

## Efecto de Prostaglandina E<sub>2</sub> en la expresión de proteínas en los estómagos de mosquitos hembras de *Anopheles albimanus*

*Prostaglandin E<sub>2</sub> effect on protein expression in mosquito female midguts of Anopheles albimanus*

Alejandra del Pilar Ochoa-Franco<sup>1</sup>, Fidel de la Cruz Hernández-Hernández<sup>1,2</sup>,  
Fernando García-Gil de Muñoz<sup>1</sup>, Mario Henry-Rodríguez<sup>3</sup> y Febe E. Cázares-Raga<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Facultad de Ciencia y Tecnología, Escuela de Biología, Universidad Simón Bolívar, México

<sup>2</sup> Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, CINVESTAV-IPN, México, D. F.

<sup>3</sup> Centro de Investigación sobre Enfermedades Infecciosas, INSP, Cuernavaca, Morelos, México.

mostruo\_8a@hotmail.com

cruzacruz@cinvestav.mx

fgarcia@bolivar.usb.mx

mhenry@insp.mx

fczares@cinvestav.mx

Recepción: 18 de junio de 2013

Aceptación: 14 de octubre de 2013

(pp. 103 - 111)

### Resumen

La malaria es la enfermedad parasitaria más importante del mundo; en México hay casos producidos por *Plasmodium vivax* transmitido por mosquitos *Anopheles albimanus*. Mediante electroforesis bidimensional se analizó el cambio en expresión de proteínas de estómagos de *An. albimanus* hembra por efecto de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) y seis de ellas se identificaron por espectrometría de masas. La ATPasa mitocondrial y la calreticulina disminuyeron su concentración, sugiriendo cambios del metabolismo energético y señalización celular. Tres isoformas de actina y una serina proteasa aumentaron, indicando modificaciones en citoesqueleto y respuesta inmune.

**Palabras clave:** Mosquito hembra; prostaglandina E<sub>2</sub>; *Anopheles albimanus*; proteómica.

### Abstract

Malaria is the most important parasitic disease in the world; in México there are cases produced by *Plasmodium vivax* transmitted by *Anopheles albimanus* mosquitoes. In this work, the effect of prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) on protein profiles of *An. albimanus* female mosquito midguts was studied by mean of bidimensional electrophoresis and six of them were mass spectrometry identified. Mitochondrial ATPase and calreticulin diminished their concentration suggesting effect on energetic metabolism and cell signaling. Three actin isoforms and one serine protease increased their expression suggesting cytoskeleton rearrangements and activation of immune response.

**Keywords:** Female mosquito; prostaglandin E<sub>2</sub>; *Anopheles albimanus*; proteomics.

## Introducción

Muchas enfermedades emergentes y reemergentes son transmitidas por vectores artrópodos. En particular, millones de personas alrededor del mundo se enferman y mueren cada año por enfermedades transmitidas por mosquitos vectores, como malaria, dengue, enfermedad del oeste del Nilo, entre otras. Las enfermedades transmitidas por mosquitos causan gran impacto económico y social, especialmente en países tropicales, incluido México (McGraw y O'Neal, 2013). La malaria es causada por protozoos del género *Plasmodium* y es transmitida por un mosquito vector anofelino y es la enfermedad infecciosa más importante en salud pública en el mundo, con más de 219 millones de casos y 660,000 muertes/año (WHO, World Malaria Report 2012).

Los mosquitos hembra requieren una alimentación con sangre para el desarrollo de los huevos, y es durante la ingestión de sangre que los parásitos infectan a los mosquitos. Por esta razón, la primera interacción entre el parásito y el mosquito es en el estómago del insecto donde el *Plasmodium sp.* se desarrolla sexualmente al tiempo que activa una respuesta inmune. Posteriormente el parásito viaja a las glándulas salivales, en espera de que el mosquito pique a un humano sano (Miller et al., 2013).

Las prostaglandinas (PG) son metabolitos del ácido araquidónico con función hormonal en varios tipos de organismos, incluyendo vertebrados e invertebrados, que afectan una amplia variedad de actividades homeostáticas. En los invertebrados, incluidos los insectos, las PGs influyen sobre los mecanismos efectores de la respuesta inmune ante microorganismos invasores, como fagocitosis, microagregación, nodulación y encapsulación (Stanley et al., 2012). En la línea celular BCIRL-HzAM1 derivada de pupas de *Helicoverpa zea* (lepidóptero plaga en la agricultura), se observó por métodos proteómicos que las prostaglandinas modifican la expresión de proteínas relacionadas con funciones celulares diversas: inmunidad, metabolismo y procesamiento de nucleótidos, entre otras (Stanley et al., 2012). La prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) es sintetizada en varios órganos de los mosquitos y es generada a partir del ácido araquidónico por la acción de ciclooxigenasas y PGE sintetasas (Legrer et al., 2010). En estudios realizados en estómagos de mosquitos *Anopheles albimanus*, uno de los principales vectores de *Plasmodium vivax*, agente causal de

la malaria en México (Sinka et al., 2010; Carlton et al., 2011), se observó que la PGE<sub>2</sub> coordina la producción de péptidos antimicrobianos (García-Gil et al., 2008). Sin embargo, en los mosquitos se desconocen los mecanismos de regulación en la expresión de proteínas efectuada por PGE<sub>2</sub> y qué efectos puedan tener sobre la fisiología del insecto.

## Objetivo

En este trabajo, mediante estrategias proteómicas, se buscó analizar el efecto de PGE<sub>2</sub> sobre la expresión de proteínas en estómagos de mosquitos *An. albimanus* cultivados *ex vivo*. Entre las proteínas cuya expresión fue afectada por la presencia de PGE<sub>2</sub>, se encuentran proteínas de citoesqueleto, de respuesta a estrés, del metabolismo energético y de procesamiento de proteínas.

## Método y materiales

**Organismos.** Los mosquitos *An. albimanus* fueron proporcionados por el insectario del Centro de Investigación sobre Enfermedades Infecciosas del Instituto Nacional de Salud Pública (CISEI-INSP), con sede en Cuernavaca, Morelos. Los mosquitos se cultivaron a 23-28° C y 70-80% de humedad relativa y alimentados con una solución azucarada al 10% (González-Cerón et al., 2000). En este estudio sólo se utilizaron mosquitos adultos hembras de 3 a 5 días después de la emergencia

**Disección de estómagos.** Para obtener los estómagos, los mosquitos fueron inmovilizados a -20° C durante 1 minuto, se colocaron sobre un portaobjetos que se mantuvo sobre hielo durante el proceso de disección; ésta se llevó a cabo observando a través de un microscopio estereoscópico (Leica GZ6). Al mosquito se le puso una gota de solución salina, se sujetó con una aguja del tórax y con otra aguja se dio un tirón suave desde el cuarto metámero del abdomen exponiendo el tubo digestivo. Posteriormente se realizaron 2 cortes, uno en la parte final del intestino medio posterior para eliminar los túbulos de Malpighi y el otro en el inicio del intestino medio anterior, esto con el fin de dejar libre únicamente al intestino medio o estómago (Cázares-Raga, 2000).

**Tratamiento de los estómagos.** Los estómagos disectados se colocaron en una caja multicámara de 24 pozos, 50 estómagos por pozo con 500  $\mu$ l de medio Schneider's únicamente como control o añadiendo PGE<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich St. Louis Mo, cat P5640, presentación soluble en agua) a 35  $\mu$ g/ml (añadidos al medio a partir de una solución stock 35mg/ml en agua). Los estómagos se incubaron a temperatura ambiente (Ta) durante 2 horas (García-Gil *et. al.*, 2008). Posteriormente, los estómagos tratados se colectaron y centrifugaron a 2000 rpm durante 1 minuto, se eliminó el sobrenadante, se lavaron con PBS (140 mM NaCl, 2.6 mM KCl, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.2) y se centrifugaron a 2000 rpm durante 2 minutos. Los estómagos se resuspendieron en el amortiguador de lisis (*vide infra*), adicionado de inhibidores de proteasas (IP) [5 mM de tosil-lisil-clorometilcetona (TLCK), 5 mM de fenil-alanilclorometil cetona (TPCK), 10  $\mu$ M de Leupeptina, 50 mM de fenil-metilsulfonil fluoruro (PMSF) y la mezcla comercial Complete™ (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)]. Las muestras se almacenaron a -70° C hasta su uso.

**Preparación de las muestras para electroforesis bidimensional.** Las muestras de estómagos se homogeneizaron en Amortiguador de Lisis (AL) para isoelectroenfoque (IEF) (AL: urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 4%, amortiguador de anfolinas (IPG, General Electric Healthcare) pH 4-7 al 2%, DTT 40 mM) en presencia de inhibidores de proteasas, con 5 ciclos de congelación/descongelación en nitrógeno líquido/temperatura ambiente, y dando 50 golpes cada vez con homogenizadores de plástico para tubo de microfuga de 1.5 ml (Tissue grinders PES-15-B-SI, Axygen/Corning). Para eliminar contaminantes, las muestras se precipitaron con acetona (1:5) y resolubilizaron en AL adicionado de IP. Para eliminar lípidos y algunos carbohidratos, las muestras se trataron con metanol y cloroformo y la pastilla se solubilizó en amortiguador de hidratación (AH, urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 2%, amortiguador IPG 0.5%, DTT 40 mM, azul de bromofenol 0.002%) suplementado con IP. La concentración de proteínas se cuantificó con el kit 2-D Quant (Amersham Biosciences, GE Healthcare).

**Análisis proteómico.** El análisis de las proteínas se realizó mediante electroforesis bidimensional (E2D), la primera dimensión se realizó por isoelectroenfoque (IEF) utilizando tiras prefabricadas de 7 cm con gradiente de pH 4-7 (Immobiline Drystrip, GE Healthcare) hidratadas durante 16 h en presencia de

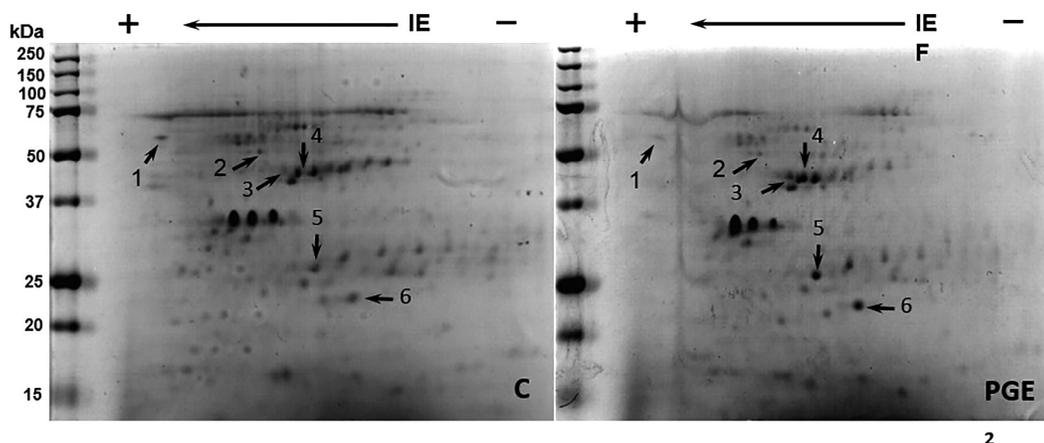
la muestra (150  $\mu$ g de proteína en 125  $\mu$ l de AL), en el sistema Ettan IPGPhor 3 (GE Healthcare) con ~7000 Vh acumulados durante 3.5 h (Görg *et. al.*, 2000). Antes de correr la segunda dimensión, las proteínas enfocadas en las tiras se redujeron y oxidaron en amortiguador de equilibrio (AE: urea 6 M, glicerol 30%, SDS 2%, Tris 50 mM, pH 8.8) en presencia de DTT 1% y iodoacetamida 4%, respectivamente, durante 15 min. Posteriormente las proteínas se separaron en la segunda dimensión mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (PAGE-SDS) en geles al 12% (Laemmli, 1970). Al término de las corridas los geles se tiñeron con azul de Coomassie Coloidal G250 (BioSafe, BioRad). Las imágenes de los geles se obtuvieron en un fotodocumentador ImageQuant LAS4000 (GE Healthcare). La intensidad de las manchas de c/u de las proteínas en los geles teñidos, la cual es proporcional a la concentración de la molécula, se cuantificó analizando las imágenes con el software Image Master 2D Platinum v7.0 (GE Healthcare) y se expresó como volumen relativo expresado en unidades arbitrarias definidas por el software. Los experimentos se realizaron por duplicado y los valores de densidad óptica se promediaron y la comparación estadística entre condiciones se hizo mediante prueba de t para dos muestras.

**Análisis de las proteínas por espectrometría de masas (ESI-LC-MS/MS).** Las manchas teñidas en los geles E2D correspondientes a proteínas diferenciales se escindieron del gel y se procedió a la digestión directa de la proteína contenida en el fragmento de gel (*in-gel digestion*) usando tripsina y los péptidos se recuperaron. Para eliminar contaminantes, la muestra se hizo fluir a través de una columna C18 (Millipore) y se analizó mediante ESI-LC-MS/MS (*ElectroSpray Ionization-Liquid Chromatography-Mass Spectrometry/Mass Spectrometry*), en un espectrómetro de masas Micromass QToF-LC (Waters, USA). Debido a que el genoma de *An. albimanus* no está secuenciado, para identificar a las proteínas seleccionadas se utilizó el método de ESI-LC-MS/MS el cual utiliza MS en tándem para fragmentar un péptido específico en péptidos más pequeños en los que se puede deducir la secuencia de aminoácidos, considerada como una etiqueta (*peptide sequence tag, PST*) que da información estructural irrefutable. Para identificar las proteínas, los fragmentos se analizaron con el programa MASCOT usando las bases de datos accesibles en línea incluyendo SwissProt, NCBIInr y las divisiones de ESTs de EMBL, en <http://www.matrixscience.com/>.

## Resultados

**Análisis proteómico.** Las proteínas de estómagos cultivados *ex vivo* tratados con PGE<sub>2</sub> fueron analizadas mediante electroforesis bidimensional. En los geles del control (C) y de los estómagos tratados con PGE<sub>2</sub> se resolvieron alrededor de 300 manchas de proteína donde se observó que varias de ellas modificaron reproduciblemente sus niveles de expresión (figura 1).

Figura 1.



Análisis proteómico diferencial de proteínas de estómagos de mosquitos hembras de *An. albimanus* tratados con PGE<sub>2</sub>. Las proteínas se analizaron por electroforesis bidimensional, el IEF se realizó en un gradiente de pH 4-7 en tiras de 7 cm y la segunda dimensión en PAGE-SDS al 12%. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie G250. En el lado izquierdo se muestran las proteínas de los estómagos control; del lado derecho se muestra el análisis de las proteínas de estómagos tratados con PGE<sub>2</sub>. Seis proteínas que mostraron expresión diferencial (flechas) fueron seleccionadas para su análisis por ESI-LC-MS/MS

Para este trabajo se eligieron seis manchas cuya expresión fue modificada por efecto de la PGE<sub>2</sub>, se identificaron por ESI-LC-MS/MS y éstas correspondieron a ATPasa mitocondrial, calreticulina, tres isoformas de actina y una serina proteasa (tabla 1, datos de la columna giNCBI). Para cada molécula se hizo la comparación entre los puntos isoeléctricos (pI) y masas moleculares calculadas con los datos de secuencia obtenidas de la base de datos (datos de la columna gi NCBI) y se encontró alta coincidencia. Las variaciones se pueden deber a modificaciones post-traduccionales.

**Tabla 1.** Identificación por espectrometría de masas de las proteínas con expresión diferencial en estómagos de mosquitos hembras de *Anopheles albimanus* tratados con PGE<sub>2</sub>

Punto <sup>1</sup>	PM /pI <sup>2</sup> Exp	M <sub>r</sub> /pI <sup>3</sup> Teórico	Nombre	Especie	gi NCBI	Péptidos identificados	% cobertura	Score
1	56/4.2	46779/4.36	Calreticulina	<i>Anopheles albimanus</i>	76797617	3	6	101
2	50/4.8	53838/5.03	Subunidad beta ATP sintetasa	<i>Aedes aegypti</i>	157132308	7	15	297
				<i>Anopheles darlingi</i>	312371563	7	15	297
3	42/5.2	42134/5.22	Actina 2 específica de músculo AGAP011516-PA	<i>Aedes aegypti</i>	33642243	9	25	394
				<i>Anopheles gambiae</i>	157016476	9	25	394
				Proteína hipotética AND_05571	<i>Anopheles darlingi</i>	312382027	9	25
4	42/5.4	41934/5.44	Actina 3 específica de músculo	<i>Aedes aegypti</i>	33642245	12	31	552
5	26/5.5	41934/5.44	Actina 3 músculo específica	<i>Aedes aegypti</i>	33642245	4	9	166
6	23/5.6	29176/4.72	Serina Proteasa	<i>Anopheles gambiae</i>	1644281	1	11	60

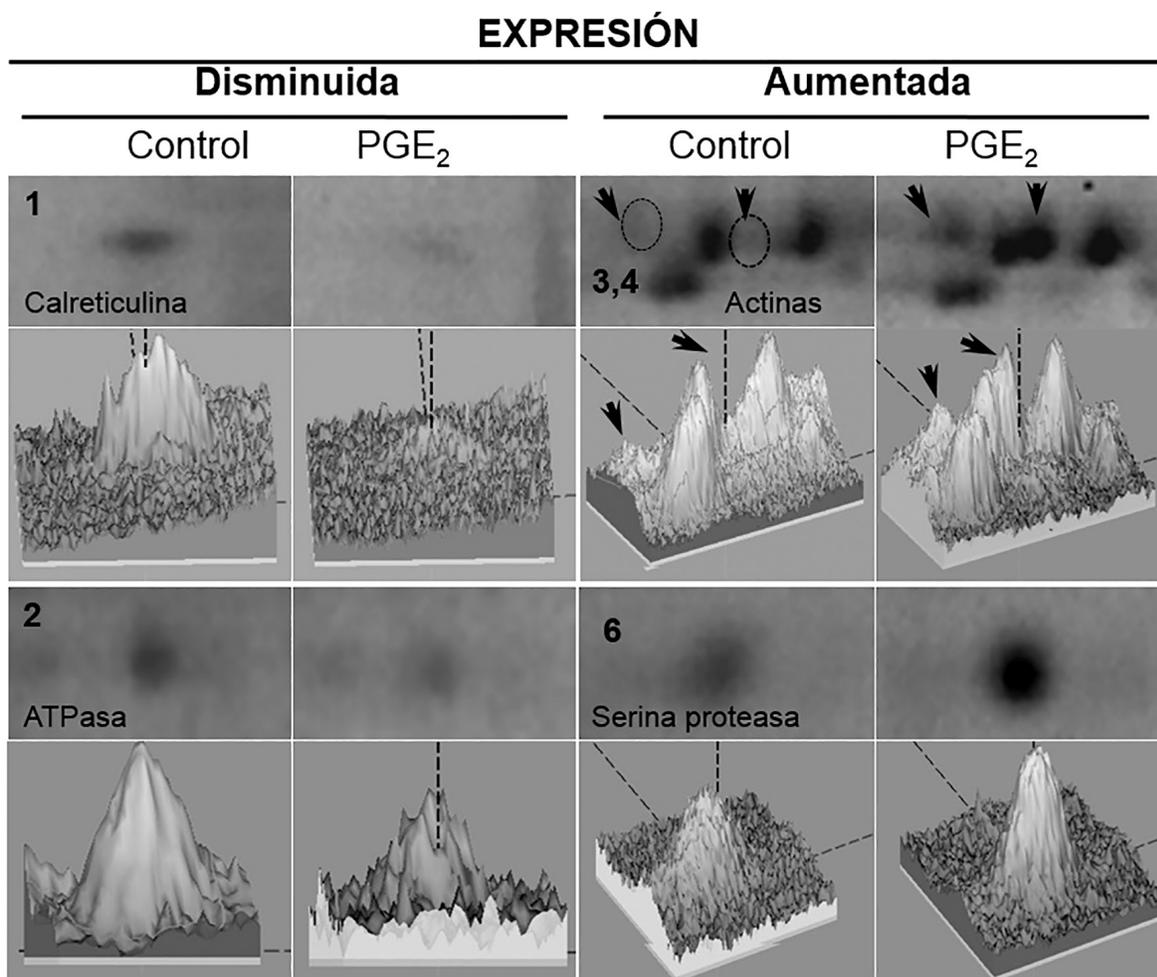
1. Los puntos seleccionados en el gel bidimensional se identificaron por ESI-LC-MS/MS

2. PM/pI Peso molecular/punto isoeléctrico obtenidos experimentalmente

3. M<sub>r</sub>/pI Masa relativa/punto isoeléctrico deducidos de las secuencias depositadas en las bases de datos

Por otra parte, el número de péptidos identificados y la cobertura que estos tienen sobre la secuencia de la base de datos indicaron que la identificación fue confiable, lo cual se confirmó por los valores de score > 60 (tabla 1). La cantidad de proteína en las manchas se expresó como volumen relativo en unidades arbitrarias definidas por el software, lo que permitió expresar gráficamente la diferencia en la expresión de las moléculas estudiadas (figuras 2 y 3) y definir los cambios en la expresión de proteínas.

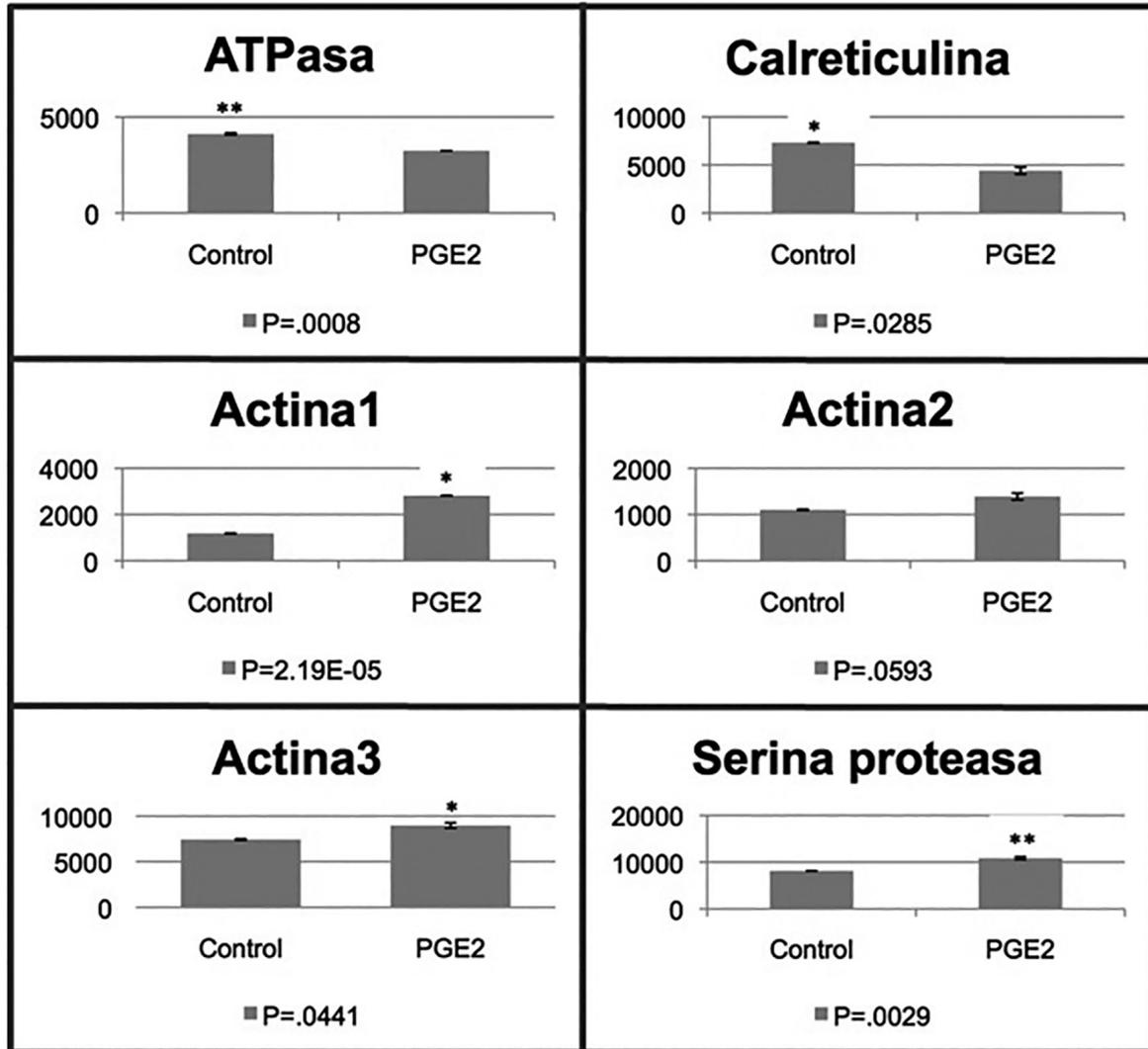
Figura 2.



Proteínas de estómagos representativas del cambio de expresión por tratamiento con PGE<sub>2</sub>. Los recuadros superiores muestran el mapa de E2D de las proteínas analizadas; los recuadros inferiores muestran las gráficas en 3D de los volúmenes relativos de las imágenes de las mismas manchas de proteína (Image Master 2D Platinum v7.0). Las proteínas que disminuyeron su expresión se muestran en las columnas de la izquierda y las que aumentaron su expresión se muestran en las columnas de la derecha. Con un círculo punteado se indica la posición donde la proteína está ausente. Las proteínas están numeradas de la misma forma que en la figura 1 y se nombran según su identificación por ESI-LC-MS/MS

Finalmente, la ATPasa y la calreticulina disminuyeron su expresión, en tanto que varias isoformas de actina y una serina proteasa, aumentaron su expresión (figura 3).

Figura 3.



Análisis de los niveles de expresión de las proteínas de estómagos expresadas diferencialmente por tratamiento con PGE<sub>2</sub>. Los volúmenes de los gráficos de las proteínas analizadas por E2D en la figura 2, los cuales son proporcionales a la cantidad de proteína, fueron cuantificados en unidades arbitrarias definidas por el software (ImageMaster 2D Platinum 7.0). Los valores obtenidos en experimentos por duplicado se promediaron y graficaron y se evaluó la significancia de las diferencias entre las dos condiciones mediante la prueba t para dos muestras. Control.- Estómagos cultivados en medio Schneider's. PGE<sub>2</sub>.- Estómagos después del tratamiento con PGE<sub>2</sub>. Se muestra el nombre de las proteínas identificadas

## Discusión

Se conoce que existen especies de mosquitos tanto refractarios como sensibles a la infección y se ha estudiado cuáles son las diferencias moleculares que sustentan estos diferentes fenotipos. El estómago del mosquito es un sitio donde los agentes infecciosos deben sobrevivir y en el caso del parásito *Plasmodium sp.*, productor de la malaria, deben realizar parte de su ciclo de vida. En este trabajo se usó como modelo estómagos de mosquitos hembra de *An. albimanus* vector de la malaria en México cultivados *ex vivo*. Los eicosanoides tienen un efecto pleiotrópico sobre la biología de los insectos, ya que afectan diversas funciones incluidas la inmunidad contra diversos microorganismos, reproducción, desarrollo y la respuesta a diferentes tipos de estrés entre otros, pero se desconoce el efecto que pueda tener en la regulación global de la expresión de genes en el estómago del mosquito (Stanley y Kim, 2011; Stanley *et al.*, 2009). En *An. albimanus* se sabe que el estómago, cuerpo gordo y túbulos de Malpighi sintetizan PGE<sub>2</sub> y que ésta molécula induce la síntesis de péptidos antimicrobianos en el estómago (García-Gil *et al.*, 2008). En este trabajo se analizó el efecto de PGE<sub>2</sub> en la expresión global de proteínas en el estómago del mosquito *An. albimanus*. Aunque se modificaron muchas proteínas, para este reporte se seleccionaron las seis más notorias para su identificación por espectrometría de masas (ESI-LC-MS/MS).

Entre los cambios observados se encontró disminución en la cantidad de la subunidad β de la F0F1 de la ATPasa mitocondrial, sistema fundamental para la producción de ATP por vía aeróbica. En células de diversos orígenes, tanto animales como vegetales se ha observado que ante diversas condiciones ambientales inductoras de estrés se modifica la cantidad de los componentes de la ATPasa mitocondrial (Gomes *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2009; Srivastava *et al.*, 2009; Zhang y Zhou, 2005). La PGE<sub>2</sub> es una hormona que se produce en condiciones de estrés y en el presente trabajo, la presencia de PGE<sub>2</sub> exógena indujo variación de la subunidad β de la ATPasa en respuesta al estrés, lo cual es similar a lo que ocurre en otros organismos, sugiriendo que puede ser un mecanismo conservado en la evolución (Moghandam *et al.*, 2013).

Otra proteína que disminuyó su expresión fue la calreticulina, la cual es muy importante en el meta-

bolismo del Ca<sup>2+</sup>, regulando, entre otras funciones, la agregación y la calidad del doblamiento de las proteínas y el señalamiento celular incluyendo respuestas a estrés (Michalak *et al.*, 2009; Gold *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2012a; Wang *et al.*, 2012b). Los efectos de los eicosanoides sobre la fisiología celular y transducción de señales ocurren a través de la unión a receptores acoplados a proteínas G como EP1, EP2, EP3 y EP4 (Ferrer y Moreno, 2010). En mamíferos, PGE<sub>2</sub> enciende respuestas al estrés a través del receptor EP1 (Furuyashiki y Narumiya, 2011) incluyendo la elevación en la concentración de Ca<sup>2+</sup> citosólico libre (Legler *et al.*, 2010; Rodríguez-Lagunas *et al.*, 2010). Las respuestas a PGE<sub>2</sub> en mamíferos integran la concentración de Ca<sup>2+</sup>, la activación de fosfolipasa A2 y la síntesis de PGE<sub>2</sub> (Kuda *et al.*, 2011). Recientemente se observó que PGE<sub>2</sub> moviliza Ca<sup>2+</sup> en oenocitos de la polilla *Spodoptera exigua*, a través de un receptor EP, probablemente homólogo a EP1 de mamíferos (Shrestha *et al.*, 2011). El efecto observado en los componentes de ATPasa y calreticulina en los estómagos de *An. albimanus* tratados con PGE<sub>2</sub> sugiere la posible interacción del metabolismo energético con la dinámica del Ca<sup>2+</sup>, durante la respuesta tipo estrés inducida por esta hormona.

Tres isoformas de actina aumentaron su expresión después del tratamiento con PGE<sub>2</sub>, dos de 42 kDa con pI 5.2 y 5.4, y una de bajo peso molecular 26 kDa pI 5.4. Esta última es interesante ya que fue reportada una molécula similar durante el remodelamiento de las células epiteliales del estómago del mosquito *An. gambiae* (Sodja *et al.*, 2007). En diversas células eucarióticas se ha observado que la presencia de PGE<sub>2</sub> exógena afecta la estructura del citoesqueleto, específicamente el rearrreglo de actina (Yun *et al.*, 2011; Kuehn *et al.*, 2011). Durante el desarrollo del folículo en la ovogénesis de *Drosophila* se observó que tanto las PG como la enzima Pxt parecida a ciclo-oxigenasa (COX), regulan la organización de la actina en haces y en la zona cortical para el traslado de material de las células nodriza hacia el oocito (*dumping*). Esto se relaciona con que la Fascina, una proteína que se une a actina para formar los haces, es regulada por PG para controlar el remodelamiento de actina y la integridad de la actina cortical durante el proceso (Tootle y Spradling, 2008; Zanet *et al.*, 2012; Groen *et al.*, 2012). Nuestros resultados sugieren que PGE<sub>2</sub> podría estar regulando el comportamiento y reorganización de las fibras de actina en las células

epiteliales del estómago del mosquito, como sucede en otros tipos de células (Thomas *et. al.*, 2007; Miyatake *et. al.*, 2007; Garrison *et. al.*, 2013). Un tema de investigación que se sugiere con estos datos es conocer los mecanismos de regulación que las PG ejerzan sobre el *steady state* del citoesqueleto de las células epiteliales del estómago de los mosquitos.

## Conclusión

Las células epiteliales del estómago de los mosquitos *Anopheles* son capaces de producir diversas serina proteasas con actividad de tripsina y quimiotripsina, las cuales pueden tener funciones digestivas (Wu *et. al.*, 2009) o de regulación de la vía de la fenoloxidasa, proceso central en la modulación de la inmunidad en insectos (Tang, 2009). En este trabajo se identificó el aumento de la expresión de una proteína tipo serina proteasa de 23 kDa pI 5.6, de actividad aún no reportada, después del tratamiento con PGE<sub>2</sub>. Hasta el momento no se ha publicado que esta hormona induzca la síntesis de proteasas, pero dada su participación en los procesos de inmunidad y que el sistema de cultivo de los estómagos no reproduce la situación de alimentación con sangre, que sólo sucede en las hembras y en la cual ocurre una distensión extraordinaria del intestino y se induce la síntesis de enzimas digestivas que sólo se producen y/o se secretan en las hembras alimentadas, por lo tanto es posible que esta serina proteasa pudiera participar en la ruta de la fenoloxidasa, pero esta hipótesis requiere mayor investigación.

Los resultados de este trabajo indican que las PGs, específicamente PGE<sub>2</sub> tiene efectos importantes sobre la fisiología del estómago de los mosquitos los cuales pueden ser importantes en la digestión, sea por la producción de enzimas, así como en la resistencia a las enormes presiones mecánicas que debe soportar durante la alimentación con sangre y también a interactuar con los microorganismos que pudieran llegar en el alimento.

## Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo de la Coordinación de Investigación de la Universidad Simón Bolívar; CO-NACyT proyectos No. 83866 y 180514; ICyTDF proyecto PIFUTP09-298 y Fundación Miguel Alemán A. C. 

## Referencias

- Carlton, J.M., Sina, B.J. y Adams J.H. (2011). "Why Is Plasmodium vivax a Neglected Tropical Disease?" En: *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(6), e1160.
- Cázarez-Raga, F.E. (2000). *Identificación de moléculas que se expresan en el estómago de mosquitos hembra de Anopheles albimanus*. Tesis de Doctorado en Patología Experimental. México: CINVESTAV-IPN.
- Chen, X., Wang, Y., Li, J., Jiang, A., Cheng, Y. y Zhang, W. (2009). "Mitochondrial proteome during salt stress-induced programmed cell death in rice". En: *Plant Physiology Biochemistry*, 47(5), 407-415.
- Ferrer, F. y Moreno, J.J. (2010). "Role of eicosanoids on intestinal epithelial homeostasis". En: *Biochemical Pharmacology*, 80(4), 431-438.
- Furuyashiki, T. y Narumiya, S. (2011). "Stress responses: the contribution of prostaglandin E2 and its receptors". En: *Nature Review Endocrinology*, 7(3), 163-175.
- García-Gil de Muñoz, F.L., Martínez-Barnette, J., Lanz-Mendoza, H., Rodríguez, M. H. y Hernández-Hernández, F.C. (2008). "Prostaglandin E2 Modulates the Expression of Antimicrobial Peptides in the Fat Body and Midgut of *Anopheles albimanus*". En: *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 68(1), 14-25.
- Garrison, G., Huang, S.K., Okunishi, K., Scott, J.P., Penke, L.R., Scruggs, A.M. y Peters-Golden, M. (2013). "Reversal of Myofibroblast differentiation by Prostaglandin E2." En: *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 48(5), 550-558.
- Gold, L.I., Eggleton, P., Sweetwyne, M.T., Van Duyn, L.B., Greives, M.R., Naylor, S.M., Michalak, M. y Murphy-Ullrich, J.E. (2010). "Calreticulin: non-endoplasmic reticulum functions in physiology and disease". En: *The FASEB Journal*, 24(3), 665-83.
- Gomes, T., Pereira, C.G., Cardoso, C. y Bebianno, M.J. (2013). "Differential protein expression in mussels *Mytilus galloprovincialis* exposed to nano and ionic Ag." En: *Aquatic Toxicology*, 136-137, 79-90.
- González-Cerón, L., Rodríguez, M.H., Santillan, F.V., Hernandez, J.E. y Wirtz, R.A. (2000) "Susceptibility of three laboratory strains of *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae) to coindigenous *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein phenotypes in southern Mexico". En: *Journal of Medical Entomology*, 37(3), 331-4
- Görg, A., Obermaier, C., Boguth, G., Harder, A., Scheibe, B., Wildgruber, R. y Weiss W. (2000). "The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients". En: *Electrophoresis*, 21(6), 1037-53.

- Groen, C.M., Spracklen, A.J., Fagan, T.N. y Tootle, T.L. (2012). "Drosophila Fascin is a novel downstream target of prostaglandin signaling during actin remodeling". En: *Molecular Biology of the Cell*, 23(3), 4567-4578.
- Kuda, O., Jenkins, C.M., Skinner, J.R., Moon, S.H., Su, X., Gross, R.W. y Abumrad, N.A. (2011). "CD36 protein is involved in store-operated calcium flux, phospholipase A2 activation, and production of prostaglandin E2". En: *Journal of Biological Chemistry*, 286(20), 17785-17795.
- Kuehn, H.S., Jung, M.Y., Beaven, M.A., Metcalfe, D.D. y Gilfillan, A.M. (2011). "Prostaglandin E2 Activates and Utilizes mTORC2 as a Central Signaling Locus for the Regulation of Mast Cell Chemotaxis and Mediator Release". En: *Journal of Biological Chemistry*, 286(1), 391-402.
- Laemmli, U.K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". En: *Nature*, 227(5259), 680-685.
- Legler, D.F., Bruckner, M., Uetz-von Allmen, E. y Krause, P. (2010). "Prostaglandin E2 at new glance: Novel insights in functional diversity offer therapeutic chance". En: *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 42(2), 198-201.
- McGraw, E.A. y O'Neill, S.L. (2013). "Beyond insecticides: new thinking on an ancient problem". En: *Nature Reviews Microbiology*, 11(3), 181-93.
- Michalak, M., Groenendyk, J., Szabo, E., Gold, L.I. y Opas, M. (2009). "Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum". En: *The Biochemical Journal*, 417(3), 651-66.
- Miller, L.H., Ackerman, H.C., Su, X.Z. y Wellems, T.E. (2013). "Malaria biology and disease pathogenesis: insights for new treatments". En: *Nature Medicine*, 19(2), 156-167.
- Miyatake, S., Manabe-Kawaguchi, H., Watanabe, K., Hori, S., Aikawa, N. y Fukuda, K. (2007). "Prostaglandin E2 Induces Hypertrophic Changes and Suppresses a-Skeletal Actin Gene Expression in Rat Cardiomyocytes". En: *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 50(5), 548-554.
- Moghadam, A.A., Ebrahimie, E., Taghavi, S.M., Niazi, A., Babgohari, M.Z., Deihimi T., Djavaheri, M. y Ramezani, A. (2013). "How the nucleus and mitochondria communicate in energy production during stress: nuclear MtATP6, an early-stress responsive gene, regulates the mitochondrial F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase complex". En: *Molecular Biotechnology*, 54(3), 756-769.
- Rodríguez-Lagunas, M.J. (2010). "PGE2 promotes Ca<sup>2+</sup>-mediated epithelial barrier disruption through EP1 and EP4 receptors in Caco-2 cell monolayers". En: *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 299(2), C324-C334.
- Shrestha, S., Stanley, D. y Kim, Y. (2011). "PGE2 induces oenocytoid cell lysis via a G protein-coupled receptor in the beet armyworm, *Spodoptera exigua*". En: *Journal of Insect Physiology*, 57(11), 1568-1576.
- Sinka, M.E., Rubio-Palis, Y., Manguin, S., Patil, A.P., Temperley, W.H., Gething, P.W., Van Boeckel, T., Kabaria, C.W., Harbach, R.E. y Hay, S.I. (2010). "The dominant Anopheles vectors of human malaria in the Americas: occurrence data, distribution maps and bionomic précis". En: *Parasites and Vectors*, 3, 72
- Sodja, A., Fujioka, H., Lemos, F. J. A., Donnelly-Doman, M. y Jacobs-Lorena M. (2007). "Induction of actin gene expression in the mosquito midgut by blood ingestion correlates with striking changes of cell shape". En: *Journal of Insect Physiology*, 53(8), 833-839.
- Srivastava, A.K., Ramaswamy, N.K., Mukopadhyaya, R., Jincy, M.G. y D'Souza S.F. (2009). "Thiourea modulates the expression and activity profile of mtATPase under salinity stress in seeds of *Brassica juncea*". En: *Annals of Botany*, 103(3), 403-410.
- Stanley, D., Miller, J. y Tunaz, H. (2009). "Eicosanoid Actions in Insect Immunity". En: *Journal of Innate Immunity*, 1(4), 282-290.
- Stanley, D.W., Goodman, C., An, S. y Song, Q. (2012). "Prostaglandin A2 influences gene expression in an established insect cell line (BCIRL-HzAM1) cells". En: *Journal of Insect Physiology*, 58(6), 837-849.
- Stanley, D. y Kim, Y. (2011). "Prostaglandins and their receptors in insect biology". En: *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*, 2, 105.
- Tang H. (2009). *Regulation and function of the melanization reaction in Drosophila Fly* (Austin), 3(1), 105-111.
- Thomas, P.E., Peters-Golden, M., White, E.S., Thannickal, V.J. y Moore BB. (2007). "PGE2 inhibition of TGF-1-induced myofibroblast differentiation is Smad-independent but involves cell shape and adhesion-dependent signaling". En: *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 293(2), L417-L428.
- Tootle, T.L. y Spradling, A.C. (2008). "Drosophila Pxt: a cyclooxygenase-like facilitator of follicle maturation". En: *Development* 135(5), 839-847.
- Wang, W.A., Groenendyk, J. y Michalak, M. (2012a). "Calreticulin signaling in health and disease". En: *The International Journal of Biochemistry y Cell Biology*, 44(6), 842-6.
- Wang, L., Fang, Q., Zhu, J., Wang, F., Rean-Akhtar, Z. y Ye, G. (2012b). "Molecular cloning and functional study of calreticulin from a lepidopteran pest, *Pieris rapae*". En: *Developmental and Comparative Immunology*, 38(1), 55-65.
- WHO (2012). World Malaria Report 2012. En: [http://www.who.int/malaria/publications/world\\_malaria\\_report\\_2012/en/](http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2012/en/) Recuperado el 17 de junio de 2013.
- Wu, D.D., Wang, G.D., Irwin, D.M. y Zhang, Y.P. (2009). "A profound role for the expansion of trypsin-like serine protease family in the evolution of hematophagy in mosquito". En: *Molecular Biology and Evolution*, 26(10), 2333-2341.
- Yun, S.P., Ryu, J.M., Jang, M.W. y Han, H.J. (2011). "Interaction of Profilin-1 and F-Actin via a b-Arrestin-1/JNK Signaling Pathway Involved in Prostaglandin E2-Induced Human Mesenchymal Stem Cells Migration and Proliferation". En: *Journal of Cellular Physiology*, 226(2), 559-571.
- Zanet, J., Jayo, A., Plaza, S., Millard, T., Parsons, M. y Stramer, B. (2012). "Fascin promotes filopodia formation independent of its role in actin bundling". En: *Journal of Cell Biology*, 197(4), 477-486.
- Zhang, S., Fu, J. y Zhou, Z. (2005). "Changes in the brain mitochondrial proteome of male Sprague-Dawley rats treated with manganese chloride". En: *Toxicology and Applied Pharmacology*, 202(1), 13-17.