudios recientes han mostrado preparación inmunológica no específica en términos de supervivencia, como es el caso de *Tenebrio molitor* contra infecciones en hongos (Moret y Siva-Johty, 2003) y *Drosophila melanogaster* ante infecciones contra hongos y bacterias (Pham *et al.*, 2007).

Sin embargo, los resultados demostraron que no existe preparación inmune contra *S. aureus*, ya que esta bacteria no protege al mosquito contra una reinfección por *S. aureus* o por *E. coli*. En otros insectos, como es el caso de *Formica selysi*, no presentó preparación inmunológica contra *Beauveria bassiana* (Reber y Chapuisat, 2012). Pham y colaboradores (2007) demostraron protección inmunológica en *D. melanogaster* contra *B. Bassiana*, pero no con otras bacterias. Del mismo modo, *Hetaerina americana* no mostró preparación inmunológica contra diferentes bacterias (González-Tokman *et al.*, 2010). No obstante, se ha reportado que la preparación inmunológica puede llegar a ser específica, como es el caso de *Tribolium castaneum*, que mostró preparación inmune para distintas bacterias (Roth *et al.*, 2008); así como *D. melanogaster* contra *Streptococcus pneumoniae* y *B. bassiana* (Pham *et al.*, 2007) y además se ha demostrado que puede tener un efecto prolongado de hasta por 3 semanas (Schmid-Hempel, 2005), como en *Bombus terrestris* ante tres patógenos homólogos (Sadd y Schmid-Hempel, 2006).

Algunos estudios sugieren que la preparación inmunológica dependerá del tipo de patógeno o de la especie de bacteria (Roth *et al.*, 2008), la vía de entrada del patógeno (vía oral o hemocélica) (Moreno-García *et al.*, en revisión) o el tiempo

entre la primera y segunda infección (Sadd y Schmid-Hempel, 2006). De igual forma, la dosis y virulencia del patógeno (Moret y Schmid-Hempel, 2000), los costos que conlleva la activación de la respuesta inmune (Yan *et al.*, 1997; Adamo *et al.*, 2001; Ahtiainen *et al.*, 2005), el nivel de estrés del hospedero (Schmid-Hempel, 2003; Kassahn *et al.*, 2009) y la eficiencia del reconocimiento del patógeno (Best *et al.*, 2013), también tienen repercusión en la preparación inmunológica. Dado que en este trabajo las dosis de infección, los tiempos de colecta y el modo de infección tanto para *S. aureus* como *E. coli* fueron similares, se esperaba encontrar preparación inmune en el mosquito *A. aegypti* en ambas bacterias, esto debido a las ventajas en supervivencia que la preparación inmunológica pudiera tener. Sin embargo no fue así, los factores como los distintos mecanismos de virulencia podría dificultar el reconocimiento del patógeno.

A pesar de que *E. coli* presenta mecanismos de virulencia, también es capaz de producir moléculas que podrían ser útiles al hospedero como son las colicinas, las cuales muestran efectos inhibidores sobre otras cepas potencialmente patógenas (Romero, 2007). La invasión de *E. coli* en la primera infección en el hemocele de *A. aegypti*, pudiera estar inhibiendo la patogenicidad de *S. aureus* en el 2º Reto, aunado al reconocimiento eficiente de *E. coli* por parte de la respuesta inmune del mosquito. Este reconocimiento pudiera estar asociado a los mecanismos de virulencia de *E. coli* y la estrecha interacción el patógeno y el hospedero, es decir, la interacción entre las bacterias Gram-negativas y *A. aegypti* (se explica más a detalle en el siguiente párrafo).

Best *et al.*, (2013), ha propuesto que el nivel de protección está en función del nivel de reconocimiento, por lo que es necesaria la presencia continua del patógeno a lo largo de varias generaciones para generar un adecuado reconocimiento y por lo tanto una eficiente respuesta inmune. Por ejemplo, existe evidencia que la microbiota del *A. aegypti* está compuesta principalmente de bacterias Gram-negativas en mosquitos ya que son de vida silvestre (Zouache *et al.*, 2010; Ramirez *et al.*, 2012); por tal motivo, es posible que la interacción entre las Gram-negativas

y el mosquito le confiera cierta protección a *A. aegypti* a futuras infecciones con *E. coli* y/o distintas bacterias Gram-negativas. Mientras que en *S. aureus* (que es Gram-positivos) presenta un limitado reconocimiento por parte del mosquito, debido a la poca interacción que ha existido a lo largo del tiempo entre las bacterias Gram-positivas y el mosquito. Además de que existen factores de virulencia que puedan estar suprimiendo o evadiendo la respuesta inmune del mosquito, generarían un mayor daño en *A. aegypti* y limitando la capacidad de inducción de la preparación inmune (Fig. 10). El estudio de la microbiota del mosquito cepa “Cuernavaca” está en proceso para poder evaluar la idea antes mencionada (con la amable colaboración de la Dra. María Elena Velázquez Meza, CISEI).

Se ha visto que *S. aureus* tiene la capacidad de producir coagulasa (hace que las fibrinas se aglomeren y formen un coágulo), la cual es una proteína capaz de transformar el fibrinógeno en fibrinas, originando una capa sobre la bacteria que la protege de la fagocitosis (Romero, 2007; Kaus y Perschel, 2008). Es probable que un proceso similar pudiera estar inhibiendo la capacidad fagocítica de los hemocitos (*A. aegypti* tiene proteínas relacionadas a fibrinógeno; Hanington y Zhang, 2011). Otros mecanismos de daño que presenta *S. aureus* es la presencia de adhesina, la cual es una sustancia proteica que favorece el anclaje de las bacterias a la membrana citoplasmática de las células de los tejidos, permitiendo la capacidad invasiva en el mosquito. Asimismo, la pared celular de *S. aureus* tiene como compuesto la proteína A, la cual pudiera estar interfiriendo en la opsonización y la actividad fagocítica de los hemocitos de *A. aegypti*. Por otra parte, es capaz de producir citotoxinas que causan daño a la membrana celular de las células del mosquito; además de que se ha reportado que *S. aureus* puede ser resistente al óxido nítrico, ya que produce una enzima llamada lacto-deshidrogenasa (Romero, 2007; Kraus y Perschel, 2008). Asociado a lo anterior, *S. aureus* ha sido capaz de evolucionar sus estrategias de virulencia para poder evadir los mecanismos de defensa antimicrobiana del hospedero (Kraus y Peschel, 2008). Por ejemplo, se ha visto que *S. aureus* es capaz de 1) inducir la producción extracelular de moléculas que son resistente a la actividad antimicrobiana de defensina como la producción

de la enzima fibrolítica estafiloquinasa (SAK, siglas en inglés) (Jin *et al.*, 2004); 2) producir proteasas y peptidasas capaces de degradar a los PAMs (Sieprawska-Lupa *et al.*, 2004); 3) alterar o modificar la estructura y fluidez de la membrana (Kupferwasser *et al.*, 1999) y 4) la repulsión electrostática mediante la alteración de la carga de la membrana plasmática de la bacteria (Peschel *et al.*, 2001). Por lo tanto, es probable que *S. aureus* esté evadiendo la actividad antimicrobiana de los PAMs del mosquito *A. aegypti*, mediante los mecanismos de virulencia mencionados anteriormente.

Además, es importante mencionar que el estrés causado por las repetidas reinfecciones pudieran estar inmunosuprimiendo la respuesta inmune de *A. aegypti*, lo cual le permite a *S. aureus* un mejor desarrollo en la colonización e infección en el mosquito, y además presenta factores de virulencia que suprimen la respuesta inmune del hospedero. Se ha visto en otros insectos que el estrés causado por las repetidas reinfecciones de patógenos, inmunosuprimen la respuesta inmune del hospedero (Lin *et al.*, 2007; Kraus y Peschel, 2008). Sin embargo, la inmunosupresión no sucede en infecciones con *E. coli*, ya que existe el reconocimiento del patógeno desde la primera infección, aunado a que hasta ahora no se conocen mecanismo de virulencia de *E. coli* que supriman la respuesta inmune de *A. aegypti*.

Por lo tanto, es posible que los factores de virulencia de *S. aureus* sean distintos a los de *E. coli*, y esto probablemente esté relacionado con la eficiencia del reconocimiento de *A. aegypti* y las diferencias en los mecanismos de daño de los patógenos. Esto implica una mayor oportunidad de daño de *S. aureus* impidiendo la inducción de la preparación inmune ante una segunda reinfección, mientras que en el caso de *E. coli* es reconocido por la respuesta inmune del mosquito, lo cual impide el daño causado por *E. coli* y por lo tanto se induce la preparación inmunológica contra la misma (Fig. 10).

*A. aegypti* activa los PAMs contra infecciones bacterianas dependiente de la dosis letal (Hillyer *et al.*, 2005; Castillo *et al.*, 2011), siendo las dosis altas ( $5 \times 10^5 - 1 \times 10^6$  bacteria por mosquito) las que cuentan con mayor expresión de péptidos (Bartholomay *et al.*, 2004). Sin embargo, en este trabajo se demostró la activación de la respuesta inmune del mosquito mediante la inducción de la expresión relativa de PAMs ante una dosis baja de infección tanto en *E. coli* como en *S. aureus*. Coggins y colaboradores (2012), reportaron en *A. aegypti* una mayor expresión en Cecropina y Defensina en comparación con *A. gambiae*, ante diferentes dosis de infección con *E. coli*, *S. aureus* y otras bacterias. Además, se han demostrado para otros insectos la activación de la expresión de PAMs ante diferentes dosis de infección en distintas bacterias y otros patógenos (Hoffman y Reichhart, 2002; Haine *et al.*, 2008; Contreras-Garduño *et al.*, en revisión). En este trabajo, se encontró una activación de la respuesta inmune de *A. aegypti* para ambas bacterias. Sin embargo, los resultados indicaron una mayor expresión de PAMs cuando son activados por *S. aureus* a diferencia de *E. coli*, probablemente debido al grado de daño que pueda estar causando *S. aureus* en el mosquito, como ya se ha mencionado anteriormente. Esto a su vez, sostiene la hipótesis en la cual se sugiere que *S. aureus* presenta mecanismos de daño distintos a *E. coli*, a pesar de que las dosis bajas de infección en el primer reto en ambas bacterias son similares en términos de supervivencia. No obstante, la activación de los PAMs no es suficiente para la inducción de la preparación inmunológica en *A. aegypti*, probablemente debido al deficiente reconocimiento de *S. aureus* aunado a que existe una menor interacción entre las bacterias Gram-positivas y el mosquito. Debido a que la microbiota del mosquito está compuesta principalmente por bacterias Gram-negativas (Ramírez *et al.*, 2013), no confiere protección al mosquito contra futuras infecciones con *S. aureus* y/o distintas bacterias (Fig. 10).

En este trabajo se observó que ante reinfecciones simples (segundo reto 7 días post-preparación) con *E. coli* dosis alta, se mantiene la expresión de los PAMs necesarios para controlar o eliminar a *E. coli*, sin necesidad de incrementar su expresión, mientras que los mosquitos que no tuvieron un contacto previo con *E.*

*coli*, produjeron mayor número de transcritos para poder controlar o eliminar la bacteria, debido a la gran cantidad de bacteria con que fue infectado el mosquito (LD<sub>65</sub>). Sin embargo, se demostró que a pesar de que hay una mayor expresión de transcritos en Atacina, Cecropina y Defensina en individuos sin preparación inmunológica de *E. coli* (ej. RPMI-E.COLI), la supervivencia es menor. Esto se debe probablemente a que el número de transcritos producidos por *A. aegypti* no son suficientes para poder controlar o eliminar a *E. coli* ante una dosis alta de infección (DL<sub>65</sub>), mientras que la inmunización previa con *E. coli* optimiza la respuesta inmune ante un segundo contacto. Por un lado, se reducen los costos energéticos que conlleva producir mayor número de PAMs y, por otro lado, evitar una probable autorreactividad en el mosquito debido a la intensa producción de moléculas antimicrobianas. Es decir, que la intensa expresión de los PAMs para eliminar a *E. coli* sin previa inmunidad en *A. aegypti*, pudiera tener efectos negativos en la adecuación del mosquito, por ejemplo, efectos autoinmunes (i.e. inmunopatología) (Graham *et al.*, 2005; Bergstrom y Anita, 2006).

*E. coli* indujo una mayor expresión de PAMs en el 2º Reto en comparación con la expresión durante la preparación inmunológica; esto se debe a que probablemente hay un mejor reconocimiento del patógeno, montando una apropiada expresión de los péptidos para poder controlar a *E. coli*. Estos resultados sostienen la hipótesis de que *E. coli* induce la preparación inmunológica en *A. aegypti* no solo en supervivencia, sino también en términos de expresión (óptima) de transcritos de PAMs (Fig. 10). Además, es importante mencionar que existen otros componentes de la respuesta inmune que no se tomaron en cuenta en este trabajo que pudieran estar involucrados en la preparación inmunológica, como es la actividad antimicrobiana de las especies reactivas de oxígeno, FO, ON, entre otros; pero principalmente en la respuesta humoral mediada por hemocitos (Rodríguez *et al.*, 2010).

Actualmente, son pocos los estudios que han demostrado un incremento en la expresión de PAMs ante reinfecciones en insectos. Contreras-Garduño y

colaboradores (en revisión), mostraron una mayor expresión de transcritos de Cecropina y Gambicina en *An. albimanus* ante una segunda reinfección con *Plasmodium berghei*. No obstante, existen estudios que han evidenciado la preparación inmunológica en otros mecanismos de defensa que inducen un incremento cuantitativo de la respuesta inmune después de una reinfección, como es el caso de *D. melanogaster*, la cual se encontró una sobre expresión de las vías de señalización Toll e IMD (Boutros *et al.*, 2002). En *An. gambiae* se demostró un incremento en el número de granulocitos ante reinfecciones con *P. falciparum* (Rodrigues *et al.*, 2010). Sin embargo, en este trabajo se demostró lo contrario en *S. aureus*, con una disminución de la expresión de PAMs en el 2º Reto en comparación con la primera infección. Esto probablemente se debe a que *S. aureus* está evadiendo la expresión de los PAMs y/o suprimiendo la respuesta inmune del mosquito a través de los mecanismos de virulencia de *S. aureus*, como ya se mencionó anteriormente.

A pesar de que ambas bacterias presentan la misma dosis letal en el 2º Reto, *S. aureus* no mostró preparación inmunológica ante reinfecciones simples. Los resultados indicaron menor expresión de PAMs en comparación con mosquitos que no tuvieron un contacto previo con *S. aureus*, a excepción de Defensina, que mostró mayor expresión relativa de mRNA. Según lo anterior, se ha demostrado que Defensina tiene mayor actividad antimicrobiana contra Gram-positivas, a diferencia de los demás PAMs (Lowenberger *et al.*, 1995; Hillyer *et al.*, 2003; Bartholomay *et al.*, 2004; Bulet y Stocklin, 2005); sin embargo, sigue siendo insuficiente la expresión de los transcritos debido al daño que *S. aureus* pudiera causar, aunado al efecto autoinmune que puede estar ocasionando la intensa expresión de PAMs y la gran cantidad de UFC con que fueron infectados los mosquitos en el 2º Reto (LD<sub>65</sub>).

En reinfecciones mixtas tanto en mosquitos que fueron infectados previamente con *E. coli* como con *S. aureus*, hubo una mayor expresión de PAMs en comparación con reinfecciones simples. Probablemente esto se deba a: 1) que la respuesta

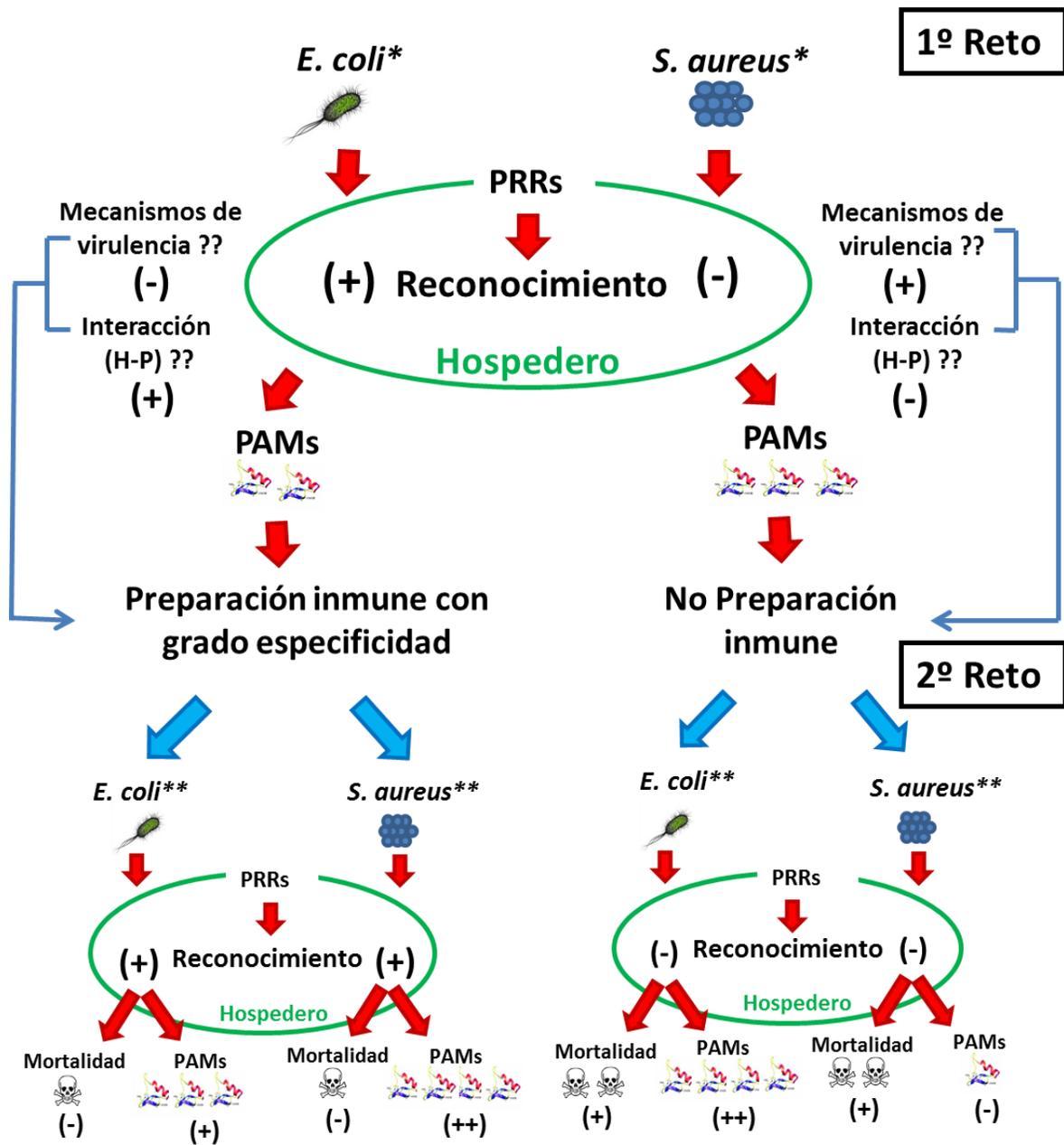
inmune del mosquito es capaz de reconocer o no al segundo patógeno dependiendo del primer activador de la respuesta inmune; es decir, cuando *A. aegypti* es infectado previamente con *E. coli*, permite que la respuesta inmune reconozca a un segundo patógeno, mientras que cuando el mosquito es infectado primeramente con *S. aureus*, no es capaz de reconocer a un segundo patógeno; 2) que es necesario incrementar el número de transcritos debido a la alta dosis de infección en el 2º Reto y 3) debido a la bacteria con la cual se indujo la preparación inmunológica; es decir que, *E. coli* induce la preparación inmunológica contra otras bacterias, mientras que *S. aureus* no (ver siguiente párrafo). El incremento de los transcritos en los grupos con infecciones mixtas inmunizados con *S. aureus*, no correlaciona con el éxito en supervivencia. Los grupos con infecciones mixtas con mayor expresión de péptidos, son los que muestran mayor mortalidad en comparación con infecciones simples (ej. E.COLI-E.COLI). Como se menciona en párrafos anteriores, es posible que efectos en el incremento en la respuesta inmune del mosquito tengan como consecuencia efectos negativos sobre *A. aegypti*, por ejemplo un alto gasto de recursos y alta autorreactividad (Fig. 10).

Se mostró que la expresión diferencial de PAMs entre las diferentes infecciones mixtas, dependerá del activador de la respuesta inmune de *A. aegypti*; es decir, que la expresión de PAMs será mayor o menor dependiendo de la bacteria con que fue infectado primero el mosquito (Fig. 10). Por ejemplo, Defensina y Cecropina, mostraron mayor expresión en mosquitos que fueron infectados por primera vez con *E. coli* (dosis baja) que mosquitos infectados previamente con *S. aureus*, mientras que Atacina demostró lo contrario. Probablemente esto se deba a que cada péptido antimicrobiano mantiene mayor afinidad con ciertos patógenos mediante la unión entre el péptido y los componentes de la membrana plasmática de la bacteria (LPS, lipopolisacáridos para Gram-negativas y PGLU, peptidoglucano para Gram-positivas) (Hillyer, 2010). Además, es importante mencionar que cada péptido antimicrobiano juega diferentes roles en la respuesta inmune del mosquito; por ejemplo, Defensina tiene mayor afinidad contra Gram-positivas (Lowenberger, 2001; Bartholomay *et al.*, 2004), mientras que Atacina

(Hultmark *et al.*, 1983; Ramírez *et al.*, 2012), Cecropina (Lowenberger *et al.*, 1999) y Gambicina (Vizioli *et al.*, 2001; Dong *et al.*, 2006) tienen mayor actividad bactericida contra las Gram-negativas. También, se ha reportado que Defensina no solo tiene actividad bacteriolítica, sino también propiedades quimiotácticas, que le permiten modular y mejorar la respuesta inmune del mosquito (Rivas-Santiago *et al.*, 2005), lo cual puede estar estrechamente relacionado con la preparación inmunológica en *E. coli*.

Por otro lado, se observó que el daño causado tanto en la primera como en la segunda inyección con RPMI, indujo la activación de la respuesta inmune en la expresión de los PAMs y en supervivencia. Basados en el modelo de daño de Matzinger (2002), se ha propuesto que la magnitud del daño también es censado por moléculas de señalización y está correlacionado con cierta magnitud de respuesta inmune en insectos (Moreno-García *et al.*, en prensa).

Finalmente, se propone que la preparación inmunológica contra *E. coli* en el mosquito *A. aegypti*, posiblemente se deba a un mejor reconocimiento de *E. coli* por parte de la respuesta inmune del mosquito. Probablemente dicho reconocimiento este asociado a la estrecha relación evolutiva con bacterias Gram-negativas más que con bacterias Gram-positivas (Fig. 10), debido a que la composición principal de la microbiota de *A. aegypti* está mayormente representada por Gram-negativas.



**Figura 10:** Modelo de preparación inmunológica con cierto grado de especificidad inducida por *E. coli* y no inducción de preparación inmunológica por *S. aureus* en *A. aegypti*. \*Dosis no letal, \*\*Dosis letal. H-P: Interacción evolutiva Hospedero-Patógeno.

## CONCLUSIONES

- Se encontró preparación inmunológica en *Aedes aegypti* dependiente del patógeno que indujo la respuesta inmune del mosquito, debido al reconocimiento del patógeno en la primera infección.
- *A. aegypti* mostró cierto grado de especificidad inmunológica en mosquitos infectados previamente con *E. coli*, dado que protege tanto para sí misma como para *S. aureus*.

## ANEXOS

### Anexo I: Extracción RNA mosquito entero.

1. Macerar 10 mosquitos con 500  $\mu$ l de Trizol (Invitrogen) por muestra, mantener los tubos en hielo (utilizar pistilos por cada tratamiento y limpiar con RNase Zap para cada muestra)
2. Incubar durante 5 min en temperatura ambiente (TA)
3. Agregar 100  $\mu$ l de cloroformo y vortex durante 20 seg
4. Incubar durante 5 – 15 min a TA
5. Centrifugar 15 min a 13 000 rpm a 4°C
6. Recuperar la fase acuosa de arriba (evitar tomar la fase intermedia), colocarla en otro tubo eppendorf 1.5 ml
8. Incubar 1 hora a 37°C y mezclar gentilmente.
9. Agregar 100  $\mu$ l de isopropanol absoluto (mezclar gentilmente)
10. Incubar durante 10 – 15 min a TA (Se puede almacenar a -20°C, por si hay poco tiempo).
11. Centrifugar 10 min a 13 000 rpm a 4°C
12. Retirar el sobrenadante con cuidado y lavar con 100  $\mu$ l de etanol al 75%
13. Centrifugar durante 10 min a 13 000 rpm a 4°C
14. Retirar el etanol y dejar secar a TA durante 30 min (colocar los tubos poca abajo sobre papel absorbente). Si es necesario centrifugar un poco y retirar el etanol con la pipeta.
15. Resuspender el pellet en 100  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>DEPEC</sub> (utilizar la pipeta para resuspender, cuidadosamente)
16. Almacenar el RNA<sub>Total</sub> a -70°C.

## LITERATURA CITADA

- Adamo S.A., Jensen M. Younger M. 2001. Changes in lifetime immunocompetence in male and female *Gryllus texensis* (formerly *G. integer*): trade-offs between immunity and reproduction. *Animal behavior*. 62: 417-425
- Ahtiainen J.J., Avatalo R.V., Kortet R. y Rantala M.J. 2005. A trade-off between sexual signalling and immune function in a natural population of the drumming wolf spider *Hygrolycosa rubrofasciata*. *Journal Evolution Biology*. 18: 985-991
- Apóstol, B.L., Black, W.C., Reiter, P. y Miller, B.R. 1994. Use of randomly amplified polymorphic DNA amplified by polimerasa chain reaction to estimate the number of *Aedes aegypti* families at oviposition sites in San Juan. Puerto Rico. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 51: 89-97
- Asha, H., Nagy, I., Kovacs, G., Stetson, D., Ando, I., y Dearolf, C., 2003. Analysis of Ras-induced overproliferation in *Drosophila* hemocytes. *Genetics*. 203-215
- Badii, M.H., Landeros, L., Cerna, E., y Abreu, J.L. 2007. Ecología e historia del dengue en las Américas (Ecology and history of dengue in Americas). *International Journal Good Conscience*. 2: 309-333.
- Bartholomay, L.C., Fuchs, J.F., Cheng, L.L., Vizioli, J., Lowenberger, C. y Christensen, B.M. 2004. Reassessing the role of defensin in the innate immune response of mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Molecular Biology*. 13:125-132
- Best A., Tidbury H., White A. y Boots M. 2013. The evolutionary dynamics of within-generation immune priming in vertebrate hosts. *Journal of the Royal Society Interface*. 10: 1:10
- Blagrove, M.S.C., Arias-Goeta, C., Failoux, A. y Sinkins, S.P. 2012. Wolbachia strain wMel induces cytoplasmic incompatibility and blocks dengue transmission in *Aedes albopictus*. *Proceeding of the National Academy of Science*. 109: 255-260
- Boutros, M., Agaisse, H. y Perrimon, N. 2002. Sequential activation of signaling pathways during innate immune responses in *Drosophila*. *Developmental Cell*. 3: 1-20
- Bulet, P., Hetru, C., Dimarq, J.L., y Hoffmann, D. 1999. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Developmental and Comparative Immunology*. 23: 329-344
- Bulet, P., Stocklin, R. 2005. Insect antimicrobial peptides: structures, properties and genes regulation. *Protein and peptide letters*. 12: 3-11
- Busvine, J.R. 1975. *Arthropod Vectors of Disease*. Edward Arnold y Company, London.
- Carrada, B.T., Vázquez, V.L. y García, I.L. 1984. La ecología del dengue y el *Aedes aegypti*. *Investigación Preliminar. Tercera parte. Salud Pública de México*. 26: 297-311
- Castillo, J., Brown, M.R. y Strand M.R. 2011. Blood feeding and insulin-like peptide 3 stimulate proliferation of hemocytes in the mosquito *Aedes aegypti*. *Plos pathogens*. 7: 1-13
- Castillo, J., Robertson, A. y Strand, M. 2006. Characterization of hemocytes from the mosquitoes *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry Molecule Biology*. 891–903
- Christophers, S.R. 1960. *Aedes aegypti* (L): the Yellow Fever Mosquito: its Life History, Bionomics and Structure. Cambridge University Press, Cambridge.
- Christophides, G et al., 2002. Immunity-related genes and gene families in *Anopheles gambiae*. *Science*. 298: 159-165
- Clarke, T. 2002. Dengue virus: break-bone fever. *Nature*. 416: 672-674
- Clements, A.N. 1999. *The Biology of Mosquitoes*. Cabi, Wallingford. UK
- Coggins, S.A., Estévez-Lao, T.Y. y Hillyer, J.F. (2012). Increased survivorship following bacterial infection by the mosquito *Aedes aegypti* as compared to *Anopheles gambiae* correlates with increased transcriptional induction of antimicrobial peptides. *Developmental and Comparative Immunology*. 37: 390-401

- Contreras-Garduño, J., Rodríguez, M.C., Rodríguez M.H., Alvarado, A., Izquierdo, J., Herrera-Ortiz, A., Herrera-Saldívar y Lanz-Mendoza, H. (en preparación). The immune priming in *Anopheles albimanus* against *Plasmodium* is analogous to the adaptative immune response.
- Dong Y., Aguilar R., Xi Z., Warr E., Mongin E., Dimopoulos G. 2006. *Anopheles gambiae* immune responses to human and rodent plasmodium parasite species. Plos Pathogens. 2: 513-525
- Foster T.J. 2005. Immune invasion by Staphylococci. Nature Reviews Microbiology. 3: 948-958
- Frolet, C., Thoma, M., Blandin, S.A., Hoffman, J.A. y Levashina, E.A. 2006. Boosting NF-kappa B-dependent basal immunity of *Anopheles gambiae* aborts development of *Plasmodium berghei*. Immunity. 25: 677-685.
- Garver, L.S., Dong, Y. y Dimopoulos, G. 2009. Caspar controls resistance to *Plasmodium falciparum* in diverse anopheline species. PLoS Pathogens. 5: 1-13
- González-Tokman, D. M., Lanz-Mendoza, H. y Córdoba-Aguilar, A. 2010. Territorial damselflies do not show immunological priming in the wild. Physiological Entomology. 35: 364-372
- Haine, E.R., Moret, M.T., Siva-Jothy y Rolff, J. 2008. Antimicrobial defense and persistent infection in insects. Science: 322: 1257
- Hancock M. E. y Sahl H.G. 2006. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. Nature Biotechnology. 24: 1551-1557
- Hanington, P.C. y Zhang, S-M. 2011. The primary role of fibrinogen-related proteins in invertebrates in defense, not coagulation. Journal of innate immunity. 3:17-27
- Hernández-Martínez, S., Lanz, H., Rodríguez, M.H., González-Ceron, L. y Tsutsumi, V. 2002. Cellular-mediated reaction to foreign organism inoculated into the hemocoel of *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae). Journal of Medical Entomology. 39: 61-69.
- Hillyer, J., y Christensen, B. 2002. Characterization of hemocytes from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. Histochemistry and Cell Biology. 117: 431-440
- Hillyer, J.F., 2010. Mosquito immunity. Invertebre Immunity. 708: 218-238
- Hoffmann, J. A. y J.-M. Reichhart. 2002. *Drosophila* innate immunity: An evolutionary perspective. Nature Immunology. 3: 121
- Hultmark D., Engstrom A., Andersson K., Steiner H., Bennich H. Boman H.G. 1983.. Attacins, a family of antibacterial proteins from *Hyalophora cecropia*. Insect immunity. 2:571-576
- Ibañez-Bernal, S. y Gomez-Dantes, H. 1995. Los vectores del dengue en México: una revisión crítica. Salud Pública de México. 37: 53-63
- Jacot , A., Scheuber, H., Kurtz, J. y Brinkhof, W.G. 2005. Juvenile immune system activation induces a costly up-regulation of adult immunity in field crickets *Gryllus campestris*. Proceeding of the Royal Society of London. Serie B. Biological Sciences. 272: 63-68
- Janeway, C.A. y Medzhitov, R. 2002. Innate immune recognition. Annu. Rev. Immunol. 20: 197-216
- Jin T., Bokarewa M., Foster T., Mitchell J., Higgins J., Tarkowski A. 2004. *Staphylococcus aureus* resists human defensina by production of staphylokinase, a novel bacterial evasion mechanism. Journal Immunology. 172: 1169-1176
- Karp, R.D. and Lawrence, A.R. 1980. Induction of specific humoral immunity to soluble proteins in the American cockroach (*Periplaneta americana*). II. Nature of the secondary response. Developmental and comparative immunology. 4: 629-639
- Klein, J. 1997. Homology between immune responses in vertebrates and invertebrates: does it exist?. Scandinavian Journal Immunology. 46: 558-564.
- Kokoza, V., Ahmed, A., Woon, S., Okafor, N., Zou, Z y Raikhel, A. 2010. Blocking of Plasmodium transmission by cooperative action of Cecropina A y Defensina A in transgenic *Aedes aegypti* mosquitoes. PNAS. 107: 8111-8116
- Kupferwasser L.I., Skurray R.A., Brown M.H., Firth N., Yeaman M.R. Bayer A.S. 1999. Plasmid-mediated resistance to thrombin-induced platelet microbicidal protein in staphylococci: role of the *qacA locus*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 43: 2395-2399

- Lee Y.K. y Mazmanian S.K. 2010. Has the microbiota played a critical role in the evolution of the adaptive immune system?. *Science*. 24: 1768-1773
- Lin Y.C., Lauderdale T.L., Lin H.M. 2007. An outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in patients of pediatric intensive care unit and high carriage rate among health care workers. *Journal Microbiology Immunology and Infection*. 40: 325-334
- Little, T. J. y A. R. Kraaijeveld. 2004. Ecological and evolutionary implications of immunological priming in invertebrates. *Trends in Ecology and evolution (Personal edition)*: 19: 58-60
- Livak, K. y T. Schmittgen. 2001. Primer analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2(-\Delta\Delta c(t))$  method. *Methods*. 25: 402-408
- Lowenberger C., Charlet M., Vizioli J., Kamal S., Richman A., Christensen M., Bulet P. 1999. Antimicrobial activity spectrum, cDNA cloning, and Mrna expression of a newly isolated member of the cecropin family from the mosquito vector *Aedes aegypti*. *The Journal of Biological Chemistry*. 274: 20092-20097
- Lowenberger, C. 2001. Innate immune response of *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*: 31: 219-229
- Matzinger, P. 2002. The danger model: a renewed sense of self. *Science*. 296: 301-305
- Meister, S., S. Kanzok, X. Zheng, C. Luna, T. Li, N. Hoa, J. Clayton, K. White, F. Kafatos, G. Christophides y L. Zheng. 2005. Immune signaling pathways regulating bacterial and malaria parasite infection of the mosquito *Anopheles gambiae*. *Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America*. 102: 11420
- Merrit, R.W., Dadd, R.H. y Walker, E.D. 1992. Feeding behavior, natural food and nutritional relationship of larval mosquitoes. *Annual Review of the Entomology*. 37: 349-376.
- Moreno-García M, Condé R, Bello-Bedoy R, Lanz-Mendoza H. 2014. The damage threshold hypothesis and the immune strategies of insects. *Infection, Genetics and Evolution*. En prensa.
- Moreno-García M., Lanz-Mendoza, H. y Córdoba-Aguilar, A. 2010. Genetic variance and genotype-by-environment interaction of immune response and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*. 42: 111-120
- Moreno-García M., Vargas V., Ramírez-Bello I., Hernández-Martínez G., Lanz-Mendoza H. (en revisión). Bacterial exposure at larva induces immune priming with sexual immune dimorphism in the adult *Aedes aegypti* mosquito. *Plos One*.
- Moreno-García, M. 2011. Preparación Inmunológica y Aspectos de la Genética Cuantitativa de la Respuesta Inmune de *Aedes aegypti*. Tesis Doctoral, Posgrado en Ciencias Biomédicas, UNAM.
- Moret, Y. y M. T. Siva-Jothy. 2003. Adaptive innate immunity? Responsive-mode prophylaxis in the mealworm beetle, *Tenebrio molitor*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*: 270: 2475
- Moret, Y. y P. Schmid-Hempel. 2001. Entomology: Immune defence in bumble-bee offspring. *Nature*: 414: 506
- Nasci, R.S. 1986. The size of emerging and host-seeking *Aedes aegypti* and the relation of size to blood-feeding success in the field. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 2: 61-62
- Nelson, R., Fessler, L., Takagi, Y., Blumberg, B., Keene, D., Olson, P., Parker, C., y Fessler, J. 1994. Peroxidase: A novel enzyme-matrix protein of *Drosophila* development. *EMBO J*. 3438-3447
- Otvos, Jr. L. 2000. Antibacterial peptides isolated from insects. *Journal of Peptide Science*. 6: 497-511
- Perschel A., Jack R.W. Otto M. 2001. *Staphylococcus aureus* resistance to human defensin and evasion of neutrophil killing via the novel virulence factor MprF is based on modification of membrane lipids with L-lysine. *Journal of Experimental Medicine*. 193: 1067-1076

- Peschel A. y Sahl H.G. 2006. The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. *Nature Reviews. Microbiology*. 7: 529-536
- Pfaffl, M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29: 45.
- Pham, L.N., M.S. Dionne, M. Shirasu-Hiza y D. S. Schneider. 2007. A specific primed immune response in *Drosophila* is dependent on phagocytes. *PLoS Pathogens*. 3: 26
- Ramírez, B.I.E. 2013. Tolerancia inmune hacia infecciones bacterianas persistentes crónicas en mosquitos *Aedes aegypti*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma del estado de Morelos.
- Ramirez, J.L., Souza-Neto, J., Torres, R., Rovira, J., Ortiz, A., Pascale, J. y Dimopoulos, G. 2012. Reciprocal tripartite interactions between the *Aedes aegypti* midgut microbiota, innate system and dengue virus influences vector competence. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 6: 1-11
- Reber, A. y Chapuisat, M. 2012. No evidence for immune priming in ants exposed to a fungal pathogen. *PloS One*. 7: 1-6
- Rheins, L.A., Karp, R.D. y Butz, A. 1980. Induction of specific humoral immunity to soluble proteins in the American cockroach (*Periplaneta Americana*). *Developmental and comparative immunology*. 4: 477-458
- Rodríguez, J., F.A. Brayner, L.C. Alves, R. Dixit y C. Barillas-Mury. 2010. Hemocyte differentiation mediates innate immune memory in *Anopheles gambiae* mosquitoes. *Science*: 329: 1353
- Romero, 2007. Escherichia. En: *Microbiología y parasitología humana: bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias*. 3º edición. Editorial Médica Paramericana. México.
- Rott, O., Sadd, B.M., Schmid-Hempel, P. y Kurtz, J. 2008. Strain-specific priming of resistance in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Proceeding of the Royal Society B*. 1157: 1-7
- Russell R.C., Webb C.E., Williams C.R. y Ritchie S.A. 2005. Mark-release-recapture study to measure dispersal of mosquito *Aedes aegypti* in Cairns, Queensland, Australia. *Medical and Veterinary Entomology*. 19: 451-457
- Sadd, B.M. y P. Schmid-Hempel. 2006. Insect immunity shows specificity in protection upon secondary pathogen exposure. *Current Biology* . 16: 1206-1210
- Salt, G. 1957. Experimental studies in insect parasitism. The reactions of some endopterygote insects to an alien parasite. *Proceeding of the Royal Society B*. 147: 167-184
- Salt, G. 1970. Chapter 7: Cellular Reactions and Immunity. En: *The Cellular defense reactions of insects*. Cambridge University Press. Pp. 85-93
- SAS Institute Inc. 2007. JMP 7.0. North Carolina, USA.
- Schmid-Hempel, P. 2005. Evolutionary ecology of insect immune defenses. *Annual Reviews of Entomology*. 50: 529
- Sieprawska-Lupa M., Mydel P., Krawczyk K. 2004. Degradation of human antimicrobial peptide LL-37 by *Staphylococcus aureus*-derived proteinases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 48: 4673-4679
- Souza-Neto, J.A, Sim, S. y Dimopoulos, G. 2009. An evolutionary conserved function of the JAK-STAT pathway in anti-dengue defense. *Proceeding of the National Academy of Science of the United State of America*. 106: 17841-17846
- Tellez, G.A. y Castaño, J.C. 2010. Peptidos antimicrobianos. *Infection*. 14: 55-67
- Tidbury, H.J., Perderson, A.B. y Boots, M. 2010. Within and transgenerational immune priming in an insect to a DNA virus. *Proceedings of the Royal Society. Serie B. Biological Science*. 10: 1-6
- Tun-Lin, W., Burkot, T.R. y Kay, B.H. 2000. Effects of temperature and larva diet on development rates and survival of the dengue vector *Aedes aegypti* in north Queensland, Australia. *Medical and Veterinary Entomology*. 14: 31-37

- Vicente, A.M. 2006. Evaluación de la susceptibilidad del vector de la malaria *Anopheles albimanus* a la infección bacteriana. Tesis de Licenciatura. Instituto Nacional de Salud Pública. Centro de Investigaciones sobre Enfermedades Infecciosas.
- Vizioli J., Bulet P., Hoffman J.A., Kafatos F.C. Muller H-M., Dimopoulos G. 2001. Gambicin: A Novel immune responsive antimicrobial peptide from the malaria vector *Anopheles gambiae*. Proceeding of the National Academy of Science. 98: 12630-12635
- Werner, R.A. y Jones, J.C. 1969. Phagocytic haemocytes in unfixed *Galleria mellonella* larvae. Journal Insect Physiology. 15: 425-437
- Xi, Z., J.L. Ramírez y G. Dimopoulos. 2008. The *Aedes aegypti* toll pathway controls dengue virus infection. PLoS Pathogens: 4: 1-12
- Yan G., Severson D.W., Christensen B.M. 1997. Cost and benefits of mosquito refactoriness to Malaria Parasites: Implications for genetic variability of mosquitoes and Genetic Control of Malaria. Evolution. 51: 441-450
- Zou, Z., Shin, S.W., Alvarez KS et al. 2008. Mosquito RUNX4 in the immune regulation of PPO gene expression and its effect on avian malaria parasite infection. Proceeding of the National Academy of Science of the United State of America. 105: 18454-18459.
- Zouache, K., Nantenaina, F.R., Raquin, V., Tran-Van., Raveloson, L.H.R., Ravelonandro, P. y Mavingui, P. 2011. Bacterial diversity of field- caught mosquitoes, *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*, from diferent geographic regions of Madagascar. FEMS Microbiology Ecology. 75: 377–389