

Identificación y expresión del gen *myb* en el mosquito *Aedes aegypti*

Alejandra Calzada Vázquez Vela¹, Fernando García-Gil de Muñoz¹, Francisco Arenas Huertero¹, Mario Henry Rodríguez³, Fidel de la Cruz Hernández-Hernández^{1y2}

¹Universidad Simón Bolívar.

²Centro de Investigación y Estudios Avanzados-IPN.

³Instituto Nacional de Salud Pública

Resumen

Las proteínas de la familia MYB son factores de transcripción que regulan la expresión de genes implicados en controlar, entre otras funciones, la proliferación celular y la replicación. En mamíferos existen tres copias de este gen, mientras que en invertebrados como *Drosophila* se ha reportado sólo una. En este trabajo se investigó la presencia y expresión del gen *myb* en el mosquito *Aedes aegypti*, vector del dengue. Para el estudio se diseñaron oligonucleótidos específicos a partir de la base de datos del genoma de *Ae. aegypti*, para amplificar por RT-PCR un fragmento de 506 pb del gen *myb* para estudiar su expresión (*Aea-myb*). El mensajero de *Aea-myb* se estudió a lo largo del ciclo de vida y fue más abundante en el estadio larval 3; en los órganos de la hembra adulta, la expresión fue diferencial, siendo más elevada en los ovarios. La expresión de *Aea-myb* en cuerpo graso en presencia de la bacteria Gram- *Micrococcus luteus* disminuye significativamente 15 minutos post-reto y a una hora, la expresión se recupera. En contraste, en presencia de la bacteria Gram+ *Serratia marcescens* la expresión de *Aea-myb* disminuyó significativamente y se mantuvo en este nivel aun a una hora post-reto.

Palabras clave: *Aedes*; mosquito; *myb*; sistema inmune de invertebrados.

Abstract

The proteins of the MYB family are transcription factors that modulate the expression of genes involved in controlling, among other functions, cell proliferation and replication. In mammals, there are three copies of this gene, while in invertebrates, such as *Drosophila*, there is only one copy reported. In this work we investigated the presence and expression of *myb* gene in the mosquito *Aedes aegypti*, vector of dengue. For the study we designed, specific primers to amplify by RT-PCR a fragment of 506 bp of the gene *myb* starting from the genomic databases, in order to identify its expression (*Aea-myb*). We observed that during the life cycle of *Ae. aegypti*, the expression of *Aea-myb* is differential: the highest levels of expression were observed in larvae 3. In the organs of the adult female, the expression of *Aea-myb* is also differential, with the highest expression in ovaries. In presence of the Gram+ bacteria *Micrococcus luteus*, the expression of *Aea-myb* is significantly reduced at 15 minutes after exposure and recovered after one hour. In contrast, in presence of the Gram+ bacteria *Serratia marcescens*, *myb* expression decreased significantly up to one hour of exposure.

Keywords: *Aedes*; mosquito; *myb*; invertebrate immune system.

Introducción

Los miembros de la familia MYB son proteínas nucleares que funcionan como factores de transcripción. Todas estas proteínas pueden unirse a las mismas secuencias de ADN y activar a los mismos promotores, aunque tienen diferentes funciones biológicas y se expresan diferencialmente (O'Rourke *et al.*, 2008). En los genomas de los vertebrados se encuentran tres diferentes genes *myb*: *A-myb* (MYBL1), *B-myb* (MYBL2) y *c-myb* (MYB). En el caso de *Drosophila*, existe una sola copia del gen (*Dm-myb*) que se considera es el ortólogo de *B-myb* y que presenta funciones similares, principalmente las relacionadas con la proliferación celular (Davidson *et al.*, 2005).

La familia de MYB está altamente conservada a través de la evolución. Está presente en todos los vertebrados y en algunos invertebrados que se han analizado, incluso en hongos como *Dyctiostelium discoideum* (Tsujioka *et al.* (2007). El gen está identificado también en plantas como *Zea mays* (Biedenkapp *et al.*, 1998), *Arabidopsis thaliana* y *Oryza sativa*. Las plantas presentan un número mucho mayor de copias, debido a la duplicación de los genes. Estos genes están implicados en diferentes funciones biológicas como la regulación del metabolismo secundario, morfogénesis celular, crecimiento y respuesta a estrés (Jiang *et al.*, 2004 y Davidson *et al.*, 2005). En mosquitos vectores su expresión no ha sido estudiada experimentalmente, aunque aparecen como genes putativos en los borradores de sus genomas.

Todas las proteínas MYB son similares estructuralmente con tres partes definidas: a) En la región amino-terminal aparece un dominio de unión a ADN con tres repeticiones en tándem de hélice-giro-hélice llamados R1R2R3, cada uno de aproximadamente 50 aminoácidos que incluyen tres triptófanos que forman parte importante del centro hidrofóbico y dan estabilidad a la estructura de unión a ADN. Estos dominios reconocen secuencias YAACNG o YA-ACGN, donde A corresponde a la base nitrogenada adenina, C a citosina, G a guanina, Y representa a citosina o timina, y N a cualquiera de las cuatro bases (Manak *et al.*, 2002 y Gaillard *et al.*, 2002). b) una región central de transactivación, y c) un dominio de regulación en la región terminal (Manak *et al.*, 2002, Gaillard *et al.*, 2002). Las proteínas MYB presentan dominios de unión a ADN casi idénticos y presentan diferencias mayores en la región reguladora: A-MYB

y c-MYB presentan regulación negativa sobre la transcripción, mientras que B-MYB funciona como un regulador positivo (Oh *et al.*, 1999).

En mamíferos, *A-myb* se expresa principalmente en tejidos gonadales, en linfocitos B y en glándulas mamarias, mientras que *B-myb* se expresa de manera ubicua. Por otra parte, *c-myb* se expresa de manera muy notable en tejidos hematopoyéticos (Nakata *et al.*, 2007, Ray Ko *et al.*, 2008). En comparación, el ARNm de *Dm-myb* se expresa en todos los tejidos activos en mitosis a través del desarrollo, en los ovarios adultos, discos imagales, histoblastos abdominales y glándulas salivales.

MYB es un regulador importante del ciclo celular y actúa en diferentes etapas del mismo. En los vertebrados promueve la transición de la fase G1 a la fase S, y a la replicación del ADN. Además, participa en la transición entre la fase G2 y la fase M. En *Drosophila*, *Dm-MYB* regula la expresión de la ciclina B (las ciclinas son una familia de proteínas involucradas en la regulación del ciclo celular que forman complejos con las cinasas que dependen de ellas para su actividad; su concentración varía con el ciclo celular), un regulador clave de la transición G2/M (Scaria, 2008). Se cree que durante la fase S, *Dm-MYB* puede funcionar como un estabilizador de la estructura cromosómica, regulando la acción de moléculas como las histonas y otras proteínas relacionadas con la cromatina (Manak, 2002).

Por otra parte, la participación de MYB en la endoreplicación (variación del ciclo celular en la que la duplicación del material genético no está seguida de una división celular) parece ser contradictoria: niveles altos de *Dm-MYB* inhiben la endoreplicación en glándulas salivales de *D. melanogaster*. En tanto, *Dm-MYB* no se detectó en tejidos (glándulas salivales y cuerpo graso) en endoreplicación del tercer estadio larvario, lo que podría sugerir que esta proteína no es necesaria para la endoreplicación. Sin embargo, en núcleos del segundo estadio larvario, que tienen una endoreplicación más activa, *Dm-MYB* se detectó fácilmente y de manera uniforme, por lo que se creyó que podía relacionarse con la endoreplicación aunque esto no fue apoyado completamente ya que la presencia de *Dm-MYB* no correlacionó con los niveles de incorporación de Bromodeoxiuridina (BrdU) que indicaron que sólo una porción de las glándulas se encontraban en fase S (Scaria *et al.*, 2009).

En contraste, existen otros estudios que indican que Dm-MYB puede actuar como inhibidor de la endoreplicación, al evitar que las células pasen a una fase S antes de que ocurra la mitosis (Katzen *et al.*, 1998). Estas contradicciones aparentes se podrían explicar considerando que Dm-MYB forma un complejo estable con proteínas adicionales, el cual puede tener una función dual al participar en la activación y/o en la inhibición de la replicación y transcripción del ADN, lo que puede depender de la presencia o ausencia de las proteínas del complejo en una localización o contexto dado (Lewis *et al.*, 2004).

Una cuestión muy importante en la biología de los mosquitos vectores de enfermedades es cómo funciona su sistema inmune, ya que algunas cepas de insectos rechazan la invasión de agentes infecciosos en contraste a otros que no logran detener la invasión, de tal modo que el patógeno se desarrolla en el mosquito, haciéndolo capaz de transmitirlo. La respuesta inmune de los insectos es innata e inducible. La respuesta es regulada por diferentes cascadas de señalización que son activadas por el reconocimiento de moléculas en los patógenos (PAMPs).

Para la respuesta humoral existen diferentes rutas que terminan con la generación de péptidos antimicrobianos, las moléculas efectoras. Las bacterias Gram positivas y hongos activan la vía Toll y las Gram negativas, la vía Imd (Bangham *et al.*, 2006). Por otra parte, los hemocitos, las células de mayor importancia en el sistema inmune celular, tienen las funciones de encapsulación, fagocitosis y melanización como respuesta a la presencia de antígenos. Para la diferenciación de las células precursoras de hemocitos, también es necesaria la actividad de factores de transcripción reguladores de vías de señalización de las vías Toll y JAK/STAT (Davidson *et al.*, 2005, Ramet *et al.*, 2002, Bangham *et al.*, 2006).

En 2006, Hernandez-Martinez *et al.* observaron que en el cuerpo graso de mosquitos *Anopheles albimanus* ocurre síntesis de ADN en respuesta a retos inmunes y propusieron la hipótesis de la amplificación genética por endoreplicación como un mecanismo de activar genes de respuesta inmune. Por ello, dada la posible participación de *myb* en la endoreplicación y para probar la posible relación de la amplificación genética y la expresión de *Aea-myb*, en este trabajo se realizaron ensayos de expresión

en tejidos de *Ae. aegypti* sometidos a retos inmunológicos, consistentes en ponerlos a interactuar con antígenos que en otros insectos se han usado para activar la respuesta inmune (García-Gil *et al.*, 2007).

Se trabajó con hembras adultas, que son los individuos con el hábito de la hematofagia y que tienen por lo tanto, la capacidad de transmitir patógenos a hospederos vertebrados (Clements, 1992, Chapman *et al.*, 1998 y Sadaky *et al.*, 2005).

Objetivo

Identificar de manera experimental la presencia y expresión del ortólogo de *myb* en el mosquito *Ae. aegypti*, a lo largo del ciclo de vida y en distintos órganos del adulto en condiciones de reto inmunológico.

Método

Herramientas *in silico*. Las secuencias del gen y de la proteína *Aea-myb* se obtuvieron de las bases de datos disponibles en línea en el sitio VectorBase (www.vectorbase.org). Los iniciadores específicos se diseñaron con el software PRIMER3 (PRIMER3 Biology Workbench 3.2, San Diego Supercomputer Center) disponible en <http://workbench.sdsc.edu/>. El cladograma se generó a partir de un alineamiento múltiple con la herramienta CLUSTALW accesible en el sitio Biology Workbench.

Material biológico. Los mosquitos *Ae. aegypti* hembra adultos cepa Cuernavaca de tres días de edad fueron proporcionados por el insectario del Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas (CISEI) del Instituto Nacional de Salud Pública (INSP), donde se cultivaron a 28°C en condiciones estándar, a 70-80% de humedad, con fotoperíodos de 12-12h (Bonizzoni *et al.*, 2011). Las cepas bacterianas *Serratia marcescens* y *Micrococcus luteus* fueron proporcionadas por la M. en C. Martha Giles del cepario de la Facultad de Química de la UNAM.

Los oligonucleótidos iniciadores específicos que se diseñaron para este trabajo fueron los siguientes:

Iniciador Sentido: 5'- GAG TTT GGC AAG AAA CGC TC - 3'

Iniciador Antisentido: 5'- TGCTGGGTCATG TAG AGCTG - 3'

Cultivo de órganos y extracción de ARN. Los órganos de mosquitos adultos se obtuvieron por disección de la siguiente manera: los mosquitos fueron anestesiados a -20°C durante 5 minutos para facilitar su manipulación. Posteriormente, los insectos se colocaron sobre un portaobjetos con una gota de PBS (amortiguador salino de fosfatos) estéril y su manejo se hizo bajo un microscopio estereoscópico para realizar el aislamiento de los órganos internos (estómago, túbulos de Malpighi, cuerpo grasoso y ovarios). Los órganos fueron colocados inmediatamente en tubos de microfuga que contenían medio Schneider (GIBCO-BRL, Bethesda Ma. USA) en el caso de los órganos cultivados y en tubos de microfuga con nueve volúmenes de TRIZOL® (Invitrogen, Carlsbad, Ca. USA) por un volumen de tejido para la extracción inmediata de ARN.

Los órganos se colocaron en grupos de 15 en tubos de microfuga que contenían un volumen de medio Schneider. A los órganos se les agregaron las bacterias Gram + y - previamente inactivadas por temperatura (15 minutos a 95°C) y se incubaron durante diferentes tiempos: 15, 30, 60 y 120 minutos. Transcurrido el tiempo, el tejido se transfirió a un tubo estéril que contenía nueve volúmenes de TRIZOL® por un volumen de tejido para su extracción de ARN.

Expresión de *myb*. La expresión de *myb* se evaluó mediante ensayos de RT-PCR. El procedimiento se llevó a cabo en dos pasos, primero se sintetizó el cADN con la enzima SuperScript II y el oligo dT tomando como molde una alícuota de la muestra de ARN siguiendo las indicaciones del fabricante (Invitrogen). El cADN obtenido se usó para la reacción de PCR. Brevemente, 2 µl de cADN fueron utilizados como molde en cada reacción que contenía 0.5 µl de cada iniciador, 0.5 µl de dNTPs, 5 µl de amortiguador 10x, una concentración 1.5 mM de MgCl₂, 0.25 µl de Taq polimerasa (GIBCO-BRL); la mezcla se aforó a 50 µl con agua estéril.

Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: 95°C por 5 minutos una sola vez, 95°C por 30 segundos, 52.5°C por 1 minuto y 10 segundos, 72°C por 2 minutos (35 ciclos) y 72°C por 8 minutos para finalmente almacenarse a 4°C hasta su análisis por electroforesis.

Los productos de las reacciones de amplificación se resolvieron en geles de agarosa-bromuro de etidio

(García Gil, 2007) y el nivel de la expresión se llevó a cabo cuantificando mediante densitometría la intensidad de las imágenes de los geles. El equipo utilizado para el registro y densitometría de los geles fue un fotodocumentador Universal Hood II (BIO-RAD) cargado con el software QuantityOne 4.6 (BIO-RAD). Para la valoración se tomó en cuenta la intensidad de la banda seleccionada contra la intensidad de la amplificación de una banda obtenida independientemente que corresponde a un transcrito de actina que se considera un gen constitutivo, y que se corrió como control para cada muestra (García-Gil, 2007).

El valor de expresión reportado fue el resultado del cociente de la intensidad de la banda del transcrito de *myb* dividido entre el valor de actina. Se obtuvo la media de los valores de cocientes de tres repeticiones independientes y se calculó la media y la desviación estándar.

Clonación. El fragmento amplificado de ADN generado por PCR y del tamaño esperado (506 pares de bases) se insertó en el vector de clonación pCR®2.1 TOPO® siguiendo las indicaciones del fabricante (Invitrogen) y para confirmar que el amplificado correspondía a la secuencia del gen *myb* de *Ae. aegypti* se hizo secuenciación. La secuenciación del fragmento se llevó a cabo en la Unidad de Ácidos Nucléicos del CISEI-INSP utilizando iniciadores universales y el sistema ABI Prism (Perkin Elmer). La secuencia nucleotídica obtenida se visualizó con el software Chromas Lite 2.1 (Technelysium) y se comparó con las bases de datos de secuencias de *Ae. aegypti* mediante el programa BlastX.

Resultados

Características generales de *Aea-myb*. La secuencia genómica del gen *myb* registrada en la base de datos consta de 33,073 pares de bases (ID: AAEL014286); el transcrito maduro predicho a partir de esta secuencia está conformado por 8 exones y tiene una longitud de 3,543 bases (figura 1).

Figura 1. Esquema del transcrito de *myb* de *Ae. aegypti*. El transcrito maduro consta de 3,543 bases generado a partir de una secuencia genómica de 33,073 pares de bases. Las barras verticales simbolizan los 8 exones presentes en el transcrito, separados por los intrones representados por barras horizontales. Los números en la parte inferior de las barras indican el número de base en el que inicia y termina cada conexión.

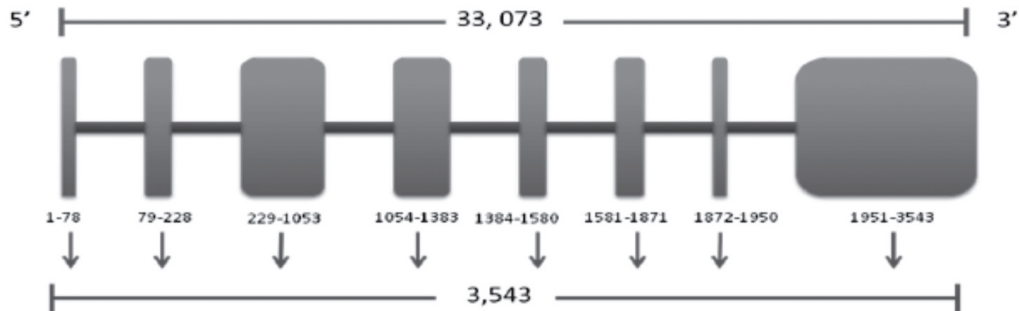
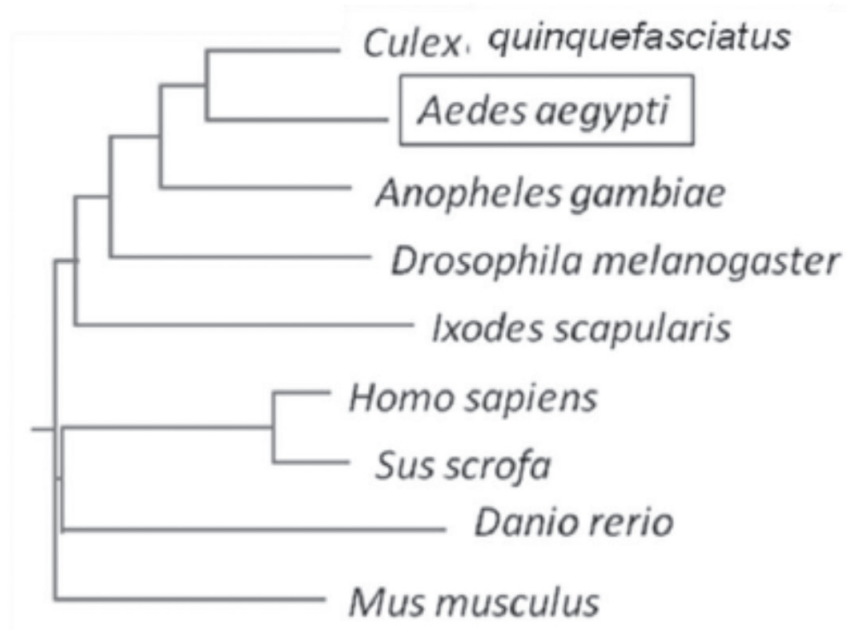


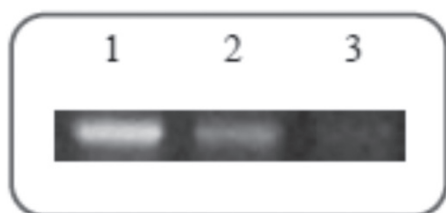
Figura 2. Cladograma que muestra las relaciones filogenéticas entre diferentes especies animales a partir de la secuencia de aminoácidos de MYB. En el cladograma se observa que las especies de insectos están en un mismo grupo y los dípteros quedan muy próximos (*Culex quinquefasciatus*, *Aedes aegypti*- mosquito tigre asiático, *Anopheles gambiae*- mosquito anofeles; *Drosophila melanogaster*- mosca de la fruta; e *Ixodes scapularis*- garrapata). Los vertebrados aparecen en un grupo aparte, con los mamíferos agrupados: *Sus scrofa*- cerdo; *Mus musculus*- ratón, *Homo sapiens*- humano.



Con el fin de estudiar a la proteína MYB desde el punto de vista evolutivo, se realizó un alineamiento múltiple de esta proteína con la de los ortólogos de diferentes especies animales. A partir de este alineamiento se hizo un cladograma que muestra de manera gráfica las relaciones filogenéticas entre las especies estudiadas (figura 2).

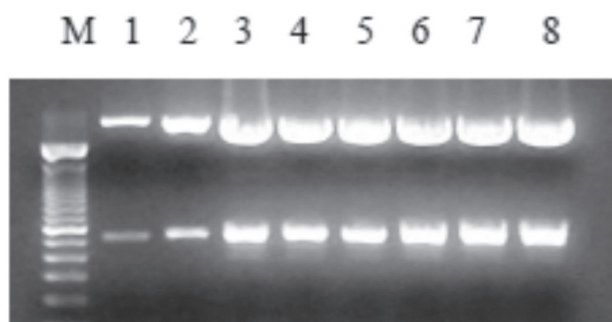
Identificación de la expresión del mensajero de *Aea-myb*. Para probar experimentalmente la existencia del transcrito del gen *myb* de *Ae. aegypti*, se realizó la amplificación por RT-PCR con iniciadores específicos diseñados a partir de la secuencia teórica de la base de datos, usando ARN de huevos y se obtuvo un fragmento del tamaño esperado de 506 pb (figura 3).

Figura 3. Amplificación de un fragmento del gen *myb* de *Ae. aegypti*. Productos de la amplificación de 506 pares de bases se obtuvieron por RT-PCR a partir de ARN de huevo (carriles 1 y 2) y se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% en amortiguador TAE 1x. (carril 3 control negativo).



Clonación del fragmento amplificado. Para confirmar que el fragmento amplificado por RT-PCR correspondía a la porción del gen *myb* esperada por el diseño de los oligonucleótidos específicos a partir de la base de datos del genoma de *Ae. aegypti*, el fragmento se ligó al vector de clonación pCR®2.1 TOPO, lo que permitió obtener ADN suficiente para secuenciar.

Figura 4. Digestión con *EcoR1* de diferentes clonas bacterianas transformadas con el plásmido que posee el inserto de *Aea-myb*. El corte con la enzima de restricción *EcoR1* liberó el inserto a partir del plásmido y éstos se analizaron en gel de electroforesis al 1.5% de agarosa. Izquierda: Marcador de tamaño de múltiplos de 100 pb. Derecha: fragmentos de 506 pb (abajo) y vector de clonación de 3.9 kb (arriba).



Para confirmar que el fragmento había sido clonado en el vector pCR®2.1 TOPO, se realizó un ensayo de restricción con la enzima *EcoR1*. La figura 4 muestra el patrón de restricción del ADN plasmídico extraído a partir de las bacterias competentes previamente transformadas. El fragmento de 3.9 kb corresponde al vector de clonación y el fragmento de 506 pb a la secuencia en estudio.

Secuenciación del fragmento. La secuencia del inserto obtenida fue comparada con las secuencias anotadas en la base de datos de NCBI mediante la herramienta BLASTN, obteniendo alta identidad (89%) con la secuencia de *myb* de *Ae. aegypti* (figura 5 y tabla 1) lo que confirmó la identidad de la secuencia en estudio.

Figura 5. Alineamiento de las secuencias obtenidas in silico y experimentalmente de *Aea-myb*. 1: secuencia clonada. 2: secuencia obtenida a partir de la base de datos. El color azul y los asteriscos representan las bases que coinciden entre ambas, mientras que el negro a las que no.

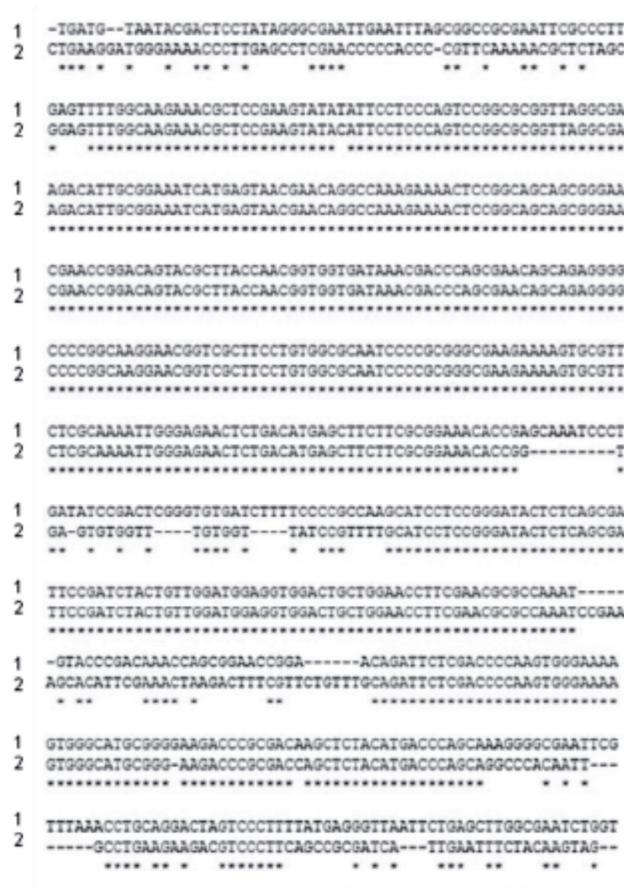


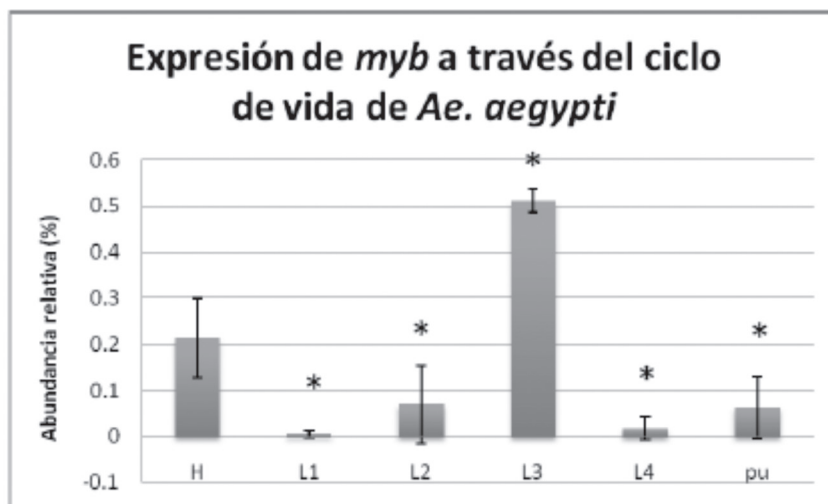
Tabla 1. Valores obtenidos por BLASTN de la comparación entre la secuencia de nucleótidos de *Aea-myb* de la base de datos y la obtenida en este trabajo

Máxima identidad	89%
Max Score	632
Cobertura	88%
Valor E	5 e ⁻¹⁷⁸

Los valores corresponden a la identidad máxima (porcentaje de nucleótidos iguales entre las secuencias) y el valor E (probabilidad de que la igualdad en la comparación se dé por azar) del alineamiento obtenido con el programa BLAST en relación a las secuencias presentes en la base de datos del NCBI.

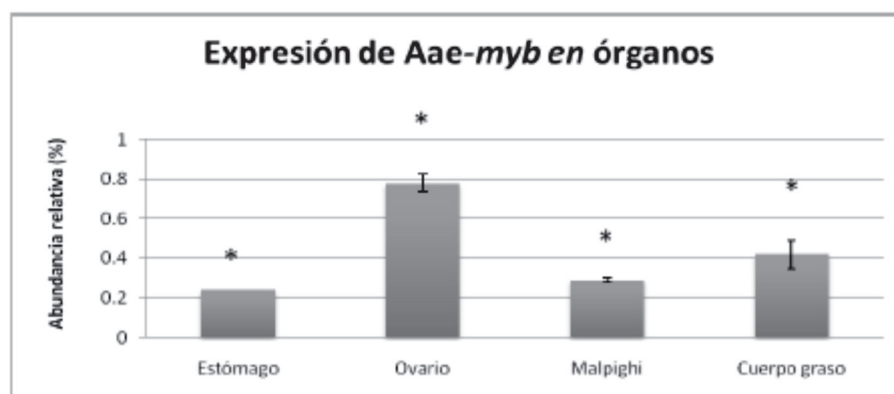
Expresión de *myb* por RT-PCR durante el ciclo de vida de *Ae. aegypti*. La expresión del ARNm de *myb* se analizó mediante RT-PCR en huevos, larvas, pupas y adultos. El mensajero de *Aea-myb* estuvo presente en todos los estadios estudiados y se observaron variaciones en la intensidad de las bandas que se cuantificaron por densitometría, tomando como control la intensidad de la amplificación del mensajero del gen de actina, considerado un gen constitutivo y de expresión constante (figura 6).

Figura 6. Análisis de la expresión de *Ae-myb* en el ciclo de la vida de *Ae. aegypti*. Se registraron por densitometría las imágenes de bandas de DNA obtenidas por RT-PCR a con los iniciadores específicos de *myb* y usando RNA de distintos estadios de desarrollo del mosquito y separados por electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de tido. Los niveles de expresión de *myb* se expresaron como el cociente de los valores de expresión de *myb* con respecto a los valores de expresión del control constitutivo de actina. H: huevo, L1: larva, L2: larva2, L3: larva3, L4: larva 4, pu: Pupa. Las barras con un asterisco * representan los valores con diferencias significativas (prueba t student) ($p < 0.05$) con respecto al tomado como basal.



Expresión de *Aea-myb* en los diferentes órganos del adulto hembra de *Ae. aegypti*. Se analizó la expresión del ARNm de *Aea-myb* en estómagos, ovarios, túbulos de Malpighi y cuerpos grasos del mosquito adulto hembra por medio de RT-PCR. Se observó que el mensajero *Aea-myb* se expresa en todos los órganos analizados y al analizar por densitometría las bandas amplificadas se encontró una expresión significativamente mayor ($p < 0.05$) en los ovarios que en el resto de los órganos (figura 7).

Figura 7. Análisis de la expresión de *Ae-myb* en diferentes órganos de *Ae. aegypti*, hembra adulta. Se disecaron estómagos, ovarios, túbulos de Malpighi y cuerpo graso de mosquitos *Ae. aegypti* adultos hembra y se analizaron por RT-PCR para la expresión de *myb*. Se registraron los niveles de expresión de *Aea-myb* y se expresaron como el cociente de los valores de *myb* con respecto al control constitutivo de actina. Las barras con asterisco * representan los valores con diferencias significativas, al ser comparados entre sí ($p < 0.05$).

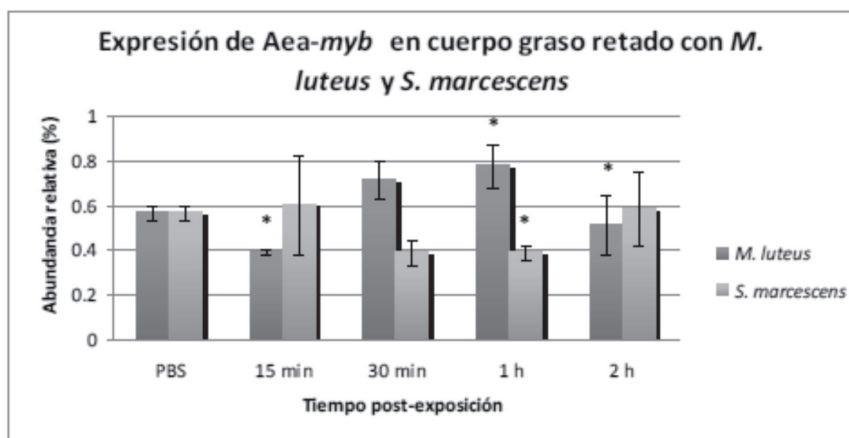


Expresión diferencial de *Aea-myb* en cuerpo graso de *Ae. aegypti* expuesta a *M. luteus* y *S. marcescens* inactivadas. Para analizar la expresión del ARNm de *myb* en condiciones de reto con bacterias, muestras de cuerpo graso de hembras adultas de *Ae. aegypti* fueron cultivados con bacterias Gram+ (*M. luteus*), y Gram- (*S. marcescens*) inactivadas por calor, durante 15, 30, 60 y 120 minutos, el ARNm se extrajo y se analizó por RT-PCR con los oligonucleótidos específicos para *myb*.

En el reto con *M. luteus* a los 15 minutos se observó una disminución significativa ($p < 0.05$) en el nivel de expresión de *Aea-myb* con respecto a la considerada como basal (órganos cultivados en presencia de PBS). A

tiempos más largos (30 y 60 minutos), se observó un claro aumento en la expresión de *Aea-myb*. Finalmente, a 120 minutos, se observó nuevamente una disminución en la expresión. Para el reto con *S. marcescens*, se identificó una disminución significativa ($p > 0.05$) en los niveles de expresión de *Aea-myb* a una hora de exposición, con respecto a la observada en niveles basales (órganos cultivados con PBS) (figura 8).

Figura 8. Análisis de la expresión de *Ae-myb* en cuerpos grasos de adultos hembras de *Ae. aegypti* bajo reto con *M. luteus* y *S. marcescens*. Se registraron por densitometría los niveles de expresión de *myb* y se expresaron como el cociente de los valores de expresión de *myb* con respecto a los valores de expresión del control constitutivo de actina. La expresión de los órganos cultivados únicamente con PBS se consideró basal. Bajo reto con *M. luteus*, la expresión de *Aae-myb* disminuyó a los 15 minutos, posteriormente aumenta en la exposición de 30 a 60 minutos, para finalmente volver a nivel basal a los 120 minutos. Bajo reto con *S. marcescens*, se observó una disminución significativa en la expresión de *Aae-myb* a los 15, 30 y 60 minutos y volvió a nivel basal a las 2 horas. Las barras con un asterisco * representan los valores con diferencias significativas con respecto al control ($p < 0.05$).



Discusión

Los miembros de la familia MYB son proteínas nucleares que actúan como factores de transcripción, uniéndose a secuencias promotoras que participan en diferentes funciones biológicas como la proliferación y diferenciación celular y la regulación del ciclo celular. Usando como modelo el insecto *D. melanogaster*, actualmente se estudia con detalle la expresión de *myb* y su efecto sobre la replicación del ADN (O'Rourke *et al.*, 2008; Ramsay y Gonda, 2008).

Para el estudio de la biología molecular del mosquito *Ae. aegypti* en la actualidad se cuenta con la base de datos de la secuencia de ADN del genoma completo, en la cual se localizó para este trabajo la posible secuencia del gen *myb* (ID: AAEL014286), posible ortólogo de *Dm-myb* de *D. melanogaster*. Esta secuencia tiene 33,073 pb y notablemente el transcrito que se predice a partir del gen es de una longitud de 3,543 pb, que corresponde sólo al 10% de la secuencia genómica.

Esta diferencia se debe a la extensión de sus intrones, posiblemente relacionados con una función reguladora (Burnette *et al.*, 2005). Se predice que el transcrito maduro de *myb* se forma con la información de 8 exones y codifica para una proteína de 706 aminoácidos (figura 1). En este trabajo, tomando como referencia el genoma anotado de *Ae. aegypti* disponible en la base de datos VectorBase, se diseñaron oligonucleótidos específicos y se estandarizaron las condiciones para la amplificación por RT-PCR de un fragmento de 506 pb localizado en la región 3' del ARNm, abarcando parcialmente los últimos dos exones. El fragmento amplificado presentó el tamaño esperado. Este fragmento se clonó y secuenció obteniendo una identidad del 89% (tabla 1), confirmando que el fragmento correspondía al reportado en la base de datos.

La familia de genes *myb* está altamente conservada a través de la evolución (Tsujioka *et al.*, 2007, Davidson *et al.*, 2005), apareciendo descritos tres genes *myb* diferentes en los genomas de vertebrados y una sola en el caso de los insectos, ortólogo de *B-myb* (Davidson *et al.*, 2005). En el presente estudio, el análisis de las relaciones

filogenéticas por alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de la proteína MYB de diferentes especies animales, muestra una cercanía evolutiva entre las especies de insectos, especialmente los mosquitos *C. quinquefasciatus* y *Ae. aegypti* los cuales comparten una mayor homología entre sí que con *An. gambiae*, y especies menos relacionadas como *D. melanogaster* (Diptera). Los vertebrados aparecen en un grupo aparte (figura 2), con *H. sapiens* y *S. scrofa* (cerdo) compartiendo la mayor homología.

En este trabajo se estudió la expresión de *Aea-myb* a lo largo del ciclo de vida del mosquito, y se observó mayor expresión en la larva del tercer estadio y con menor abundancia en la larva de primer estadio. Comparativamente, en el desarrollo de *Drosophila* se comprobó la expresión de *Dm-myb* a través de su desarrollo. Se infiere que los transcritos encontrados en huevos son de origen materno. En los siguientes estadios los niveles de expresión fueron relativamente uniformes y se expresaron en niveles altos sólo en los tejidos nerviosos. En el tercer estadio larval de *Drosophila*, los transcritos de *myb* son abundantes en todos los tejidos que contribuyen al desarrollo del adulto. En la segunda mitad de desarrollo de la pupa, no se observan transcritos de *myb* (Katzen, 1996).

En este trabajo también se estudió experimentalmente la expresión de los ARNm de *Aea-myb* en los diferentes órganos de la hembra adulta. En un estudio previo en *Drosophila* se analizó la expresión de *myb* en diferentes estadios de desarrollo, así como en los diferentes órganos de estadios inmaduros (pupa) y adulto (Katzen 1996). En ambos estadios se encontraron niveles abundantes de expresión de *myb* en los órganos reproductores tanto femeninos como masculinos, proponiendo que en el caso de los ovarios, los niveles de expresión son altos debido a la función de las células nodriza de contribuir al desarrollo de los ovocitos. En concordancia con los datos anteriores, nosotros observamos la expresión de *myb* en los diferentes órganos de hembras adultas *Ae. aegypti*, y encontramos que la expresión de este gen en los ovarios es significativamente mayor con respecto a su expresión en otros órganos como estómago, túbulos de Malpighi y cuerpo graso ($p < 0.05$).

En organismos invertebrados como *Drosophila*, se postula que la proteína MYB participa en procesos de amplificación génica, debido a que está directamente relacionada con la replicación del ADN a través de su asociación estrecha con complejos de proteínas capaces de interactuar con elementos

regulatorios del genoma (Beall *et al.*, 2002; Lewis *et al.*, 2004). En el 2002, Beall *et al.*, demostraron que las células somáticas que rodean al ovocito en desarrollo en *Drosophila*, presentan amplificación génica como resultado de ciclos repetidos de endoreplicación, contrario a lo que sucede en las mutantes de *myb* en las que no se detectó la incorporación de este nucleótido, concluyendo que Dm-MYB está implicado en la amplificación génica.

Hernández-Martínez *et al.*, (2006) observaron que en el cuerpo graso de *Anopheles albimanus* ocurre amplificación génica como resultado de retos inmunes. Para probar la posible relación de la amplificación génica y la expresión de *Aea-myb*, se realizaron ensayos de expresión en tejidos de *Ae. aegypti* sometidos a retos inmunológicos, consistentes en ponerlos a interactuar con antígenos que en otros insectos se han usado para activar la respuesta inmune (García-Gil *et al.*, 2007). Se trabajó con hembras adultas, que son los individuos con el hábito de la hematofagia y que tienen, por lo tanto, la capacidad de transmitir patógenos a hospederos vertebrados (Clements, 1992).


Al ser MYB un factor de transcripción para una gran variedad de genes, es posible que esta proteína también participe en la activación de la respuesta inmune. De acuerdo con lo anterior, en un estudio que utilizó mutantes de Dm-MYB, se observó que en ausencia de esta proteína, la proliferación de hemocitos activada por la vía JAK/STAT y por la vía Toll no puede llevarse a cabo (Davidson *et al.*, 2004).

Conclusión

En este trabajo se observó que en el cuerpo graso de *Ae. aegypti* en los primeros minutos después de la exposición a *M. luteus* (Gram +), la expresión de *myb* disminuyó y después aumentó hasta alcanzar una hora después una diferencia significativa a lo que ocurre en el reto con la bacteria Gram+ *S. marcescens* ($p < 0.05$) (figura 8). En contraste, en el ensayo en el que se retó el tejido con *S. marcescens* (bacteria Gram-) a los 15 min se observó un aumento en expresión que decayó al tiempo de una hora post exposición (figura 8).

Hasta el momento no existen reportes de una asociación entre la molécula *myb* con las cascadas de señalización Toll y JAK/STAT (Davidson *et al.*, 2005, Ramet

et al., 2002), las rutas conocidas más importantes en la respuesta inmune de los insectos (Bangham *et al.*, 2006). Sin embargo, dada la posible asociación entre endoreplicación y la activación de la expresión de *myb*, nuestros datos están de acuerdo con la hipótesis de Hernández-Martínez *et al.*, (2006) respecto al posible disparo de la endoreplicación en algunos tejidos del mosquito como parte del montaje de la respuesta inmune. Además es notable que la respuesta sea distinta ante el estímulo con bacterias Gram+ que ante bacterias Gram-, lo que es similar a lo que ocurre en las otras rutas de señalización descritas para insectos, las cuales distinguen entre diferentes tipos de bacterias, hongos, virus y protozoarios.

Para conocer con mayor detalle la función de la proteína MYB, durante la endoreplicación y su relación con la respuesta inmune es necesario hacer más ensayos, detectando el producto proteico mediante anticuerpos que permitan conocer su nivel de expresión y localización, así como su posible asociación con otros factores reguladores de la transcripción. 

Agradecimientos

Agradecemos el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT para el proyecto *Análisis y caracterización de los mecanismos de amplificación genética en la respuesta inmune de mosquitos vectores de paludismo y dengue #62389 y Efecto de las prostaglandinas en el proteoma de mosquitos vectores de enfermedades humanas #83866* e ICyT-DF proyecto *Análisis proteómico de la respuesta de mosquitos Aedes sp. hembra, potenciales transmisores de enfermedades, a agentes tóxicos*. PIFUTP09-296. Agradecemos también a Rosa Barreto y Jesús Martínez-Bartneche por la secuenciación de los fragmentos de ADN y a Romelia Orteli por la producción de los mosquitos para este trabajo.

Referencias

Bangham, J., Jiggins, F y Lemaitre, B. (2006). "Insect Immunity: The Post-Genomic Era". En *Immunity*. 25. 1-5

Beall, E., Manak, J., Zhou, S., Bell, M., Lipsick, J. y Botchan, M. (2002). "Role for a *Drosophila* Myb-containing protein complex in site-specific DNA replication". En *Nature*. 420. 833-837.

Biedenkapp, H., Borgmeyer, U., Sippel, A. y Klempnauer, K. (1988). "Viral myb oncogene encodes a sequence-specific DNA-binding activity". En *Nature*. 27. 335. 835-837.

Bonizzoni, M., Dunn, W., Campbell, C., Olson, K., Dimon, M., Marinotti, O. y James, A. (2011). "RNA-seq analyses of blood-induced changes in gene expression in the mosquito vector species, *Aedes aegypti*". En *BMC Genomics*. 28.12-82.

Burnette, J., Miyamoto, E., Schaub, M., Conklin, J. y López, J. (2005). "Subdivision of large introns in *Drosophila* by recursive splicing at non-exonic elements". En *Genetics*. 170. 661-674.

Chapman, R. (1998). *The Insects: structure and function*. Inglaterra: Cambridge University Press.

Clements, A. (1992). *The Biology of Mosquitoes. Volume 1: Development, Nutrition and Reproduction*. Inglaterra: Chapman & Hall.

Davidson, C., Tirouvanziam, R., Herzenberg, L. y Lipsick, J. (2008). "Functional Evolution of the Vertebrate Myb Gene Family B-Myb, but Neither A-Myb nor c-Myb, Complements *Drosophila* Myb in Hemocytes". En *Genetics*. 169. 215-229.

Gaillard, C., Rouzic, E., Créminon, C. y Perbal, B. (2002). "Alteration of C-MYB DNA binding to cognate responsive elements in HL-60 variant cells". En *Mol Pathol*. 55. 325-335.

García-Gil, F. (2007). *Prostaglandina E₂ y su actividad inmunomoduladora en Anopheles albimanus*. Tesis para obtener el Doctorado en Ciencias. Departamento de Patología Experimental. México: CINVESTAV.

Jiang, C., Gu, X. y Peterson, T. (2004). "Identification of conserved gene structures and carboxy-terminal motifs in the Myb gene family of *Arabidopsis* and *Oryza sativa* L. ssp.". En *Indica. Genome Biol*. 5. R46.

Katzen, A., Jackson, J., Harmon, B., Fung, S., Ramsay G. y Bishop, J. (1998). "*Drosophila* myb is required for the G2/M transition and maintenance of diploidy". En *Genes Dev*. 12. 831-846.

Lewis, P., Beall, E., Fleischer, T., Georlette, D., Link, A. y Botchan, M. (2004). "Identification of a *Drosophila* Myb-E2F2/RBF transcriptional repressor complex". En *Genes Dev*. 18. 2929-2940.

Manak, R., Mitiku, N. y Lipsick, S. (2002). "Mutation of the *Drosophila* homologue of the Myb protooncogene causes genomic instability". En *PNAS*. 99. 7438-7443.

O'Rourke, J. y Ness, S. (2008). "Alternative ARN Splicing Produces Multiple Forms of c-Myb with Unique Transcriptional Activities". En *Mol and Cell Biol*. 28. 2091-2101.

Oh, I. y E. Premkumar. (1999). "The myb-gene family in cell growth, differentiation and apoptosis". En *Oncogene*. 18. 3017-3033.

Ramsay y Gonda, T. (2008). "MYB function in normal and cancer cells". En *Nature Reviews Cancer*. 8. 523-534.

Ray, K., Ko, D., Chen, C. y Lipsick, J. (2008). "A conserved acidic patch in the Myb domain is required for activation of an endogenous target gene and for chromatin binding". En *Mol Cancer*. 7.77.

Scaria, G., Ramsay, G. y Katzen, A. (2008). "Two Components of the Myb complex, DMyb and Mip130, are specifically associated with eucromatin and degraded during prometaphase throughout development". En *Mech Dev*. 125. 646-661.

Tsujioka, M., Zhukovskaya, N., Yamada, Y., Fukuzawa, M., Ross, S. y Williams, J. (2007). "*Dictyostelium* Myb Transcription Factors Function at Culmination as Activators of Ancillary Stalk Differentiation". En *Eukaryot Cell*. 6. 568-570.