

Análisis proteómico de mitocondrias de larvas (L4) de *Aedes aegypti*

Diana Lizeth Urbina Duitama

Trabajo de grado para optar el título de magister en Química

DIRECTORA:

Stelia Carolina Méndez Sánchez

PhD. En ciencias bioquímicas

CODIRECTORES:

Jonny Edward Duque Luna

PhD. En ciencias biológicas. (Entomología)

Enrique Mejía Ospino

PhD. Ciencias químicas

Universidad Industrial De Santander

Facultad De Ciencias

Escuela De Química

Maestría en Química

Bucaramanga

2021

Agradecimientos

Agradecimientos formales a la Universidad Industrial de Santander por la oportunidad del crédito condonable que me permitió desarrollar mi trabajo de investigación durante dos años.

A Minciencias por el apoyo a través del Programa Bio-Reto XXI 15:50, Colciencias, Ministerio de Educación Nacional, Ministerio de Industria, Comercio y Turismo e ICETEX, Convocatoria Ecosistema Científico - Colombia Científica. Fondo Francisco José de Caldas, Contrato RC-FP44842-212-2018.

A Minciencias por el apoyo a través del programa Patrimonio Autónomo, Fondo Nacional de Financiamiento para la Ciencia Francisco José de Caldas” (Colciencias), 110265740528 (624-2014).

Agradecimientos personales a Dios por permitirme cumplir sueños y metas, y por darme la fortaleza de superar los obstáculos del camino.

A mi familia, quienes siempre me han apoyado y han estado a mi lado, son mi refugio y ese lugar seguro al que puedo acudir.

A mis directores del trabajo de investigación por las enseñanzas y apoyo durante la ejecución del mismo. Pues a pesar de que todo el proceso fue virtual por las eventualidades de la pandemia, su acompañamiento siempre fue cercano y paciente.

A mis amigas y amigos que me escucharon y me regalaron momentos gratos para recordar.

A mis compañeros de los laboratorios donde desarrollé mi trabajo, por la colaboración y disposición de enseñar con amabilidad.

A aquellas personas que estuvieron a mi lado durante todo el proceso, pero ahora comparten mi felicidad de culminar mi investigación en la distancia.

Tabla de contenido

Introducción	13
1. Objetivos.....	17
1.1 Obejtivo general.....	17
1.2 Objetivos específicos.....	17
2. Marco referencial.....	18
2.1 Análisis proteómico.....	18
2.2 <i>Aedes aegypti</i> : Ciclo de vida, estudios de bioenergética mitocondrial y proteómicos.	21
2.2.1 El zancudo <i>Aedes aegypti</i>	21
2.2.2 Métodos de control poblacional del vector.....	22
2.2.3 Estudios proteómicos en <i>Aedes aegypti</i>	24
2.2.4 Estudio de la mitocondria en <i>Aedes aegypti</i>	28
3. Metodología.....	31
3.1 Material biológico	32
3.2 Aislamiento de mitocondrias.....	34
3.3 Extracción de proteínas	34
3.4 Separación por electroforesis bidimensional.....	35
3.5 Medición de la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial.....	38
3.6 Medición de la actividad específica de las enzimas de la CTE mitocondrial	39

4. Resultados y discusión.....	43
4.1 Obtención del perfil proteico bidimensional.....	43
4.2 Identificación de las proteínas y relación con su función	49
4.2.1 Función de las proteínas identificadas y previamente reportadas en literatura para <i>Ae. aegypti</i>	56
4.2.2 Función de las proteínas identificadas y previamente reportadas en literatura para <i>Drosophila melanogaster</i>	69
4.2.3 Función de las proteínas identificadas adicionales a las presentadas en los interactomas	78
4.3 Medición de bioenergética y actividad enzimática mitocondrial.....	88
4.4 Relación de los resultados de proteómica, respiración y actividad enzimática de la CTE mitocondrial	97
5. Conclusiones.....	99
6. Recomendaciones	101
Referencias.....	102
Apendices.....	121

Lista de figuras

Figura 1. Flujograma de la metodología del trabajo de investigación.....	32
Figura 2. Perfil proteico bidimensional de proteínas solubles de mitocondrias de larvas L4 de <i>Ae. aegypti</i>	44
Figura 3. Perfil proteico bidimensional de proteínas de membrana de mitocondrias de larvas L4 de <i>Ae. aegypti</i>	46
Figura 4. Máster del perfil proteico bidimensional de proteínas solubles de mitocondrias de larvas L4 de <i>Ae. aegypti</i>	46
Figura 5. Máster del perfil proteico bidimensional de proteínas de membrana de mitocondrias de larvas L4 de <i>Ae. aegypti</i>	47
Figura 6. Interactoma de las proteínas identificadas en mitocondrias de larvas de <i>Ae. aegypti</i> , mostrando la relación de acuerdo con los niveles de confianza establecidos por la herramienta STRING (0,150-0,900).	54
Figura 7. Representación de la estructura de la ATP sintasa, a partir de la estructura cristalina de rayos x de componentes bovinos. Tomado de Understanding structure, function, and mutations in the mitochondrial ATP synthase (p. 106) por Xu y colaboradores, 2015.....	58
Figura 8. Interactoma de las proteínas identificadas en mitocondrias de larvas de <i>Ae. aegypti</i> , usando como modelo proteínas reportadas para <i>Drosophila melanogaster</i> , mostrando la relación de acuerdo con el nivel de confianza establecido por STRING.	70
Figura 9. Representación de la estructura de la ATP sintasa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . Tomado de Structural and functional properties of plant mitochondrial F-ATP synthase, (p-179) por Zuncani y colaboradores, 2020.....	75

- Figura 10. Velocidad de consumo de oxígeno (pmol/(seg*mL)) de mitocondrias aisladas de larvas L4 de *Ae. aegypti* para los estados respiratorios Estado 3, Estado 4. Se emplearon los sustratos oxidables glutamato, malato, prolina+piruvato, succinato y glicerol 3-fosfato (G3P)..... 90
- Figura 11 Resumen gráfico de las proteínas identificadas en mitocondrias de larvas L4 de *Ae. aegypti*. Imagen creada con BioRender.com 98

Lista de tablas

Tabla 1. Resultados de la identificación de proteínas mitocondriales de <i>Aedes aegypti</i>	50
Tabla 2 Nivel de confianza del interactoma en STRING	53
Tabla 3. Nomenclatura empleada en el interactoma de las proteínas identificadas en mitocondrias de larvas de <i>Ae. aegypti</i> y reportadas previamente en literatura. (*) Proteínas identificadas experimentalmente en mitocondrias de larvas	55
Tabla 4. Nomenclatura empleada en el interactoma de las proteínas identificadas en mitocondrias de larvas de <i>Ae. aegypti</i> , usando como modelo proteínas reportadas para <i>Drosophila melanogaster</i> . (*) Proteínas identificadas experimentalmente en el presente trabajo de investigación.....	70
Tabla 5. Resultados de la actividad específica de las enzimas de la cadena transportadora de electrones mitocondrial, de larvas (L4) de <i>Aedes aegypti</i>	93

Lista de Apéndices

Apéndice 1. Espectro de masas correspondiente a la proteína del spot 1	121
Apéndice 2. Espectro de masas correspondiente a la proteína del spot 2	122
Apéndice 3. Espectro de masas correspondiente a la proteína del spot 3	123
Apéndice 4. Espectro de masas correspondiente a la proteína del spot 5	124
Apéndice 5. Espectro de masas correspondiente a la proteína del spot 7	125
Apéndice 6. Espectro de masas correspondiente a la proteína del spot 8	126
Apéndice 7. Espectro de masas correspondiente a la proteína del spot 10	127
Apéndice 8. Espectro de masas correspondiente a la proteína del spot 13	128
Apéndice 9. Espectro de masas correspondiente a la proteína del spot 14	129
Apéndice 10. Espectro de masas correspondiente a la proteína del spot 18	130
Apéndice 11. Espectro de masas correspondiente a la proteína del spot 20	131
Apéndice 12. Espectro de masas correspondiente a la proteína del spot 23	132
Apéndice 13. Espectro de masas correspondiente a la proteína del spot 24	133
Apéndice 14. Espectro de masas correspondiente a la proteína del spot 25	134
Apéndice 15. Espectro de masas correspondiente a la proteína del spot 27	135
Apéndice 16. Espectro de masas correspondiente a la proteína del spot 28	136
Apéndice 17. Espectro de masas correspondiente a la proteína del spot 29	137
Apéndice 18. Espectro de masas correspondiente a la proteína del spot 31	138
Apéndice 19. Espectro de masas correspondiente a la proteína del spot 37	139
Apéndice 20. Espectro de masas correspondiente a la proteína del spot 38	140
Apéndice 21. Espectro de masas correspondiente a la proteína del spot 39	141

Apéndice 22. Espectro de masas correspondiente a la proteína del spot 41	142
Apéndice 23. Espectro de masas correspondiente a la proteína del spot 42	143
Apéndice 24. Espectro de masas correspondiente a la proteína del spot 44	144
Apéndice 25. Espectro de masas correspondiente a la proteína del spot 46	145
Apéndice 26. Espectro de masas correspondiente a la proteína del spot 52	146
Apéndice 27. Espectro de masas correspondiente a la proteína del spot 53	147
Apéndice 28. Espectro de masas correspondiente a la proteína del spot 58	148
Apéndice 29. Espectro de masas correspondiente a la proteína del spot 59	149
Apéndice 30. Espectro de masas correspondiente a la proteína del spot 60	150
Apéndice 31. Espectro de masas correspondiente a la proteína del spot 61	151
Apéndice 32. Espectro de masas correspondiente a la proteína del spot 62	152
Apéndice 33. Espectro de masas correspondiente a la proteína del spot 63	153
Apéndice 34. Espectro de masas correspondiente a la proteína del spot 68	154
Apéndice 35. Espectro de masas correspondiente a la proteína del spot 70	155

Resumen

Título: Análisis proteómico de mitocondrias de larvas (L4) de *Aedes aegypti**

Autor: Diana Lizeth Urbina Duitama**

Palabras clave: Análisis proteómico, expresión protéica, *Aedes aegypti*, bioenergética mitocondrial.

Descripción:

El zancudo *Aedes aegypti* es el principal vector de los virus que causan enfermedades como chikunguña, dengue y Zika. Frente a la ausencia de un tratamiento específico para estas enfermedades, surge la necesidad de buscar alternativas que permitan el control de la población del vector. Para ello inicialmente es necesario comprender el funcionamiento de algunas dianas de interés farmacológico como el caso de la mitocondria. Hasta el momento no existen reportes que describan la actividad bioenergética mitocondrial relacionada a su expresión proteínica, por lo tanto, en el presente trabajo de investigación se identificaron las proteínas en mitocondrias aisladas de larvas (L4) de *Ae. aegypti*, mediante técnicas de separación de electroforesis bidimensional y su correspondiente análisis por espectrometría de masas. Se identificaron 36 proteínas implicadas en procesos de transcripción, traducción, fosforilación oxidativa, señalización, biosíntesis, entre otros. Además, se midió su actividad respiratoria con un oxígrafo de alta resolución. Como resultado se obtuvo una tasa de respiración considerablemente mayor mediada por el complejo II con respecto al complejo I. También se cuantificó la actividad enzimática de algunas proteínas que componen los complejos enzimáticos de la cadena transportadora de electrones mitocondrial, donde se obtuvo una mayor actividad de las proteínas NADH oxidasa, NADH deshidrogenasa y NADH citocromo c reductasa con respecto a sus análogos de succinato. Estos resultados aportan una primera descripción de la función metabólica de la mitocondria y relaciona su expresión proteínica que podría servir para el diseño de estrategias de modificación genética dirigida a la organela en estudio.

*Trabajo de Investigación

**Facultad de ciencias. Escuela de química

Abstract

Title: Proteomic analysis of larval mitochondria (L4) of *Aedes aegypti* *

Author: Diana Lizeth Urbina Duitama **

Keywords: Proteomic analysis, protein expression, *Aedes aegypti*, mitochondrial bioenergetics.

The *Aedes aegypti* mosquito is the main vector of viruses that cause diseases such as chikungunya, dengue and Zika. Faced with the absence of a specific treatment for these diseases, the need arises to look for alternatives that allow the control of the vector population. To do this, it is initially necessary to understand the functioning of some targets of pharmacological interest, such as the mitochondria. So far there are no reports that describe the mitochondrial bioenergetic activity related to its protein expression, therefore in the present research work the proteins in isolated mitochondria of larvae (L4) of *Ae. aegypti*, using two-dimensional electrophoresis separation techniques and their corresponding mass spectrometric analysis. 36 proteins involved in processes of transcription, translation, oxidative phosphorylation, signaling, biosynthesis, among others, were identified. In addition, their respiratory activity was measured with a high resolution oxygraph. As a result, a considerably higher respiration rate mediated by complex II over complex I was obtained. The enzymatic activity of some proteins that make up the enzymatic complexes of the mitochondrial electron transport chain was also quantified, where a higher activity of the proteins NADH oxidase, NADH dehydrogenase and NADH cytochrome c reductase was obtained with respect to their succinate analogs. These results provide a first description of the metabolic function of the mitochondria and relate its protein expression that could be used for the design of genetic modification strategies directed at the organelle under study.

*Research work

**Science Faculty. Chemistry school

Introducción

El zancudo *Aedes aegypti* es el principal vector de los virus que causan enfermedades al hombre como el chikunguña, dengue y Zika. Estas dolencias son endémicas de la región tropical y sub-tropical, donde el número de casos reportados de dengue son entre 100 y 400 millones en el mundo (Kraemer et al., 2019).

La fácil dispersión de las enfermedades, está directamente relacionada con la capacidad de vuelo del zancudo, pero se limita a la fase adulta en su ciclo de vida (Russell et al., 2005). Es preciso indicar que el *Ae. aegypti* es un insecto holometábolo, es decir, su desarrollo comprende fases de larva, pupa y adulta, donde esta última tiene la facultad de volar. Estas fases se desarrollan en ambientes diferenciados, la larva y pupa crecen en medio acuoso, mientras que el adulto se desarrolla en un ambiente aéreo. La diferencia de los ambientes donde ocurre el ciclo de vida del *Ae. aegypti* indica una diferencia en su dieta y por lo tanto en su metabolismo (Jacobs et al., 2020).

Para comprender las funciones metabólicas de un organismo se recurre al estudio de la mitocondria (Jacobs et al., 2020). La mitocondria es una organela celular compuesta de dos membranas fosfolípídicas, que contienen la matriz mitocondrial, un espacio donde ocurren procesos catabólicos y anabólicos importantes para la célula (Picard et al., 2011). Por ejemplo, el ciclo del ácido cítrico, β -oxidación de ácidos grasos y oxidación de aminoácidos, además de sintetizar algunas proteínas mitocondriales a partir de su propio material genético (ADNm). La síntesis de ATP también ocurre en la mitocondria, específicamente en la membrana interna, por acción de la ATP sintasa. La función de esta proteína transmembranal se promueve por un gradiente electroquímico generado por la acción de la cadena transportadora de electrones (CTE). La CTE es un conjunto de complejos de proteínas que se encargan de oxidar sustratos como NADH

y FADH₂, mientras que generan un gradiente electroquímico, por la traslocación de iones H⁺, hacia el espacio intermembranal. El proceso acoplado de la acción de la CTE y la ATP sintasa se denomina oxidación fosforilativa (Friedman & Nunnari, 2014).

Las investigaciones reportadas en literatura para el estudio de la actividad mitocondrial en *Ae. aegypti*, incluyen la cuantificación de la actividad enzimática mitocondrial (Borrero Landazabal et al., 2017; Castillo-Morales et al., 2019), medición de la actividad de la oxidación fosforilativa (Correa Soares et al., 2015; Gonçalves et al., 2009) e identificación de aquellas proteínas implicadas (Morais et al., 2016).

Para la medición de la actividad de la oxidación fosforilativa en *Ae. aegypti*, los autores Correa, Gonçalves y Gaviraghi, sugieren el uso de un oxígrafo de alta resolución el cual les permitió medir las tasas de consumo de oxígeno en mitocondrias del músculo de vuelo de *Ae. aegypti*. Los reportes correspondientes a la respiración mitocondrial se dirigieron al músculo de vuelo porque es un tejido de alta demanda energética, como consecuencia el tejido posee un gran porcentaje de mitocondrias. De los resultados publicados se resaltan las diferencias en la oxidación fosforilativa inducidas por la ingesta de sangre en hembras, lo cual los autores indican como una adaptación preferencial de la oxidación de algunos sustratos como la prolina a través del complejo I de la CTE (Correa Soares et al., 2015; Gaviraghi & Oliveira, 2019; Gonçalves et al., 2009).

Por otra parte, se ha reportado la medición de la actividad mitocondrial con el fin de comprender variaciones metabólicas durante el crecimiento de un individuo, para la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*. En un artículo de revisión publicado en 2020, se realizó una primera aproximación en la descripción del papel crucial de la mitocondria durante la conversión de sustratos en biomasa para el individuo. Los autores indican que la capacidad de crecimiento regulada por la mitocondria se limita a la disponibilidad de nutrientes y presencia de xenobioticos

en el hábitat de desarrollo, así como la necesidad de equilibrar las especies reactivas de oxígeno perjudiciales para el organismo (Jacobs et al., 2020).

En cuanto al análisis de la expresión proteínica en *Ae. aegypti*, Morais y colaboradores publicaron una metodología para la extracción de proteínas del tejido del intestino del zancudo. Los autores compararon la expresión proteínica a lo largo de sus etapas larva, pupa y adulto, bajo la hipótesis de encontrar diferencias en su proteoma dependiendo de su dieta y hábitat. Los resultados publicados destacan que las proteínas vinculadas a la producción de energía, señalización y transporte se expresaron en gran medida en la etapa de adultos recién emergidos, mientras que las proteínas, relacionadas en el proceso de traducción, fueron abundantes en las hembras alimentadas con azúcar y sangre. Lo cual sugiere que la expresión máxima de las proteínas en el intestino medio ocurre al final del desarrollo de la etapa adulta. Contrario a las etapas acuáticas donde tuvieron un bajo rendimiento de extracción y separación proteínica (Morais et al., 2016).

Además de comprender la bioenergética mitocondrial en un organismo específico, esta organela también se estudia como una diana farmacológica debido a sus implicaciones vitales a nivel celular. Por ejemplo, en 2017 Borrero y colaboradores reportaron alteraciones sobre la CTE de mitocondrias aisladas de larvas de *Ae. aegypti*, tras la exposición a compuestos sintéticos derivados de alcaloides α -aminonitrilos, los cuales presentan actividad larvicida. Específicamente los autores indicaron una inhibición del complejo I, relacionado con procesos de daño celular, generación de especies reactivas de oxígeno e inducción de apoptosis. Borrero y colaboradores también indicaron una disminución de la actividad de la succinato oxidasa, una enzima que compone el complejo II, sugiriendo una inducción a la pérdida de electrones entre los complejos proteícos de la CTE (Borrero Landazabal et al., 2017). Adicionalmente, en 2019 Castillo y colaboradores publicaron la afectación mitocondrial en larvas de *Ae. aegypti* por acción del aceite

esencial *Salvia officinalis*. Dicho aceite mostró un efecto larvicida y en el estudio de su posible mecanismo de acción, Castillo y colaboradores reportaron una inhibición sobre el paso de electrones a través del complejo II de la CTE (Castillo-Morales et al., 2019).

De los antecedentes citados queda en evidencia que actualmente no se han reportado parámetros de bioenergética mitocondrial o expresión proteica mitocondrial en larvas de *Ae. aegypti*. La ausencia de información en una de las fases del ciclo de vida del zancudo, implica una falta de comprensión del desarrollo durante el ciclo de vida del vector, especialmente en una de sus fases donde se dirigen métodos de control químico. En la etapa larval, *Ae. aegypti* no representa un riesgo para la salud humana y se limita al espacio acuático, por lo tanto el control de la población de larvas al aplicar una sustancia larvicida da buenos resultados (Devine et al., 2008). Por lo tanto, en el presente trabajo de investigación se plantea realizar un análisis proteómico de la mitocondria y el estudio de su actividad en relación a la oxidación fosforilativa, sobre larvas de *Ae. aegypti*, con el fin de aportar información útil en la comprensión de la actividad bioenergética y expresión proteica mitocondrial del vector.

1. Objetivos

1.1 Obejtivo general

Analizar el proteoma de mitocondrias aisladas de larvas (L4) de *Aedes aegypti*.

1.2 Objetivos específicos

- Obtener el perfil proteico bidimensional de proteínas solubles y de membrana de mitocondrias de larvas (L4) de *Aedes aegypti*.
- Identificar las proteínas obtenidas en los perfiles protéicos de mitocondrias de larvas (L4) de *Aedes aegypti*.
- Cuantificar la actividad de la cadena transportadora de electrones de mitocondrias de larvas (L4) de *Aedes aegypti*.
- Relacionar la expresión de las proteínas identificadas en mitocondrias de larvas (L4) de *Aedes aegypti* con su función.

2. Marco referencial

2.1 Análisis proteómico

Un análisis proteómico hace referencia a la identificación sistemática o la cuantificación de las proteínas de un sistema biológico bajo condiciones específicas (Cravatt et al., 2007). La proteómica se puede usar para identificación de péptidos, proteínas y modificaciones postraduccionales, caracterización de la estructura de la proteína y la identificación de las interacciones entre proteína-proteína (Sidoli et al., 2016).

Existen dos estrategias para el análisis de biomoléculas, llamadas “bottom-up” y “top-down”, las cuales se diferencian por los procesos experimentales y por lo tanto también en los resultados. De acuerdo con esto, la estrategia “bottom-up” consiste en introducir péptidos, generados por la escisión enzimática de una o muchas proteínas, a un espectrómetro de masas. Dichas proteínas se separan inicialmente por electroforesis bidimensional o cromatografía líquida (Dutt & Lee, 2000).

En la electroforesis bidimensional se separan las proteínas con base en dos propiedades. La primera etapa se realiza mediante un isoelectroenfoco, donde las muestras son separadas por su punto isoelectrico (pI) independientemente de su masa (Dutt & Lee, 2000). Este proceso se lleva a cabo en una tira de gradiente de pH inmovilizado, donde se impregna la muestra y al aplicar un campo eléctrico, cada proteína migra al punto en el que su valor de pI es equivalente al pH circundante y su carga neta es cero. La segunda etapa de esta separación se realiza en un gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS), y allí se separan respecto a su masa molecular independientemente de la carga. El fundamento de esta etapa es la desnaturalización de

las proteínas con el detergente SDS, el cual se une estequiométricamente al esqueleto del polipéptido otorgándole una gran carga negativa. En términos generales, la unión de las proteínas al SDS genera que todas las proteínas tengan esencialmente la misma densidad de carga y por ende la separación ocurre solo con base en su masa (Rabilloud & Lelong, 2011).

Por otra parte, la cromatografía líquida, puede basarse en diferentes principios, como tamaño, carga, hidrofobicidad o afinidad por ligandos específicos (Shi et al., 2004). En contraste con la electroforesis bidimensional, la separación de esta manera es automatizada y está integrado con el espectrómetro de masas (Dutt & Lee, 2000).

Paso seguido a la separación de las proteínas (electroforesis o cromatografía) se realiza el análisis de cada punto del gel de electroforesis o cada fracción separada, por espectrometría de masas empleando técnicas de ionización suave, como la ionización por electronebulización (ESI) o ionización/desorción láser asistida por matriz (MALDI) (Aebersold & Mann, 2003a). Las matrices más utilizadas son ácidos orgánicos de bajo peso molecular, que presentan un sistema pi conjugado, capaz de absorber energía del láser y pasar el analito a la fase gaseosa, entre las matrices más utilizadas para el análisis de biomoléculas están el ácido α -ciano-4-hidroxi cinámico (HCCA) y el ácido 2,5-dihidroxibenzóico (DHB). La función de la matriz es absorber energía del láser y convertirla en energía térmica para desorber la matriz y con ellas las moléculas del analito. La segunda, es que las moléculas de la matriz protonadas o desprotonadas reaccionarían e ionizarían las moléculas del analito. Específicamente, los analitos se ionizan en sus iones moleculares $[M+H]^+/[M-H]$, generalmente por la transferencia de protones con las moléculas de la matriz cercanas (Egelhofer et al., 2002).

En términos experimentales la matriz y el analito se mezclan en una relación 1:1 y se depositan en un target de acero inoxidable pulido, y se deja evaporar el disolvente logrando una co-cristalización. Paso seguido el target se lleva al equipo, donde hay condiciones de vacío, allí la muestra se irradia con el laser, que se emplea generalmente es de ultravioleta como nítrogeno (337 nm) o Nd:YAG (355 nm) (Egelhofer et al., 2002).

Una vez el analito se encuentra en su fase gaseosa, se pueden analizar empleando un triple cuadrupolo, tiempo de vuelo (TOF), o híbridos de estos. En el analizador TOF las moléculas ionizadas se aceleran aplicando un campo eléctrico de alto voltaje, de esta forma las moléculas se separan de acuerdo a su relación masa/carga y se determina esa relación según el tiempo que tardan los iones en llegar al detector. Finalmente, El registro que se obtiene, corresponde a la masa/carga (m/z) de cada uno de los iones de los fragmentos peptídicos, producto de la digestión enzimática de cada proteína. Los valores de esta relación (m/z) se comparan con bases de datos para obtener una identificación (Aebersold & Mann, 2003).

El resultado del análisis de cada proteína proporciona una huella de masa peptídica, la cual se compara con las masas peptídicas calculadas por la escisión *in silico* de secuencias de proteínas en la base de datos usando la misma especificidad que la enzima que se empleó en el experimento (Twyman, 2012). Adicionalmente, en esta estrategia “bottom-up” puede realizarse un análisis en tándem, donde un ión peptídico se aísla en el analizador de masas y se somete a una disociación para producir fragmentos de iones del producto. La secuencia de aminoácidos del ion precursor original puede deducirse de las masas de los iones fragmento, este proceso se conoce como secuenciación *de novo*, donde los datos se pueden usar para determinar una secuencia de referencia, que sirve para buscar en las bases de datos (Resing & Ahn, 2005).

La segunda estrategia “top-down” consiste en analizar los iones moleculares de proteínas intactas, generados por ESI, de manera que la muestra ingresa al analizador de masas y se somete a fragmentación. Una desventaja de este enfoque es la determinación de masas de iones producto a partir de iones con carga múltiple. Aunque la capacidad de obtener la secuencia completa de la proteína completa, representa una ventaja con respecto al “bottom-up”. En tal sentido, ambos enfoques representan una ventaja en la búsqueda correlativa que no se limita a las bases de datos de secuencias proteicas completas (Resing & Ahn, 2005).

2.2 *Aedes aegypti*: Ciclo de vida, estudios de bioenergética mitocondrial y proteómicos.

2.2.1 *El zancudo Aedes aegypti*

Ae. aegypti, también conocido como *Stegomyia aegypti*, es el responsable de la transmisión de los arbovirus que causan el chikungunya, dengue y Zika al ser humano (Patterson et al., 2016). Su ciclo de vida se diferencia en dos etapas, una acuática donde se desarrolla el huevo, larva y pupa, y otra aérea donde se desarrolla la etapa adulta del zancudo. La etapa acuática dura aproximadamente 7 días, iniciando con la eclosión de los huevos donde emergen las larvas, las cuales pasan por cuatro estadios (L1, L2, L3 y L4) (Clemons et al., 2013). La etapa siguiente, es la de pupa, en este periodo el individuo no se alimenta hasta que emerge el mosquito adulto. La alimentación del adulto se basa en néctar de plantas, pero las hembras también incluyen sangre en su dieta. La ingesta de hemoglobina libera aminoácidos libres en el intestino y este aumento de aminoácidos promueve la producción de vitelogenina, una proteína precursora en la formación de los huevos (Rivera-Pérez et al., 2017).

Las enfermedades asociadas a zancudos son endémicas de zonas tropicales debido a que poseen condiciones favorables para la supervivencia del vector, asociados a temperatura y humedad relativa. Adicionalmente, el ciclo de vida de *Ae. aegypti* tiende a desarrollarse en ambientes domésticos, debido a que en ellos hay recipientes que almacenan agua, convirtiéndose en potenciales criaderos, y la presencia de humanos que sirven como principal suministro de sangre cuando las hembras lo requieren (García-rejon et al., 2008). Esto tiene como consecuencia una rápida propagación, y preocupa que la población mundial en riesgo de contraer dichas enfermedades se esté expandiendo (Kraemer et al., 2019; Morrison et al., 2008).

2.2.2 Métodos de control poblacional del vector

Debido a que hasta ahora no se ha desarrollado una vacuna 100% efectiva para prevenir el contagio de las enfermedades que transmite el *Ae. aegypti* (Henein et al., 2021), los métodos ampliamente empleados se basan en la disminución de la población del vector (McGraw & O'Neill, 2013). Estos métodos pueden ser de carácter cultural, biológico o químico. El control cultural, en términos generales consiste en prácticas domésticas, que involucran hacer el ambiente menos favorable para su desarrollo, con el propósito de prevenir la proliferación de los mosquitos (Murray et al., 2013). Por ejemplo, la limpieza constante o eliminación de recipientes de agua en zonas domésticas, descarta posibles criaderos de larvas de zancudos. También el uso de mosquiteros en el área de descanso de las personas previene la picadura y por lo tanto la transmisión de los arbovirus (Murray et al., 2013).

Dentro de los métodos de control biológico, se encuentra la introducción de organismos que parasitan las poblaciones de la especie a controlar, como es el caso de *Bacillus thuringiensis*,

bacteria aeróbica que presenta actividad larvicida debido a las toxinas “Cry”. Estas toxinas ejercen un efecto letal al unirse a las células epiteliales del intestino medio, alterando el equilibrio osmótico de las células. También se ha probado con la bacteria *Wolbachia pipientis*, la cual está presente en la mayoría de los artrópodos, pero es ausente en *Ae. aegypti*. Su introducción altera la capacidad reproductiva del vector mediante incompatibilidad citoplasmática, reflejada en la incapacidad de los machos, infectados con *Wolbachia*, de producir descendencia viable cuando se combinan con hembras no infectadas (Iturbe-ormaeche et al., 2011; Lacey, 2007).

El control químico, hace referencia al uso de sustancias sintéticas que actúan sobre el vector causando algún tipo de daño para provocar su muerte, por ejemplo, los organofosforados y carbamatos son inhibidores de la acetilcolinesterasa, que conlleva la acumulación del neurotransmisor acetilcolina, produciendo alteraciones en la sinapsis. Otro grupo de insecticidas inhiben la fosforilación oxidativa, lo cual inhabilita la formación de ATP, como el diafenthiuron y la cihexatina (Hemingway et al., 2004). Sin embargo, debido a la exposición de estas sustancias durante cinco décadas y su mala dosificación, se ha generado resistencia en *Ae. aegypti*, presentando alteraciones en el sitio diana o incrementando la tasa de detoxificación de los insecticidas (McGraw & O’Neill, 2013).

Basados en la anterior afirmación, han surgido nuevas estrategias de control empleando modificación genética. Estas estrategias se promovieron con la publicación de la secuencia del genoma de *Ae. aegypti* en el 2007, el cual presenta aproximadamente 1376 millones de pares de bases (Matthews et al., 2018; Nene et al., 2007). Cuatro años más tarde, fue publicado el genoma mitocondrial de *Ae. aegypti*, el cual tiene una longitud de 16655 pares de bases, con 13 genes codificadores de proteínas, 22 de genes de ARN de transferencia, un gen de ARN ribosómico y

una región de control. Adicionalmente, se reportaron las inserciones de copias nucleares de secuencias similares de ADN mitocondrial (Behura et al., 2011).

Un ejemplo de estrategias diseñadas a partir de la modificación genética es la liberación de mosquitos portadores de un gen letal dominante específico para hembras, consiste en reducir la expresión de un gen activo en el músculo de vuelo, resultando en una incapacidad para volar, por lo tanto, de encontrar parejas o huéspedes humanos. Por otra parte, existen otros métodos basados en HEGs, “buscadores de objetivos de endonucleasas”, los cuales se pueden usar como una forma de supresión de la población al dirigirse a los genes para inducir esterilidad o distorsiones en la proporción sexual (Burt, 2003).

2.2.3 Estudios proteómicos en *Aedes aegypti*

Así como los estudios de modificación genética corresponden a una alternativa para explorar métodos de control, en la literatura se han publicado diferentes trabajos donde se analiza la expresión proteica en algunas secciones del insecto, tales como, glándulas salivales, intestino medio, cascarones de huevos. Con el objetivo de describir mecanismos de interacción entre sustancias insecticidas y virus con el zancudo *Ae. aegypti* en diferentes etapas de su ciclo de vida.

Marinotti y colaboradores, reportaron el análisis proteómico de la cáscara de huevo de *Ae. aegypti*, con el fin de identificar las proteínas que brindan propiedades ventajosas para la supervivencia de la especie en periodos desfavorables, como la sequía. Para ello realizaron una extracción de las proteínas de los cascarones de huevo, seguido de una separación por electroforesis SDS-PAGE, para finalmente analizarlas por espectrometría de masas. De manera

complementaria se analizó el transcriptoma y reportaron proteínas de membrana vitelina y proteínas ricas en cisteína que pueden ser componentes estructurales de la cáscara del huevo (Marinotti et al., 2014).

De esta investigación se identificaron un total de 130 proteínas, de las cuales algunas son componentes estructurales, otras correspondieron a enzimas con actividades de peroxidasa y fenoloxidasa. De esta forma, los autores respaldan el desarrollo de estrategias de control vectorial dirigidas a la modificación de la composición de la cáscara de huevo, para que estas sean intolerables a la sequía y en consecuencia disminuir la población del vector (Marinotti et al., 2014).

Popova-Butler y Dean (2009), reportaron el análisis proteómico del intestino medio de larvas (L4) de *Ae. aegypti*, con el objetivo de identificar las proteínas presentes en esta sección del insecto, para posteriores estudios relacionados con la interacción que tiene la toxina Cry, extraída de *Bacillus thuringensis*. Los autores emplearon dos enfoques de proteómica complementaria, una donde separaron las proteínas en un gel de poliacrilamida, seguido de cromatografía líquida y un análisis de espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). Un segundo enfoque basado únicamente en la separación de cromatografía líquida multidimensional de péptidos acoplado a espectrometría de masas. Finalmente, los autores reportaron 36 proteínas, de las cuales destacaron tres proteínas que fueron predominantes en la muestra, arginina quinasa, alérgeno putativo y actina (Popova-Butler & Dean, 2009).

Con el antecedente de este trabajo, en 2012 Cancino y colaboradores, compararon la expresión proteica en larvas (L4) de *Ae. aegypti*, antes y después del tratamiento con la toxina Cry.

Utilizaron electroforesis bidimensional diferencial, y se identificaron los “spots” mediante cromatografía líquida acoplado a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS), de ello resultaron 18 proteínas sobre-expresadas y 7 disminuyeron su expresión. Se reportó que dichas proteínas están involucradas en el recambio proteínico, producción de energía y mantenimiento del citoesqueleto. Adicionalmente, los autores realizaron silenciamiento génico usando RNA de interferencia y analizaron su función. Por ejemplo, al afectar la expresión de la sub-unidad β de la ATP sintasa y silenciar una actina con iARN, las larvas se volvieron hipersensibles a la acción de toxinas (Cancino-Rodezno et al., 2012).

Otro análisis proteómico realizado en el intestino medio, se realizó con el fin de comprender la fisiología del intestino del mosquito *Ae. aegypti* a lo largo de su ciclo de vida y cómo influye el cambio de alimentación, especialmente en hembras que requieren la ingesta de sangre (Morais et al., 2016). En esta publicación se realizó una extracción de las proteínas presentes en el intestino medio de larvas (L4), pupas y adultos hembra, y su separación se llevó a cabo mediante electroforesis bidimensional. De lo cual obtuvieron 13 “spots” para la muestra de larva, 95 para pupa, 90 para adultos recién emergidos y 76 para adultos hembra alimentados con azúcar y sangre. Posteriormente, realizaron un análisis de cada uno de los “spots” por espectrometría de masas que permitió obtener la información necesaria para su identificación. De allí obtuvieron que las proteínas vinculadas a la producción de energía, señalización y transporte se expresaron en gran medida en la etapa de adultos recién emergidos, mientras que las proteínas, relacionadas en el proceso de traducción, fueron abundantes en las hembras alimentadas con azúcar y sangre. Lo cual sugiere que la expresión máxima de las proteínas en el intestino medio ocurre al final del desarrollo de la etapa adulta (Morais et al., 2016).

Dhawan y colaboradores, publicaron el proteoma de las glándulas salivales de hembras de *Ae. aegypti* junto con su análisis transcriptómico. Las glándulas salivales son de gran interés debido a que es allí donde ocurre un primer contacto con el virus y están implicadas en mantener el virus antes de su transmisión, por lo que algunas proteínas se han investigado como objetivos alternativos para estrategias de bloqueo de transmisión del virus. En su trabajo se identificaron 1208 proteínas, las cuales están implicadas en la interacción con el virus y con inmunidad al mismo. Los autores afirman que estos resultados proporcionan bases para futuros estudios en la comprensión de enfermedades transmitidas por vectores desde el punto de vista de las interacciones vector patógeno, y de esta manera permitir el diseño de nuevas estrategias de control (Dhawan et al., 2017).

También se ha descrito la interacción entre el virus chikungunya (CHIKV) y el *Aedes aegypti*, mediante análisis proteómico. En 2020, se publicó la identificación de proteínas del zancudo infectado con el virus y se comparó con individuos libres de virus, en siete tiempos en intervalos de 12 horas. Para cada uno de los siete puntos de tiempo, se identificaron entre 2647 y 3167 proteínas entre las muestras de mosquitos infectados y no infectados con CHIKV, y resultaron menos del 6% de esas proteínas identificadas se vieron afectadas por el virus. Las proteínas identificadas se clasificaron en funciones como la endocitosis, fosforilación oxidativa y biogénesis del ribosoma. Los autores concluyen que la infección por CHIKV provocan pequeñas variaciones en la expresión proteica, lo que demuestra un alto nivel de adaptación entre el vector y el virus, coexistiendo esencialmente en una relación no patógena (Cui et al., 2020).

Por otro lado, *Ae. aegypti* también es responsable de la transmisión del virus Mayaro (MAYV), este es un arbovirus similar al chikunguña. La importancia de mayaro reside en que en los últimos años las infecciones se han incrementado en las zonas urbanas de Brasil (Ribeiro-Filho et al., 2021). En el 2020 se publicó el primer análisis proteómico del estudio del mecanismo por el que este arbovirus afecta las células hospedadoras del mosquito. Se reportaron 161 proteínas diferencialmente expresadas durante el transcurso del tiempo de infección. Estas proteínas están relacionadas con procesos de traducción, metabolismo redox, metabolismo energético y defensa de la célula (Vasconcellos et al., 2020).

Adicionalmente, se han estudiado la expresión proteica de *Ae. aegypti* bajo condiciones de alta salinidad, debido a algunos reportes de la presencia de estos vectores en hábitats costeros. Ramasamy y colaboradores, compararon mediante un análisis proteómico y transcriptómica la tolerancia a la salinidad, y reportan una alteración y un cambio en la cutícula de larvas L4 y adultos, como resultado de la adaptación a la salinidad. Finalmente, los autores sugieren que estos cambios pueden influir en la eficacia de los insecticidas y el crecimiento de las poblaciones del insecto en zonas costeras (Ramasamy et al., 2021).

2.2.4 Estudio de la mitocondria en Aedes aegypti

La mitocondria es una organela involucrada en el metabolismo energético de la célula, mediante la fosforilación oxidativa. También participa en procesos de señalización, crecimiento y muerte celular. Además, poseen su propio material genético, una molécula bicatenaria circular que codifica algunas proteínas de la cadena respiratoria mitocondrial (Picard et al., 2018).

Esta organela posee dos membranas, una interna que envuelve la matriz mitocondrial, en donde se alberga el ADN mitocondrial y se llevan a cabo reacciones metabólicas como el ciclo del ácido cítrico, la β oxidación de los ácidos grasos y aminoácidos, algunas reacciones de la síntesis de la urea y de los grupos hemo (Friedman & Nunnari, 2014). La membrana interna es una bicapa lipídica, de permeabilidad selectiva, que contiene las proteínas de la cadena respiratoria y algunos transportadores específicos para importar o exportar sustratos necesarios para las reacciones que allí se ejecutan. El espacio entre la membrana interna y la membrana externa se conoce como espacio intermembrana. La membrana externa no es tan selectiva y, está compuesta por 60-70% de proteínas integrales llamadas porinas que permiten el paso de moléculas con una masa inferior a 1500 Da (Basu Ball et al., 2018).

Con base en las reacciones de vital importancia para la célula; la mitocondria ha sido objeto de estudio en diferentes campos de la investigación, incluido el estudio de insectos de importancia médica, como el zancudo *Ae. aegypti*. Algunas de estas investigaciones describen el metabolismo energético del vector, como parte fundamental en la comprensión de la fisiología del insecto. Las mediciones de las tasas respiratorias de la organela en presencia de sustratos oxidables, fosfato inorgánico y ADP, permiten tener un registro del grado de acoplamiento entre la actividad de la CTE y la fosforilación oxidativa. Además, permite evidenciar el grado de preferencia de oxidación de algunos sustratos para el proceso de transferencia de electrones en la mitocondria (González-Calvar & Corini, 2004).

Se han establecido protocolos para el estudio de la mitocondria sobre la organela aislada y en el tejido permeabilizado, que permite la medición del consumo de oxígeno con un oxígrafo de alta resolución (Correa Soares et al., 2015; Gaviraghi & Oliveira, 2019). Empleando dichas metodologías se han publicado estudios de la actividad metabólica mitocondrial en el tórax de adultos de *Ae. aegypti*, un músculo de alta demanda energética (Gonçalves et al., 2009). Estos estudios han establecido la influencia de la alimentación sanguínea con respecto a la oxidación preferencial de sustratos para la transferencia de electrones a través de la CTE, destacando el paso de electrones desde la prolina y el piruvato a través del complejo I.

También se han realizado estudios de la actividad mitocondrial en la etapa larval del vector. Por ejemplo, se publicó el efecto de sintéticos derivados de α -amino nitrilos con actividad larvicida, sobre la CTE de mitocondrias aisladas de larvas de *Ae aegypti*. Los autores reportaron un efecto inhibitorio sobre la NADH deshidrogenasa y la succinato oxidasa (Borrero Landazabal et al., 2018). De forma similar se reportó el efecto del aceite esencial de *Salvia officinalis* sobre la actividad de mitocondrias aisladas de larvas de *Ae. aegypti*. En este caso se reportó una inhibición sobre la actividad de transporte electrónico a través del complejo II de la CTE (Castillo-Morales et al., 2019).

Las investigaciones a nivel funcional se complementan con los estudios a nivel estructural, que describe las proteínas implicadas en dichas funciones. En la literatura se encuentra el reporte de algunas proteínas mitocondriales, que han sido inferidas a partir del genoma total ya publicado, esto se logra con la identificación de ortólogos en especies estrechamente relacionadas (Behura et al., 2011; Nene et al., 2007). Específicamente en la base de datos Uniprot, se encuentran las

subunidades 1, 2 y 3 de la citocromo c oxidasa, el citocromo b (Morlais & Severson, 2009; Zhao et al., 2009). También se han aislado las secuencias de ADN que codifican específicamente la subunidad A y c de la ATP sintasa (Gill et al., 1998)

Con la revisión en la literatura de los antecedentes de estudios mitocondriales en *Ae. aegypti*, es evidente que aún no se han reportado proteínas mitocondriales identificadas experimentalmente para el vector en el estadio larval. Por lo tanto, en el presente trabajo de investigación se analizaron las proteínas de mitocondrias aisladas de *Ae. aegypti*, en un estadio larval (L4). Esta etapa es interesante, desde el punto de vista fisiológico, porque la larva tiene un crecimiento rápido desde el momento de la eclosión del huevo y necesita almacenar la energía suficiente para los cambios morfológicos durante la etapa de pupa, donde el insecto no se alimenta, para finalmente llegar al estadio adulto. Además, es en esta etapa donde se dirigen algunas estrategias de control, pues las larvas no representan un riesgo para la salud humana, y que se desarrollen en un ambiente acuático las confina en un espacio definido, contrario a la desventaja de su etapa adulta que es aérea y no se puede delimitar su lugar de desarrollo.

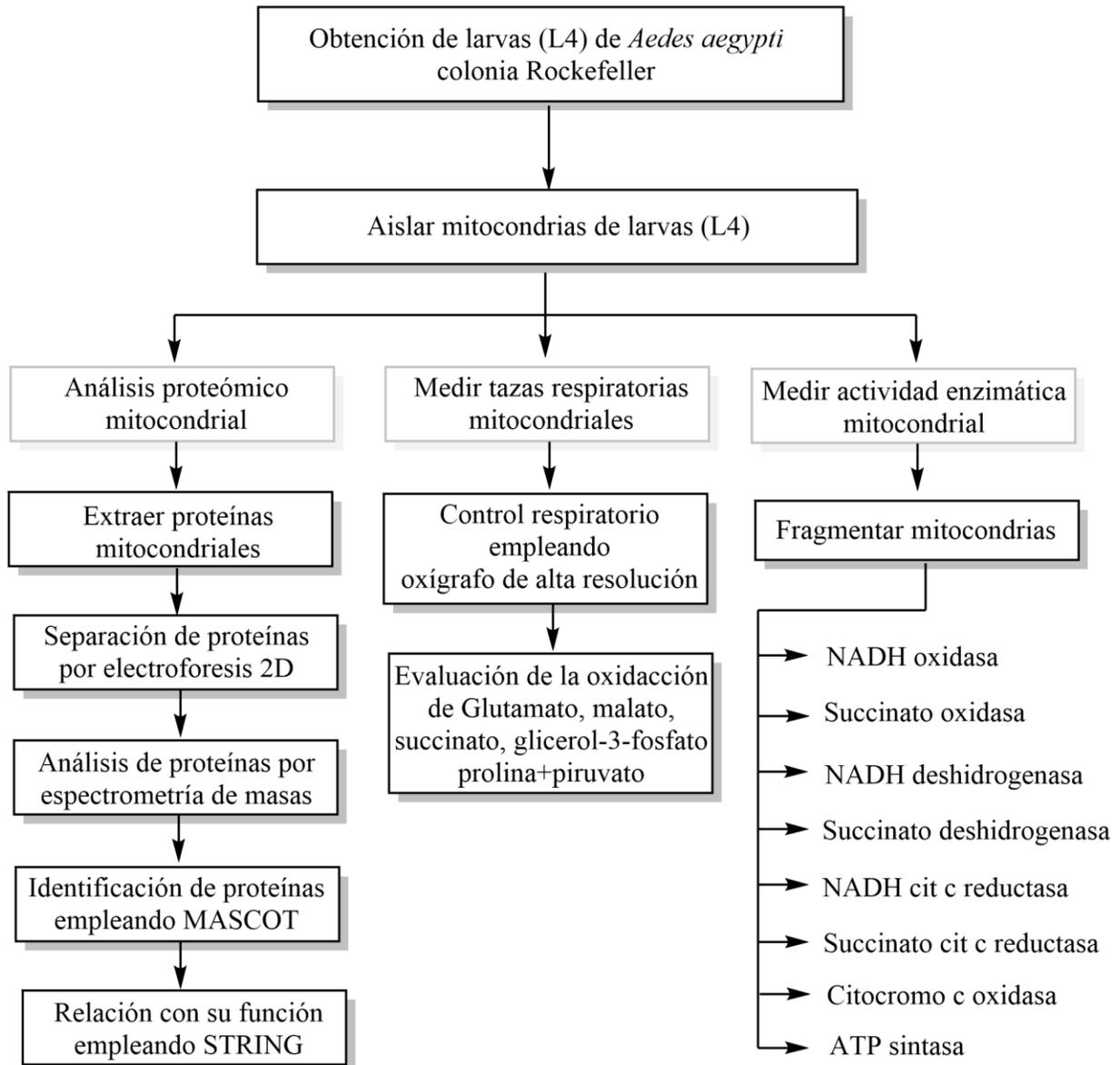
A continuación se describe la metodología detallada que se empleó para la ejecución del presente trabajo de investigación.

3. Metodología

En la Figura 1 se presenta un flujograma de la metodología empleada en el presente trabajo de investigación y seguidamente se detalla cada protocolo ejecutado.

Figura 1.

Flujograma de la metodología del trabajo de investigación



3.1 Material biológico

Se emplearon larvas de *Ae. aegypti* cepa Rockefeller del laboratorio de Entomología Medica del Centro de Investigaciones de Enfermedades Tropicales (CINTROP) de la UIS. Los individuos permanecieron en condiciones de colonia a una temperatura de $25 \pm 5^\circ\text{C}$, humedad relativa de $70 \pm 5\%$ y fotoperiodo 12:12. Los zancudos adultos, se alimentaron con una solución de miel al 10%. Se suministró periódicamente alimentación sanguínea a las hembras para la obtención de huevos, para ello se emplearon ratas albinas (*Rattus norvegicus*) tipo Winstar WI IOPS AF/Han, facilitadas por el bioterio de la facultad de salud de la Universidad Industrial de Santander, cumpliendo las disposiciones de la ley 84 de 1989 del Congreso de Colombia y la Resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia.

La ejecución del presente trabajo de investigación fue sometido a la evaluación del comité de ética de la Universidad Industrial de Santander y aceptado en el acta N° 15 del 11 de septiembre del 2020, teniendo en cuenta las consideraciones del manejo de colonias de insectos y disposición de desechos.

Para recolectar la ovoposición de las hembras, en cada jaula de cría se ubicaron contenedores plásticos con papel filtro humedecido, los cuales fueron retirados cada 8 días. Con el fin de obtener larvas para los experimentos, se sumergieron los huevos en agua libre de cloro. Las larvas eclosionadas fueron depositadas en bandejas plásticas y alimentadas con concentrado para peces TetraMin Tropical Flakes®. Se realizó un seguimiento diario del crecimiento de las larvas hasta que llegaron al estadio L4. Una vez las larvas alcanzaron el estadio L4, fueron separadas empleando una pipeta Pasteur y se transfirieron a vasos plásticos para su posterior uso.

3.2 Aislamiento de mitocondrias

Para la obtención de mitocondrias de larvas de *Ae. aegypti*, se modificó el protocolo descrito por (Borrero Landazabal et al., 2018). Se seleccionaron aproximadamente 1000 larvas (L4), las cuales se filtraron con tela de tul y se depositaron en un tubo de homogenización con 10 mL de medio de aislamiento (BSA 0,1%, EGTA 1 mM, HEPES 10 mM pH 7,2, Sacarosa 250 mM). Para romper el exoesqueleto y homogenizar los tejidos se utilizó un homogeneizador tipo Van Potter. El homogenato obtenido se filtró con gasa de vidrio y la muestra fue recolectada en un tubo Falcon de 50 mL.

Las diferentes fracciones celulares fueron separadas empleando centrifugación diferencial. Se llevó a cabo una primera centrifugación a $300 \times g$ durante 5 minutos con el fin de descartar residuos de exoesqueleto. El sedimento obtenido se descartó y el sobrenadante fue sometido a una segunda centrifugación a $8000 \times g$ durante 10 minutos. El precipitado obtenido fue re-suspendido en 10 mL de medio de aislamiento, y se centrifugó a $7000 \times g$ durante 10 minutos. El precipitado obtenido fue re-suspendido en 10 mL de medio de aislamiento sin BSA y se centrifugó nuevamente a $7000 \times g$ durante 10 minutos. El precipitado final corresponde a mitocondrias.

3.3 Extracción de proteínas

Para la extracción de proteínas mitocondriales de larvas de *Ae. aegypti* se modificó el protocolo propuesto por *Santoni et al.*, (2000). Una vez obtenidas las mitocondrias aisladas, estas se re-suspendieron en 100 μ L de Buffer A (Urea 7 M, Tiourea 2 M, Triton x-100 1,2%, formalitos

1,2% pH=3-10, DTT 20 mM, CHAPS 4% p/v, PMSF 25 mM) y se incubaron en agitación suave durante 15 minutos a 4 °C. Posteriormente, se realizó una centrifugación a 12000 \times g por 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante obtenido, correspondiente a las proteínas solubles en el buffer y se almacenaron a -70 °C. El pellet obtenido, fue re-suspendido en 100 μ L de Buffer de almacenamiento (Mes-Tris 10mM pH=6,5, glicerol 20%, PMSF 1 mM, DTT 1 mM) y se incubó durante 10 minutos en agitación suave manteniendo la temperatura a 4 °C. Después se adicionaron 100 μ L de cloroformo y se incubó durante 24 horas a -70 °C. Posteriormente, se centrifugó a 12000 \times g durante 20 minutos a 4 °C. Se obtuvo una fracción protéica contenida en la interfaz del cloroformo/buffer, la cual se retiró cuidadosamente empleando una pipeta. Las proteínas obtenidas fueron suspendidas en 50 μ L en el Buffer de lisis y se homogenizó la muestra mediante agitación con vórtex.

La concentración de proteínas totales se determinó por el método colorimétrico de Bradford (1976) basado en la formación de un complejo entre el colorante azul de Coomassie G-250 y aminoácidos básicos y aromáticos de las proteínas (arginina, histidina, fenilalanina, triptófano y tirosina). Las medidas se realizaron en un espectrofotómetro UV-VIS a 595 nm, usando albúmina de suero bovino como patrón (Bradford, 1976).

3.4 Separación por electroforesis bidimensional

Las proteínas mitocondriales se separaron por electroforesis bidimensional, en la primera dimensión las proteínas fueron separadas de acuerdo con su punto isoeléctrico, seguido de una separación de acuerdo con su peso molecular.

- Rehidratación de las tiras de gradiente de pH inmovilizado (IPG)

Para separar la muestra por su punto isoeléctrico, se adicionaron 125 μL de una mezcla de muestra a una concentración de 180 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y buffer de rehidratación (Urea 8 M, Tiourea 2 M, CHAPS 4 %, DTT 50 mM, anfolitos 0,2 %, azul de bromofenol 0,002 %). Se emplearon tiras de gradiente de pH inmovilizado 3-10 (IPG) y se dejó la tira en rehidratación durante 16 horas.

- Isoelectroenfoque

Seguido de la rehidratación, la tira se dispuso en un focalizador isoelectrico PROTEAN® i12™ IEF System (Bio-Rad). Y las proteínas se separaron aplicando una diferencia de potencial de forma gradual durante tres etapas; una inicial con un voltaje máximo de 100 V por 20 minutos, la segunda de 4000 V durante 2 horas y la final a un voltaje máximo de 10000 V por 1 hora.

Una vez terminado el isoelectroenfoque, se reequilibraron las proteínas en la tira IPG adicionando 2 mL de buffer de equilibración I (Urea 6M, Tris-HCl 0,38 M pH=8,8, SDS 2 %, glicerol 20 % y DTT 2 %) se dejó en agitación suave durante 10 minutos, este buffer se descartó y luego se adicionó sobre cada tira 2 mL de buffer de equilibración II (Urea 6M, Tris-HCl 0,38 M pH=8,8, SDS 2 %, glicerol 20 % y yodoacetamida 2,5 %) y nuevamente se dejó en agitación suave durante 10 minutos, para finalmente descartarlo. Antes de pasar a la separación por peso molecular, se impregnó cuidadosamente la tira con buffer de corrida.

- Electroforesis por peso

Las tiras se acomodaron horizontalmente sobre el borde superior derecho del gel de poliacrilamida 12 %, donde se separaron las proteínas por peso molecular. Luego se adicionó la agarosa overlay a temperatura ambiente. Cuando se solidificó se puso el gel en la cámara de

electroforesis, donde se aplicó un voltaje de 130 V durante 1 hora y 15 minutos. Se realizó la tinción del gel con azul de Coomassie R-250 en una solución con metanol 50 % y ácido acético 10%. Posteriormente se retiró el exceso de colorante con una solución de (Metanol 5 % y ácido acético 10 %).

Con el fin de tener un registro virtual de los geles obtenidos, se empleó un documentador de geles Gel Doc XR+ System (Bio-Rad) para la toma de la imagen del gel, y para la detección de los spots se utilizó el software PDQuest 2D Analysis, el cual convierte los spots de proteínas a datos digitales que pueden ser analizados y comparados.

- Preparación de la muestra para masas

Una vez señalados los spots de interés, los cuales corresponden a cada una de las proteínas presentes en las mitocondrias de larvas de *Ae. aegypti*, se cortaron y colectaron en tubos eppendorf para su decoloración con Buffer de lavado (Bicarbonato de amonio 50 mM, acetonitrilo 50 %) dejándolos en incubación durante 15 minutos. El proceso de decoloración se realizó varias veces hasta la desaparición de todo el colorante de los cortes de gel. Posteriormente, a cada muestra se adicionaron 50 μ L de acetonitrilo 100 % y se incubó hasta observar que las piezas de gel tomen una coloración blanquecina. El acetonitrilo se removió y las muestras se dejaron secar al aire.

Seguidamente, se realizó la digestión trípica, para lo cual se re-suspendió la muestra en 7 μ L de tripsina 20 mg/mL, seguidamente se realizaron dos incubaciones, la primera durante 30 minutos a 4 °C y la segunda de 12 horas a 37 °C. Al finalizar el tiempo de incubación, se adicionaron 7 μ L de solución de acetonitrilo 60 % y TFA 1 % y se incubaron en baño de ultrasonido

durante 15 minutos. Las muestras se concentraron por secado en un horno a 60 °C. Por último, se re-suspendieron en acetonitrilo 50 % y TFA 1 %.

Las muestras se sembraron en el target para MALDI-TOF, mezclándolos en una relación 1:1 con la matriz (α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid, Sigma-Aldrich), dejando caer 1 μ L de la mezcla en cada pozo. La digestión trípica se analizó con el espectrómetro de masas MALDI-TOF/TOF Ultraflex extreme (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) equipado con un láser Nd:YAG 355 nm y operado con el software FlexControl v.33, ubicado en el parque tecnológico guatiguará, laboratorio 103.

Los espectros se grabaron en modo de ion positivo y se calibraron con un patrón externo de una mezcla de péptidos (Renin substrate, Bradykinin y Bombesin) a 1 ppm.

- Análisis de la huella peptídica de cada proteína

Los espectros se procesaron con Flex Analysis y los valores m/z de las señales de los péptidos se introdujeron en el software MASCOT 2.1 para compararlos con los reportados en la base de datos Swiss-Prot. Con la identificación obtenida del MASCOT se elaboró una tabla que se presenta en la sección de resultados. Se relacionó su función con los reportes en la base de datos Uniprot. Para evidenciar la relación proteína-proteína se empleó la herramienta STRING, que permite establecer diferentes tipos de relaciones con diferentes grados de confianza.

Como muestra de control, se tomó el espectro de un patrón conocido, BSA, y se identificó con el software MASCOT 2.1.

3.5 Medición de la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial

De manera complementaria se evaluó la respiración mitocondrial y se determinó la actividad enzimática de algunas proteínas que la componen. Para evaluar la tasa de consumo de oxígeno, se realizó un control respiratorio. El cual consiste en la suspensión de las mitocondrias aisladas en un buffer que contiene oxígeno disuelto, un sustrato oxidable, Pi y ADP. La cadena transportadora de electrones (CTE), inicia su actividad al adicionar los sustratos oxidables, en este trabajo se emplearon glutamato, succinato, malato, glicerol 3 fosfato y prolina + piruvato.

En el presente estudio, la función respiratoria mitocondrial se determinó con un oxígrafo de alta resolución (Oxygraph-2k, Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria). Las tasas de consumo de oxígeno se expresaron en pmol de O₂ consumido $\cdot s^{-1} \cdot mg^{-1}$ de proteína, registrándose en tiempo real en las dos cámaras del oxígrafo utilizando el software DatLab 4.0. Todos los ensayos fueron ejecutados a 27,5 °C, con una agitación continua a 750 rpm y una concentración de proteína mitocondrial de 0.05 mg/mL. En cada cámara del Oroboros de depósito 2 mL de medio de respiración (Hepes 10 mM (Ph 7.4), EGTA 0.1 mM, Manitol 125 mM, KCL 65 mM) y se permitió llegar a un estado de equilibrio durante 15 minutos. Se evaluaron los sustratos Glutamato (5mM), Malato (10 mM), Prolina (10 mM) + Piruvato (10 mM), Succinato (3 mM) y Glicerol 3 fosfato (20 mM) con el fin de conocer el comportamiento del transporte de electrones desde los complejos I, II y III de la cadena respiratoria mitocondrial. Para los sustratos Succinato y Glicerol 3 fosfato, se adicionó previamente Rotenona (1 μ M) como inhibidor del ingreso de electrones vía complejo I. Posteriormente se adicionó ADP 0,6mM + KH₂PO₄ (1,6 mM) para promover la síntesis de ATP acoplada al consumo de oxígeno a través de la fosforilación oxidativa.

3.6 Medición de la actividad específica de las enzimas de la CTE mitocondrial

Para la medición de la actividad específica de las enzimas de la cadena transportadora de electrones mitocondrial, se fragmentaron mitocondrias aisladas de larvas (L4) *Ae. aegypti*, mediante ciclos de 10 minutos de sonicación en un baño de agua fría. La medición de la actividad enzimática se realizó empleando un oxígrafo de alta resolución (Oxygraph-2k, Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria) o por espectrofotometría (UV/Vis Multiskan GO spectrophotometer from Thermo Scientific).

a) NADH oxidasa

La actividad de la enzima fue determinada por el método de Singer. En la cámara del oxígrafo de alta resolución, se adicionó un medio de reacción compuesto por tampón fosfato 80 mM (pH 7.4) a una temperatura de 27,5 °C. Se adicionó EDTA 50 µM, seguido de 0,05 mg/mL de proteína de mitocondrial. La reacción se inició con la adición de NADH 0,2 mM, y la velocidad de oxidación se cuantificó con base en la velocidad de consumo de oxígeno (Glick & Singer, 2006).

b) Succinato oxidasa

La actividad de la enzima fue determinada por el método de Singer. En la cámara del oxígrafo de alta resolución, se adicionó un medio de reacción compuesto por tampón fosfato 80 mM (pH 7.4) a una temperatura de 27,5 °C. Se adicionó EDTA 50 µM, seguido de 0,05 mg/mL de proteína de mitocondrial. La reacción se inició con la adición de succinato de sodio 10 mM, y la velocidad de oxidación se cuantificó con base en la velocidad de consumo de oxígeno (Glick & Singer, 2006).

c) NADH deshidrogenasa

La actividad de la enzima fue determinada espectrofotométricamente por el método de Singer (Singer 1974). En un medio de incubación compuesto por tampón fosfato 50 mM (pH 7.4) y EDTA 2 mM, se adicionó 0.05 mg/mL de proteína mitocondrial y se incubó a 28 °C durante diez minutos. La reacción se inició con la adición de ferrocianuro de potasio 0,6 mM para iniciar la reacción. La oxidación de NADH por la NADH deshidrogenasa se monitoreó a 420 nm por la reducción del ferrocianuro de potasio que actuó como receptor artificial de electrones en presencia de rotenona 1 μ M. La concentración del ferrocianuro de potasio reducido se determinó mediante su coeficiente de extinción molar $1.043 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ a 420 nm aplicando la Ley de Beer.

d) Succinato deshidrogenasa

La actividad de la enzima fue determinada espectrofotométricamente por el método de Singer (Singer 1974). En un medio de incubación compuesto por tampón fosfato 50 mM (pH 7.4) y EDTA 2 mM, se adicionó 0,05 mg/mL de proteína mitocondrial, rotenona 1 μ M, KCN 1 mM y succinato de sodio 20 mM. Se incubó por diez minutos a 28 °C. Posteriormente, se agregaron los receptores artificiales de electrones fenazina metosulfato (PMS) 1 mM y 2,6-diclorofenilindofenol (DCPIP) 60 μ M para iniciar la reacción. La velocidad de reducción del DCPIP se monitoreó a 600 nm como evidencia de la actividad de la enzima succinato deshidrogenasa. La concentración del DCPIP reducido se determinó mediante su coeficiente de extinción molar $20,7 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ a 600 nm aplicando la Ley de Beer.

e) NADH citocromo c reductasa

La actividad de la enzima se evaluó según el protocolo de Somlo (Somlo 1965). Se usó un medio de incubación compuesto por solución tampón fosfato 50 mM (pH 7,4), EDTA 2 mM, 0,05 mg/mL de proteína mitocondrial, KCN 1 mM y NADH 50 μ M incubado a 28 °C durante diez

minutos. La reacción se inició por la adición de citocromo c (oxidado) 40 μM , el cual se incubó por dos minutos. La concentración del citocromo c reducido se determinó mediante su coeficiente de extinción molar redox (ϵ redox) 19,8 $\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ a 550 nm aplicando la Ley de Beer.

f) Succinato citocromo c reductasa

La actividad de la enzima se evaluó mediante el protocolo descrito por Somlo (Somlo 1965), registrando la velocidad de reducción del citocromo c a 550 nm tras bloquear la cadena respiratoria con KCN y rotenona. Para ello se utilizó un medio de reacción compuesto por solución tampón fosfato 50 mM (pH 7.4), EDTA 2 mM, 0,05 mg de proteína mitocondrial, rotenona 1 μM , KCN 1 mM y succinato de sodio 5 mM incubado a 28 °C durante diez minutos. La reacción se inició por la adición de citocromo c oxidado 40 μM . La concentración del citocromo c reducido se determinó mediante su coeficiente de extinción molar (ϵ redox) 19.8 $\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ a 550 nm aplicando la Ley de Beer.

g) Citocromo c oxidasa

La actividad de la enzima fue determinada espectrofotométricamente por el método de Mason (Mason et al. 1973). En un medio de incubación compuesto por una solución tampón fosfato 50 mM (pH 7.4) y EDTA 2 mM, se adicionó 0,1mg/mL de proteína mitocondrial y se incubó a 28 °C durante diez minutos. La reacción se inició al agregar citocromo c reducido 30 μM . La concentración del citocromo c oxidado se determinó mediante su coeficiente de extinción molar (ϵ redox) 19.8 $\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ a 550 nm aplicando la Ley de Beer.

h) ATPasa

La actividad de la ATPasa se determinó mediante la cuantificación del fosfato resultante de la hidrólisis del ATP siguiendo la metodología descrita por Pullman et al. (1960). El sistema

inicial de reacción consistió en solución tampón Tris-HCl 50mM (pH 7.4), MgSO₄ 3mM, 0,1 mg de proteína mitocondrial, fosfoenolpiruvato (PEP) 2,5 mM y 10 unidades (U) de piruvato quinasa (1 U de piruvato quinasa convierte 1 μ mol de PEP a piruvato por minuto), el cual se incubo a 28 °C durante 10 minutos. La reacción se inició por la adición de ATP 4 mM, con un periodo de incubación de 10 minutos a 28 °C y finalmente se interrumpió al agregar ácido tricloroacético (TCA) al 5%.

Al finalizar la reacción, el sistema se centrifugo a 10000 xg por un minuto. Se tomo el sobrenadante y se le añadió 1 mL de reactivo acomplejante (agua tipo 1, ácido ascórbico 10%, molibdato de amonio 2,5%, ácido sulfúrico 6 N; en proporción 2:1:1:1) para permanecer en incubación durante 1 hora y media a 37 °C protegido de la luz para garantizar la reacción con el complejo. Finalmente, se cuantificó el fosfato liberado en el medio. La concentración de fosfato en las muestras se determinó colorimétricamente por la formación de un complejo de fosfomolibdato reducido con ácido ascórbico, que produce una coloración azul, la cual se cuantifico a 820 nm (Shaw 1971). La concentración de fosfato hidrolizado por miligramos de proteína mitocondrial se cuantificó con una curva de calibración con patrones conocidos de KH₂PO₄ en un rango de concentración de 1 μ M a 200 μ M.

4. Resultados y discusión

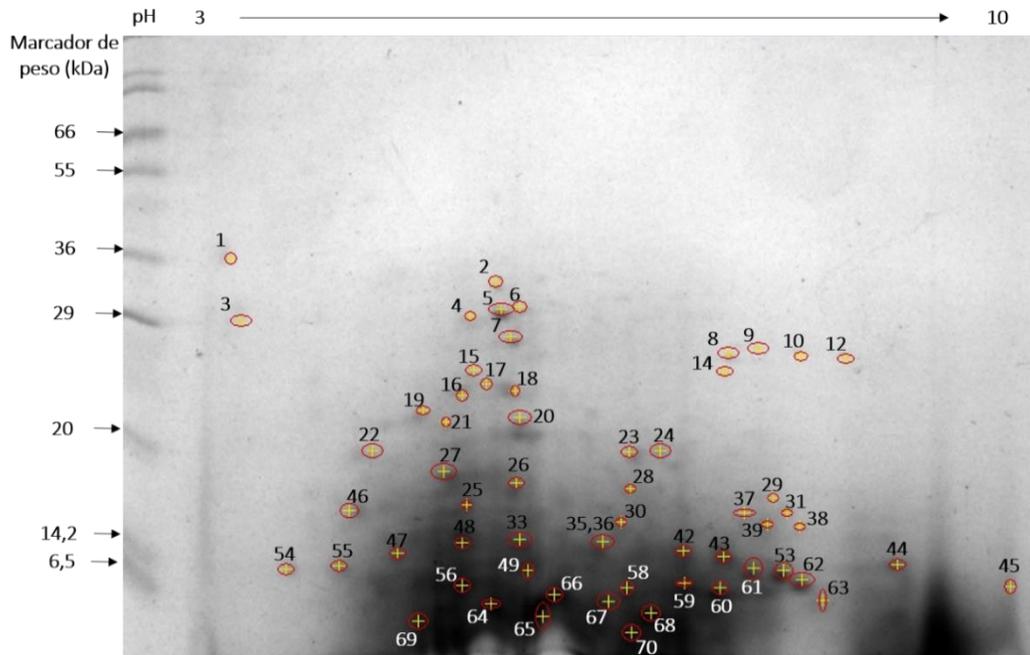
4.1 Obtención del perfil proteico bidimensional

A continuación, se presenta el perfil proteico bidimensional obtenido de las proteínas solubles y de membrana de mitocondrias de larvas (L4) de *Ae. aegypti*. En la Figura 2 se presenta un gel bidimensional representativo de las proteínas solubles, en el cual se observa que los “spots” se distribuyen verticalmente en un rango de peso molecular que va desde los 36 kDa hasta el borde inferior con valores por debajo de los 6,5 kDa. De forma horizontal se distribuyen en un rango de pI desde 3 hasta 10. Con el software PDQuest se señalan y enumeran los spots que se analizaron por espectrometría de masas, del 1 al 70. En la Figura 2 se observan algunas manchas que no se enumeraron, esto se justifica porque no fueron manchas que se repitieran en el triplicado de geles analizados. En la figura 3 se presenta la imagen del gel bidimensional representativo de las proteínas de membrana, en el cual los “spots” se distribuyen de forma similar que, en el gel de proteínas solubles, sin embargo, es evidente que por debajo de los 20 kDa se hacen imperceptibles debido a la sombra oscura en la parte inferior del gel.

Con los triplicados de los geles de cada una de las muestras analizadas con PDQuest se elaboró la imagen master gel, una imagen virtual que representa la ubicación de los “spots” que coincidieron en el triplicado. Se señalaron 70 spots para la muestra de proteínas solubles, como se muestra en la figura 3. Y para cada uno de ellos se predijo un valor de peso molecular y pI, con base en los valores del marcador de peso y los valores extremos de la tira IPG. Mientras que se señalaron 16 spots en el master de los geles de proteínas de membrana, que se presentan en la figura 4.

Figura 2

Perfil proteico bidimensional de proteínas solubles de mitocondrias de larvas L4 de Ae. aegypti

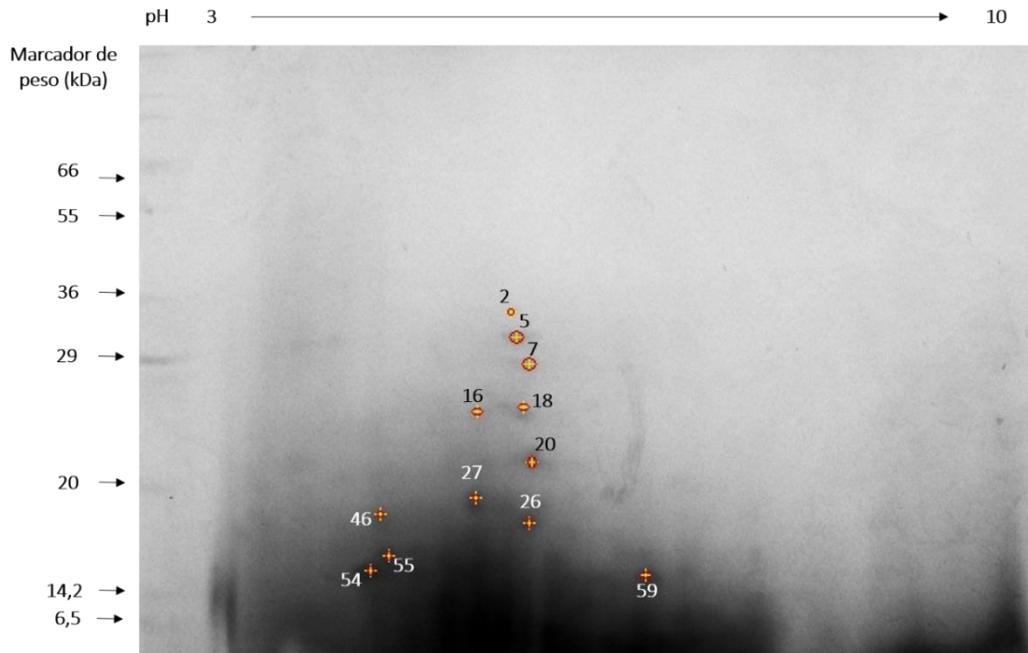


En el master de los geles de proteínas de membrana se encontró que los spots 2, 5, 7, 16, 18, 20, 23, 24, 26, 27, 46, 53, 54, 55, 56 y 59 tuvieron el mismo peso molecular y punto isoeléctrico que los spots con la misma numeración en el master de geles de proteínas solubles. Por lo tanto, es correcto deducir que se trata de las mismas proteínas.

El objetivo inicial de separar la muestra de proteínas mitocondriales era obtener en la muestra de proteínas solubles, aquellas que pertenecen a la matriz mitocondrial y el espacio intermembrana, mientras que, en la muestra de proteínas de membrana se obtuvieran aquellas ubicadas en la bicapa lipídica, que no logran solubilizarse en un primer paso. Sin embargo, al comparar los geles de proteínas solubles con los de proteínas de membrana, se observa que estos últimos no tienen spots diferentes a los obtenidos en los geles de proteínas solubles, lo cual indica que la adición del buffer A es suficiente para solubilizar la mayoría de las proteínas; este buffer ya contiene una concentración adecuada de detergentes, tal como se ha sugerido en la literatura (Duquesne & Sturgis, 2010; Lehner et al., 2003), con el fin de facilitar el proceso de solubilización.

Figura 3

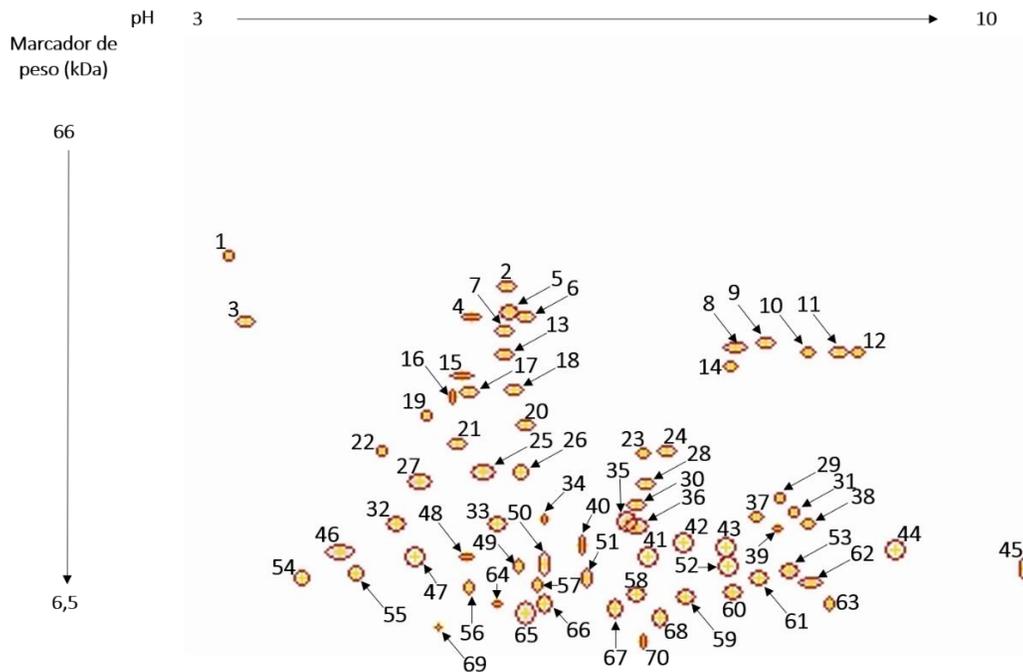
Perfil proteico bidimensional de proteínas de membrana de mitocondrias de larvas L4 de Ae. aegypti



También se observó en el gel de proteínas de membrana una mayor cantidad de “ruido de fondo”, que impide una clara visualización de los spots. Este ruido se atribuye a la presencia de interferencias como son los lípidos. Los reportes en literatura (santoni 2000) sugieren que la adición de cloroformo ayuda a eliminar los lípidos que puedan quedar adheridos a las proteínas transmembranales. La presencia de lípidos reduce la solubilidad, porque pueden formar complejos con los detergentes y por ello se disminuye la efectividad de solubilizar las proteínas. También pueden afectar el peso molecular y pI de las proteínas de interés.

Figura 4

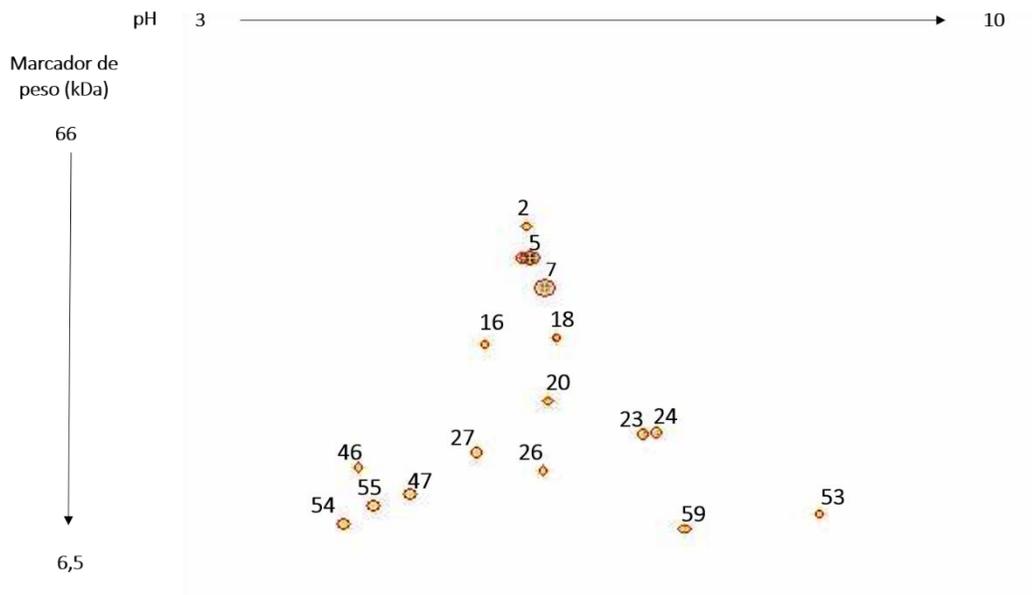
Máster del perfil proteico bidimensional de proteínas solubles de mitocondrias de larvas L4 de Ae. aegypti.



En los geles de proteínas solubles se observó una zona oscura en el extremo inferior derecho, es decir en valores de bajo peso molecular y alto pI. Lo cual puede justificarse por una concentración de proteínas con un pI superior a 10. Esto puede relacionarse con el particular sistema digestivo alcalino de las larvas, que tiene un pH luminal en el intestino medio entre 10,5 y 11,5 (Corena et al., 2004; Linser et al., 2009). Aun cuando la muestra de interés fueron únicamente las mitocondrias, es posible que el ambiente químico de las células intestinales se refleje en el rango de pI de las proteínas implicadas. Además, en consecuencia, algunas proteínas en este rango de pH no se pudieron separar en la electroforesis y por lo tanto no se analizaron. Es recomendable en un futuro estudio emplear tiras IPG con un rango de pH superior a 10 para lograr separarlas de acuerdo con su pI.

Figura 5

Máster del perfil proteico bidimensional de proteínas de membrana de mitocondrias de larvas L4 de Ae. aegypti



De una revisión de geles bidimensionales de larvas de *Ae. aegypti* en literatura, se encontró que en el 2012 Cancino y colaboradores, publicaron el efecto de la toxina Cry11Aa de *Bacillus thuringiensis* sobre la expresión proteica en el intestino medio de larvas de *Ae. aegypti*. En las imágenes de sus geles se observa que alrededor del valor de pH de 10 también hay una gran cantidad de spots que no logran separarse adecuadamente, lo cual coincide con la premisa de que el ambiente alcalino, del intestino de las larvas de mosquitos, influye en el pI de las proteínas de esta parte de la larva (Cancino-Rodezno et al., 2012).

En el trabajo de Morais y colaboradores en el 2016, donde se realizó una comparación de la expresión proteica del intestino de larvas pupas y adultos de *Ae. aegypti*, solo lograron detectar 13 proteínas para el intestino de larvas (L4), y la mayoría de ellas por debajo de 20 kDa. Además, en sus resultados reportaron también una una sombra oscura en el extremo del pH 10, sin embargo estos autores no discuten acerca de la presencia de la mancha y tampoco analizan las proteínas al considerar que la cantidad de muestra obtenida no es la suficiente en el estadio larval (Morais et al., 2016).

Los autores señalan un bajo número de spots en el estadio larval con respecto al estadio de pupa y adulto. En los geles bidimensionales de un rango de pH 3-10, señalaron 13 proteínas en estadio larval, cifra considerablemente menor al número de spots obtenidos en geles de mosquitos adultos, que fue superior a 90 proteínas (Morais et al., 2016). Así que al comparar los resultados de los geles del presente trabajo de investigación con respecto al último publicado en la literatura por Morais y colaboradores, se resalta que se logró obtener una cantidad mayor de proteínas y se lograron separar más spots, lo que representa un avance en el procedimiento de extracción de proteínas de larvas de *Ae. aegypti* (Morais et al., 2016).

4.2 Identificación de las proteínas y relación con su función

El análisis de la identidad de las proteínas se realizó por espectrometría de masas. Se obtuvieron los espectros de la huella peptídica de cada proteína en los geles de proteínas solubles de larvas. La digestión enzimática con la tripsina, induce hidrólisis de los enlaces peptídicos de los aminoácidos lisina y arginina. Con el software FlexAnalysis se calibraron los espectros con los patrones peptídicos y se obtuvieron los valores de m/z correspondiente a cada señal. En este paso

se evidenció un conjunto de señales cercana a los 2100 m/z que se repitieron en todos los espectros, estas señales fueron excluidas para el proceso de identificación.

Para la identificación se empleó la herramienta MASCOT, la cual compara los valores experimentales de los péptidos con las huellas peptídicas de proteínas reportadas en bases de datos (SwissProt), a las cuales el programa realiza una escisión *in-silico* teniendo en cuenta la enzima empleada para la digestión experimental (tripsina), y calcula la masa de cada péptido obtenido. En la Tabla 1 se presentan los resultados de la identificación realizada con la herramienta MASCOT. La primera columna, #spot, corresponde al número asignado a cada uno de los spots en el gel. Junto a esta columna, se encuentra el nombre de la proteína que resultó de la búsqueda en MASCOT. Con base en la búsqueda, esta herramienta calcula un puntaje denominado “protein score”. Este valor indica la probabilidad de que los péptidos de una muestra coincidan con los de la base de datos de proteínas. El cálculo se realiza con base en la fórmula $-10\log_{10}(P)$, donde P es la probabilidad de que el conjunto de la masa de los péptidos procede de la digestión enzimática de la secuencia de la posible proteína.

Para cada proteína se indica la masa estimada en el gel en kDa y la calculada por MASCOT. En la última columna se menciona en que función está implicada la proteína.

Tabla 1

Resultados de la identificación de proteínas mitocondriales de Aedes aegypti

#spot	Nombre de la proteína	Protein Score	Masa en el gel kDa	Masa mascot kDa	Clasificación por función molecular
-------	-----------------------	---------------	--------------------	-----------------	-------------------------------------

1	Sulfato adenililtransferasa	61	35,55	45,90	Metabolismo del sulfuro
2	Enolasa	59	32,67	47,42	Glucólisis/ Gluconeogénesis
3	Proteína E3 ubiquitina ligasa	57	29,27	50,44	Modificaciones proteicas
5	NAD(P)H-quinona oxidoreductasa subunidad H	55	30,16	45,55	Fosforilación oxidativa
7	ARN polimerasa subunidad β	77	29,08	144,31	Transcripción
8	Adenililtransferasa	53	27,03	56,28	Metabolismo
10	CTP sintasa	57	26,67	61,64	Metabolismo
13	Ubiquinona/menaquinona biosíntesis C-methyltransferasa UbiE	70	26,36	27,19	Biosíntesis de la ubiquinona
14	Cisteína –ARNt ligasa	67	25,45	63,105	Traducción
18	Proteína quinasa C	63	78,48	34,09	Fosforilación
20	Timidina quinasa	57	21,15	22,67	Transporte
23	Peroxirredoxina	53	19,48	27,08	Señalización intracelular
24	ARNt dimetilaliltransferasa	57	19,62	35,30	Traducción
25	Leucina--ARNt ligasa	66	18,32	95,93	Traducción
27	S-ribosilhomocisteina liase	59	18,04	17,91	Biosíntesis de aminoácidos
28	Proteína de choque térmico 70KDa 14	63	17,55	55,44	Plegamiento proteico
29	α -defensina-relacionada a la secuencia 2	57	16,72	10,49	Defensa celular
31	Glucocuinasa	62	16,00	34,73	Glucólisis/ Gluconeogénesis
37	Homologo de proteina MAEA	60	15,74	48,32	Transporte de proteínas
38	Proteina GrpE	63	15,37	21,79	Transporte de proteínas

39	ARN helicasa dependiente de ATP	68	15,11	47,35	ARN biogénesis
41	Proteína de choque térmico 70 kDa, mitocondrial	62	12,80	68,91	Plegamiento proteico
42	ARN ribosomal subunidad H metiltransferasa	59	14,52	16,64	ARN ribosómico
44	Transportador de glicina mitocondrial	69	14,09	33,83	Transportador mitocondrial
46	Proteína no caracterizada L862	66	14,03	37,32	-
52	ATP sintasa sub-unidad b	56	10,93	17,91	Fosforilación oxidativa
53	ATP sintasa sub-unidad β	74	9,39	52,31	Fosforilación oxidativa
58	ATP sintasa cadena γ	57	5,23	33,11	Fosforilación oxidativa
59	Homólogo de proteína chaperona HscA	69	4,83	66,85	Plegamiento proteico
60	Importador de fosfato ATP-enlazada a proteína PstB	67	5,43	28,16	Transportador
61	Proteína ribosomal 50S, L6	61	7,91	19,40	Traducción
62	Glutamato--ARNt ligasa	67	7,18	50,57	Traducción
63	Proteína ribosomal 50S, L11	58	4,13	16,73	Traducción
68	Mioglobina	90	2,78	15,77	Transportador
70	Proteína ribosomal 50S, L16	60	1,53	15,27	Traducción

Las proteínas analizadas presentadas en la Tabla 1 corresponden a los geles de proteínas solubles, como se mencionó anteriormente, en los geles de proteínas de membrana no se obtuvieron spots diferentes para ser analizados como otra muestra diferente. 098785

Los valores de “protein score” que indican una alta probabilidad de identificación debe ser superior a 70, tal como lo recomienda el software MASCOT. En este caso se obtuvieron 4 proteínas

con un valor superior a 70. La mayoría no superó este valor pero también puede justificarse debido a que la búsqueda se hace con respecto a los reportes en la literatura y hasta el momento no se encuentran publicados datos proteómicos de larvas de *Ae. aegypti*.

De las 70 proteínas analizadas se lograron identificar 35, las cuales se clasificaron con respecto a sus funciones así; 5 proteínas en procesos de traducción, 2 de transcripción, 7 modificaciones proteicas incluyendo plegamiento proteico, 4 de biosíntesis, 4 de fosforilación oxidativa, 3 proteínas de transporte, 1 de señalización, 4 en diferentes rutas de metabolismo, 2 implicadas en la glucólisis , 1 de defensa celular, una sub unidad de ARN ribosómico y 1 no caracterizada.

Con las proteínas identificadas se elaboró un interactoma con el fin de visualizar la asociación de las proteínas de acuerdo con su función y con la interacción proteína-proteína, para ello se empleó la herramienta STRING: functional protein association networks. El interactoma se elaboró ingresando las proteínas identificadas de la Tabla 1, y la herramienta informática seleccionó aquellas que correspondieran a una secuencia del genoma reportado previamente en la literatura del individuo de interés, en este caso *Ae. aegypti*.

El esquema del interactoma es una red donde las proteínas se representan como nodos (esferas). Los nodos coloreados son las proteínas ingresadas a partir de los resultados experimentales, mientras que los nodos blancos son proteínas que agrega el software STRING para establecer otras interacciones entre proteínas.

En el interactoma las líneas también pueden indicar el nivel de confianza de la asociación según su grosor, así:

Tabla 2

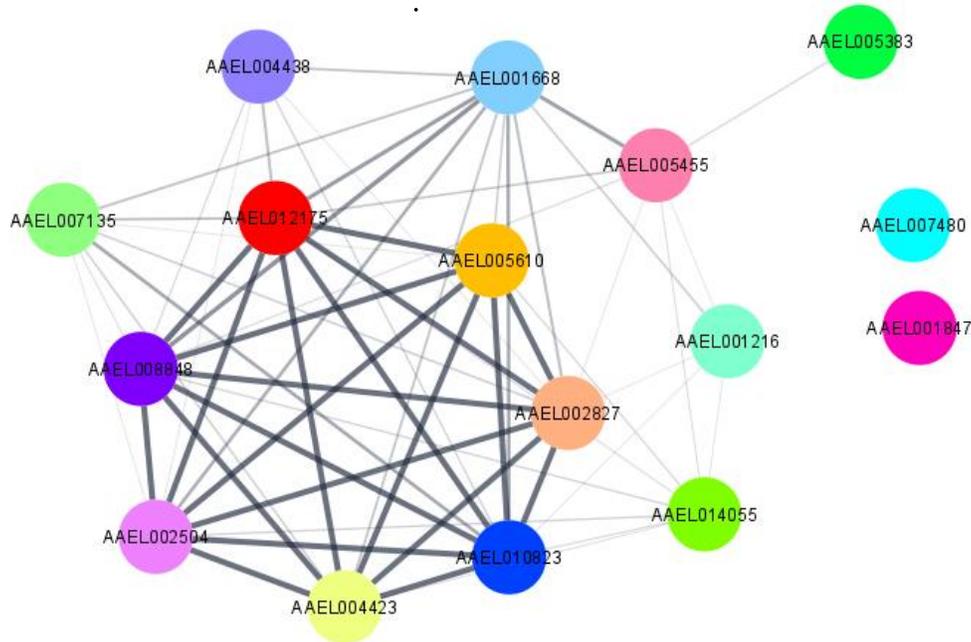
Nivel de confianza del interactoma en STRING

Grosor	Nivel de confianza	Grosor	Nivel de confianza
	Baja 0,150		Alta 0,700
	Media 0,400		Muy alta 0,900

En la Figura 6 se muestra el interactoma de las proteínas identificadas experimentalmente y que se han reportado previamente en literatura para *Ae. aegypti*. La nomenclatura empleada para cada proteína se encuentra descrita en la Tabla 2.

Figura 6.

Interactoma de las proteínas identificadas en mitocondrias de larvas de Ae. aegypti, mostrando la relación de acuerdo con los niveles de confianza establecidos por la herramienta STRING (0,150-0,900).

**Tabla 3.**

Nomenclatura empleada en el interactoma de las proteínas identificadas en mitocondrias de larvas de Ae. aegypti y reportadas previamente en literatura. () Proteínas identificadas experimentalmente en mitocondrias de larvas*

Código en el interactoma	Nombre de la proteína
AAEL004438*	Proteína GrpE
AAEL001216*	ARN helicasa dependiente de ATP
AAEL001668*	Enolasa
AAEL014055*	Timidina quinasa
AAEL007135*	Peroxiredoxina
AAEL005383*	Adenililtransferasa
AAEL007480*	Glutamato-cisteína ligasa
AAEL001847*	ARN polimerasa dependiente de ATP

AAEL005455*	CTP sintasa
AAEL002827*	ATP sintasa subunidad β
AAEL008848*	ATP sintasa subunidad γ
AAEL002504	ATP sintasa cadena δ
AAEL004423	ATP sintasa subunidad d
AAEL005610	ATP sintasa cadena b
AAEL010823	ATP sintasa cadena δ
AAEL012175	ATP sintasa subunidad α

De las 36 proteínas identificadas experimentalmente, solo se encontraron 11 de ellas en STRING para *Ae. aegypti*, las cuales son predicciones de traducción a partir del genoma reportado en literatura. Estas 11 proteínas se etiquetaron en la tabla 2 con un (*), las otras 5 proteínas que se presentan en el interactoma fueron añadidas por el software, con el objetivo de lograr encontrar más interacciones.

4.2.1 Función de las proteínas identificadas y previamente reportadas en literatura para Ae. aegypti

El interactoma de la Figura 6 muestra más interacciones de las esperadas, para un conjunto aleatorio de proteínas de tamaño similar. Esto indica que las proteínas implicadas están conectadas biológicamente. La enolasa es la proteína que presenta interacciones de mayor confianza con el resto de las proteínas identificadas para *Ae. aegypti*.

La enolasa, nombrada como AAEL001668 en el interactoma de la figura 6, correspondiente al spot 2, es una metaloenzima glucolítica que cataliza la conversión de 2-fosfoglicerato en fosfoenolpiruvato durante la glucólisis. Esta proteína exhibe otras funciones que dependen de su ubicación (Didiasova et al., 2019). Por ejemplo, se ha descrito una asociación entre la enolasa y la superficie mitocondrial, aportando estabilidad a la membrana externa (Gao et al., 2014) y participando de la importación de metabolitos (Brandina et al., 2006) y ARNt citosólico hacia la mitocondria (Entelis et al., 2006).

Los primeros estudios que identificaron la enolasa en fracciones mitocondriales altamente purificadas, se realizaron en muestras de *Saccharomyces cerevisiae* (Brandina et al., 2006) y en células de *Arabidopsis* (Giegé et al., 2003). En literatura también se reportan mediciones enzimáticas y estudios proteómicos donde evidencian una participación en la canalización del piruvato, el producto final de la glucólisis, hacia la matriz mitocondrial, donde ocurre el ciclo del ácido cítrico (Entelis et al., 2006).

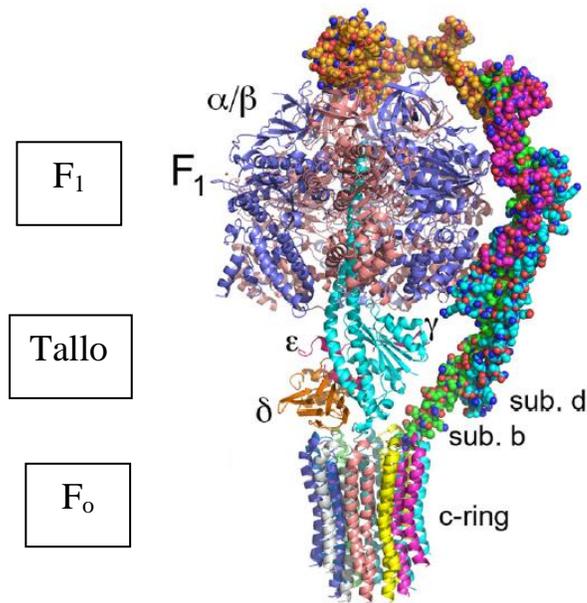
Aunque la enolasa se considera una proteína citosólica y el score obtenido en la identificación no haya superado el valor de 70, los antecedentes indican que es altamente probable encontrar la enolasa en extractos mitocondriales. Por otra parte el valor de su score se justifica por la identificación con base en predicciones a partir de la traducción *in-silico* de su genoma y por lo tanto, es probable que la cobertura de esta secuencia no haya sido la adecuada. Además estas proteínas glucolíticas exhiben entre un 40-90% de homología de secuencia de aminoácidos entre especies (Pancholi, 2001), lo cual reafirma la posibilidad de tener una identificación adecuada con un valor de score inferior a 70.

En cuanto a la relación con las proteínas del interactoma, la enolasa presenta una interacción altamente confiable con las sub-unidades de la ATP sintasa. Al comprender la función que cumple la enolasa y la ATP sintasa se evidencia su relación, pues la enolasa está implicada en la glucólisis, donde el producto final es el piruvato. Esta molécula ingresa a la matriz mitocondrial e inicia el ciclo del ácido cítrico con su oxidación a Acetil-CoA. En este ciclo ocurren reducciones del NAD^+ a NADH , y FAD a FADH_2 , estas moléculas reducidas son las que se emplean principalmente para la respiración mitocondrial. En este proceso ocurren reacciones de oxido-reducción, que a su vez produce un aumento de la concentración de iones de hidrógeno (H^+) en el espacio intermembranal de la mitocondria, lo que se conoce como potencial de membrana. Esta diferencia de concentración induce la actividad de la ATP sintasa (Didiasova et al., 2019).

La ATP sintasa es un complejo de varias proteínas presente en la membrana interna mitocondrial. Su estructura se representa en la Figura 7 y se aprecian las subunidades polipeptídicas que la componen, adicionalmente se identifican las tres subdivisiones de la enzima, F_1 , F_0 y el tallo. La subunidad F_1 sobresale hacia la matriz mitocondrial y tiene una función catalítica sobre la síntesis de ATP, mientras que la F_0 atraviesa la membrana interna mitocondrial, por donde se canalizan los protones desde el espacio intermembrana y el tallo une las subunidades F_1 y F_0 (Xu et al., 2015).

Figura 7.

Representación de la estructura de la ATP sintasa, a partir de la estructura cristalina de rayos x de componentes bovinos. Tomado de Understanding structure, function, and mutations in the mitochondrial ATP synthase (p. 106) por Xu y colaboradores, 2015.



El transporte de H⁺ impulsa la rotación de F₀, el cual se compone de oligómeros de subunidades c que se pliegan en la membrana como una horquilla de dos hélices transmembranales. Se ha reportado que dicha protonación y des-protonación ocurre en residuos aminoacídicos de glutamato o aspartato (Fillingame et al., 2002). El movimiento del anillo oligomérico provoca una rotación del tallo, específicamente de la subunidad γ, la cual pasa a través del centro de la estructura de F₁, compuesta por tres dímeros de subunidades α y β. Cada rotación de 120° de la subunidad γ induce cambios conformacionales de la subunidad β. En una de estas conformaciones se une el ADP y el Pi del medio, a continuación, al cambiar su conformación se une fuertemente el ATP y finalmente llega a la conformación de menor afinidad con el ATP, por lo cual la molécula se libera de la superficie de la enzima (Xu et al., 2015).

De las dos subunidades de la ATP sintasa identificadas experimentalmente en este trabajo (β y γ), la subunidad β nombrada en el interactoma como AAEL002827 y que corresponde al spot 53, presentó un valor de score de 74 en el análisis de MASCOT, por lo que su identidad es altamente confiable.

Por otra parte, la subunidad γ , nombrada en el interactoma como AAEL008848 y correspondiente al spot 58, presentó un score de 57, que deja un grado de incertidumbre acerca de la identificación. Pero al tratarse de otra subunidad de la misma proteína, se considera coherente dicho resultado.

Siguiendo con la relación establecida en el interactoma para la ATP sintasa con la proteína GrpE (AAEL004438), parte del hecho que muchos procesos catalíticos requieren el producto ATP, como la síntesis de macromoléculas o en este caso el transporte de moléculas a través de membranas (Fillingame et al., 2002).

La importación de proteínas hacia la matriz mitocondrial ocurre por la acción del motor asociado a translocasas de presecuencia, conocido como complejo PAM, cuyo componente principal es mtHsp70, el cual, mediante rondas de unión al sustrato, importan las proteínas a la matriz mitocondrial. Su función está regulada por otras subunidades del complejo PAM, por ejemplo, el factor de intercambio de nucleótidos Mge1, se encarga de catalizar el intercambio de ADP a ATP en mtHsp70 para promover otro ciclo de unión de precursores para la importación eficiente de proteínas en la matriz mitocondrial (Kulawiak et al., 2013). El factor Mge1 se ha descrito para levaduras, sin embargo, sus homólogos en cloroplastos se conocen como CGE1 (Westermann et al., 1995) y en bacterias como GrpE. La proteína GrpE identificada en mitocondrias de larvas de *Ae. aegypti*, correspondiente al spot 48, y registrada en el interactoma como AAEL004438, correspondería a este factor de intercambio perteneciente al complejo PAM.

La presencia de la proteína GrpE en mitocondrias de larvas de *Ae. aegypti*, confirma el proceso de importación de proteínas, vital para las funciones mitocondriales porque las proteínas presentes en la matriz mitocondrial se sintetizan en el citosol como pre-proteínas y luego atraviesan las membranas de la mitocondria gracias a una etiqueta en su extremo amino terminal que interactúa con el factor de intercambio (Backes & Herrmann, 2017).

Otra proteína identificada y relacionada en el interactoma que requiere ATP para su actividad, es la ARN helicasa mitocondrial del spot 39 y nombrada en el interactoma como AAEL001216. Esta proteína es un componente esencial del complejo mtEXO, el cual es responsable de la regulación de ARN mitocondrial. Esta afirmación se ha demostrado por medio de ensayos de seguimiento de la actividad y expresión proteica de mitocondrias con bajos niveles de la ARN helicasa mitocondrial. Por ejemplo, en el 2008, se revisaron las consecuencias de la falta de la familia de helicasas (hSUV3) y se encontró una acumulación de especies de ARNmt poliadenilados acortados, reducción de los niveles de expresión de las proteínas de la fosforilación oxidativa, disminución del número de copias del ADNmt y un cambio de la morfología mitocondrial, que finalmente llevaron a senescencia o muerte celular (Khidr et al., 2008).

Además del ATP, el CTP también es una molécula altamente energética, pero su papel en los organismos es más específico. Es un precursor en la síntesis de ADN y ARN, y los fosfolípidos de membranas en levaduras y mamíferos. La enzima encargada de su síntesis es la CTP sintasa, su función catalítica se divide en tres etapas, la primera es una reacción de kinasa dependiente de Mg^{2+} -ATP que fosforila un átomo de oxígeno del UTP uracilo, la segunda una reacción de glutaminasa para generar amoníaco y la tercera una reacción de ligasa que desplaza el fosfato del uracilo por amoníaco (Azzam & Liu, 2013).

LA CTP sintasa identificada en este trabajo en el extracto mitocondrial de larvas de *Ae. aegypti*, correspondiente al spot 10 y nombrada en el interactoma como AAEL005455, se ha reportado en estructuras filamentosas denominadas “cytoophidium” encontradas en células de tejidos de cerebro, intestino, linfa, glándula salival, tráquea y testículos de organismos como bacterias, levaduras, moscas de la fruta y ratas (Goto et al., 2004). También se han encontrado estas estructuras filamentosas en extractos mitocondriales, se puede pensar que como la síntesis de CTP es dependiente de ATP, su asociación con la mitocondria le confiere una ubicación con un acceso facilitado del ATP sintetizado en el interior de la mitocondria (Sun & Liu, 2019). Así que es confiable que la identificación corresponda a la proteína CTP sintasa aun cuando su score fue el más bajo dentro de las proteínas anteriormente mencionadas y su ubicación no corresponde estrictamente a la organela en estudio.

Otra proteína presentada en la Figura 6 como AAEL007135, es la peroxirredoxina, correspondiente al spot 10, también muestra una interacción confiable con la enolasa. Esta proteína, pertenece a la familia de las peroxidasa presentes en la mayoría de organismos, que se encargan de reducir los peróxidos como; H_2O_2 , peróxidos de lípidos o peroxinitritos, protegiendo los componentes celulares del daño oxidativo (Cao et al., 2007).

Las mitocondrias son un sitio importante de generación de peróxido de hidrógeno en las células, donde los electrones se transfieren de la cadena respiratoria al oxígeno molecular, generando el superóxido dentro de la matriz mitocondrial. El superóxido se convierte en peróxido de hidrógeno mediante la acción de la superóxido dismutasa de manganeso. Este peróxido de hidrógeno puede descomponerse por la glutatión peroxidasa (Gpx) y las peroxirredoxinas, las cuales son un componente integral de defensa antioxidante mitocondrial. Un análisis concluyó que

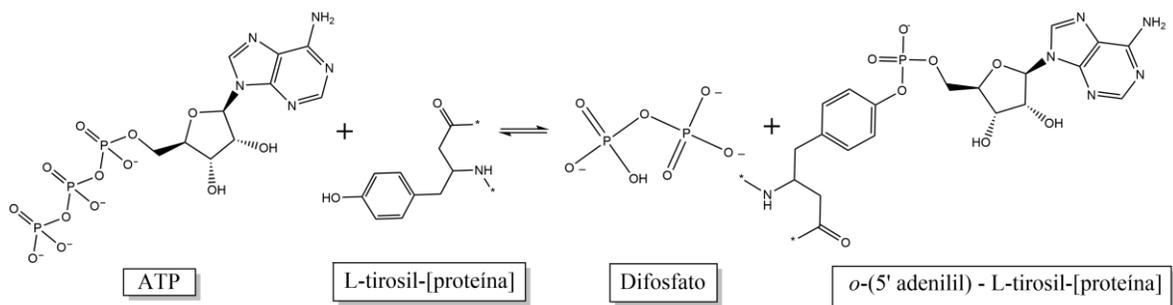
solo el 15% del peróxido de hidrógeno mitocondrial lo descomponen las Gpx, dejando a las peroxirredoxinas responsables de la reducción del peróxido restante (Mailloux, 2018).

Además de la actividad antioxidante de las peroxirredoxinas también tienen una capacidad para funcionar como sensores redox. No obstante, su papel en la señalización es especulativo y se requiere más evidencia experimental para afirmar esta función (Cox et al., 2010).

La proteína adenilil transferasa se registró en el interactoma como la nicotinamida mononucleótido adenilil transferasa (Nmnat) con el código AAEL005383 y corresponde al spot 8. La proteína pertenece a la misma familia de nucleotidiltransferasas, pues su función es transferir grupos de nucleótidos que contienen fósforo. El nombre de la proteína describe el sustrato al cual transfiere el nucleótido fosforilado (Magni et al., 2005). La reacción que cataliza la proteína adenilil transferasa se representa en el Esquema 1, donde se muestra la transferencia reversible de adenosina 5' monofosfato a residuos de tirosina, serina o treonina de una proteína diana.

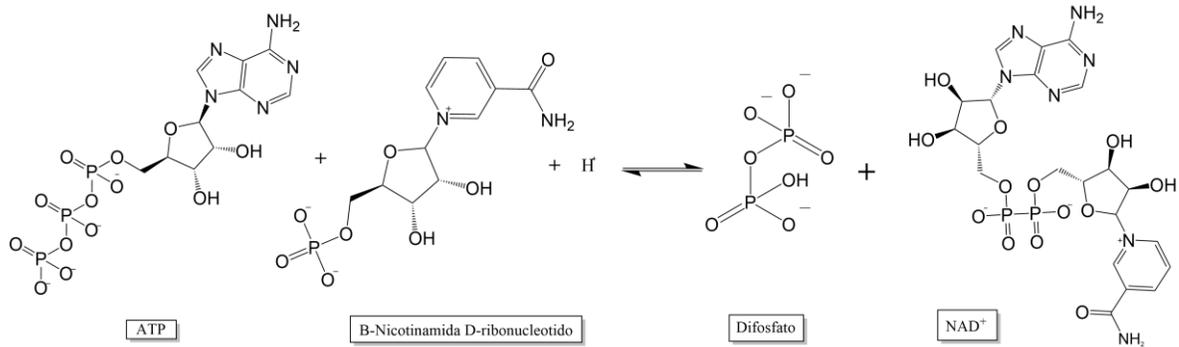
Esquema 1

Actividad catalítica de la proteína adenilil transferasa.



La proteína Nmnat mostrada en el interactoma, cataliza la reacción mostrada en el esquema 2, su función es formar NAD^+ a partir de ATP y NMN.

Esquema 2

Actividad catalítica de la proteína nicotinamida-nucleotido adenililtransferasa

En literatura se conocen los reportes de la presencia del NAD⁺ en el citoplasma donde es requerido para la glucólisis, por parte de la GAPDH pues emplea dos moléculas de NAD por cada molécula de glucosa para oxidar el gliceraldehído-3-fosfato a 1,3-bifosfoglicerato. Tanto el NADH como el piruvato se transportan hacia la matriz mitocondrial mediante lanzaderas malato-aspartato y glicerol-3-fosfato.

Por otra parte, hay evidencia que sugiere que en las mitocondrias están presentes isoformas de la Nmnat que permite realizar la biosíntesis del NAD⁺, por ejemplo, en 2011 se midió la actividad enzimática de la Nmnat en mitocondrias aisladas de alcachofa con NMN añadido (Berger et al., 2005; Magni et al., 2005; Stein & Imai, 2012). La identificación de esta proteína en mitocondrias de larvas de *Ae. aegypti*, afirmarí la evidencia reportada en otros organismos.

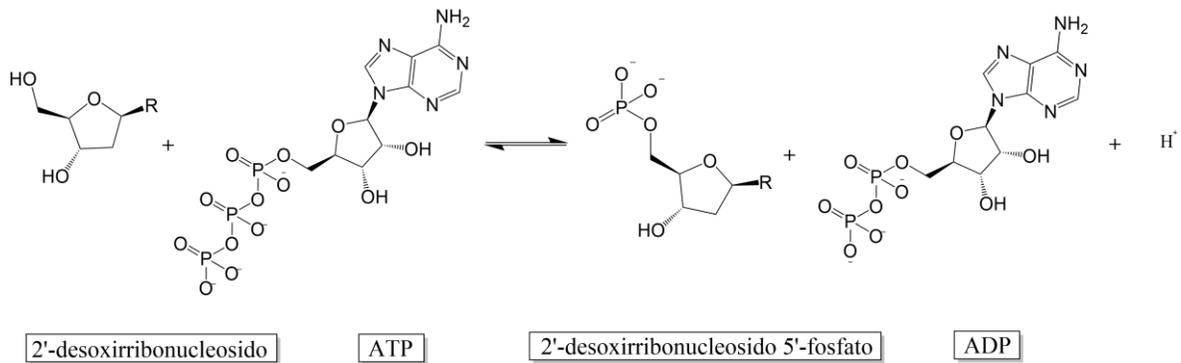
En el interactoma, la proteína AAEL014055, timidina quinasa correspondiente al spot 20, presentó relaciones con otras proteínas de baja confiabilidad. La función de esta proteína es fosforilar la desoxitimidina, pero también puede fosforilar la desoxiguanosina y la desoxiuridina. La reacción que efectúa se muestra en el esquema 4.

La función de la timidina quinasa en la matriz mitocondrial, está relacionada con que esta organela sintetiza su propio material genético. En células eucariotas se conoce que hay dos grupos

de desoxirribonucleótidos, uno que se emplea para la síntesis de ADN nuclear y otro para el ADN mitocondrial, esta discriminación se logra por la impermeabilidad de la membrana interna mitocondrial a moléculas cargadas. El proceso inicia con la importación de los desoxirribonucleósidos por parte de las desoxirribonucleósido quinasa: timidina quinasa y desoxiguanosina quinasa. La timidina quinasa es esencial para mantener las reservas de dNTP para la síntesis y reparación del ADN. Las dos enzimas tienen especificidades de sustrato que permite catalizar la fosforilación de los cuatro desoxirribonucleósidos necesarios para la síntesis de ADN (Eriksson et al., 2002; Rampazzo et al., 2007).

Esquema 3

Actividad catalítica de la desoxinucleósido quinasa. Donde R corresponde a la pirimidina de la timina.



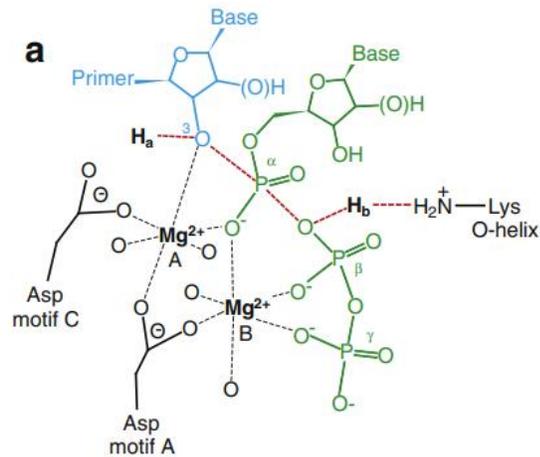
En el interactoma quedaron dos proteínas sin relacionarse con las demás. Una de ellas la ARN polimerasa nombrada como AAEL001847, correspondiente al spot 7, que es responsable de la transcripción del genoma mitocondrial y también proporciona cebadores para la replicación del mtDNA. La ARN polimerasa cataliza la transferencia de nucleótidos para sintetizar ARN mediante el uso de precursores de ribonucleótido trifosfato como sustratos. Para iniciar la transcripción, primero se vincula el promotor del mtDNA catalizando la formación de enlaces fosfodiéster entre

dos ribonucleótidos entrantes. El dinucleótido resultante se extiende posteriormente un nucleótido a la vez hasta que la polimerasa se convierte en un complejo de alargamiento que es capaz de catalizar la síntesis secuencial para obtener ARN (Arnold et al., 2012; Gajewski et al., 2016).

En la identificación experimental de la proteína ARN polimerasa, se reportó un score de 77, un puntaje confiable, la gran diferencia entre las masas reportadas en la literatura y la evidenciada en el gel, se debe a que la masa indicada en la tabla 1, corresponde a toda la ARN polimerasa, que es un complejo de proteínas y ARN, mientras que la identificada en el presente trabajo es solo una sub unidad.

Esquema 4

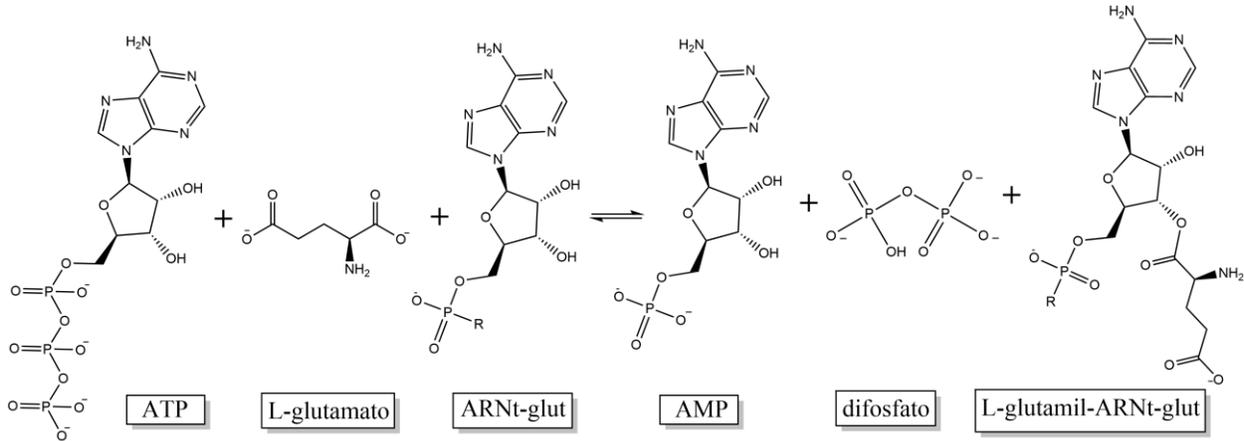
Actividad catalítica de la ARN polimerasa mitocondrial. Tomado de Expression and Purification of Mitochondrial RNA Polymerase and Transcription Factor A from Drosophila melanogaster (p. 200), por Gajewski y colaboradores, 2016.



Otra proteína identificada y relacionada en el interactoma de la figura 6, fue glutamato--ARNt ligasa nombrada en el interactoma como AAEL007480, correspondiente al spot 14, su función es catalizar la unión del glutamato al ARNt en una reacción de dos pasos, el ATP activa el glutamato para formar Glu-AMP y luego se transfiere al extremo aceptor del ARNt, la reacción se muestra en la ecuación 10. Esta proteína se ha descrito en mitocondrias en diferentes organismos como el *Homo sapiens* (Francklyn et al., 2002). La relación de la glutamato--ARNt ligasa en *Ae. aegypti*, se obtuvo a partir de una inferencia de su genoma donde en la base de datos Uniprot se indica un 90% de identidad con esta proteína.

Esquema 5

Actividad Catalítica de la glutamato—ARNt ligasa 1.



Finalmente, con el interactoma de la figura 5 se pudo evidenciar que la mayoría de las proteínas identificadas están implicadas únicamente en funciones mitocondriales. Aquellas proteínas que requieren ATP para su función catalítica, mostraron una relación confiable con las subunidades identificadas de la ATP sintasa, como fue el caso de; la proteína GrpE, la CTP sintasa y timidina quinasa. Mientras que las proteínas implicadas en funciones con el material genético, como la ARN helicasa junto con timidina quinasa y adenilil transferasa, a pesar de requerir ATP para su funcionamiento, mostraron una relación menos confiable, representado en el interactoma mediante líneas menos gruesas. Estas proteínas pueden encontrarse tanto en mitocondria como en el núcleo celular, y por lo tanto el nivel de confianza de las relaciones haya disminuido. Y es la misma situación para las dos proteínas que no presentaron relación con otras proteínas, la ARN polimerasa y glutamato—ARNt ligasa, pues son proteínas que también pueden encontrarse en el núcleo celular.

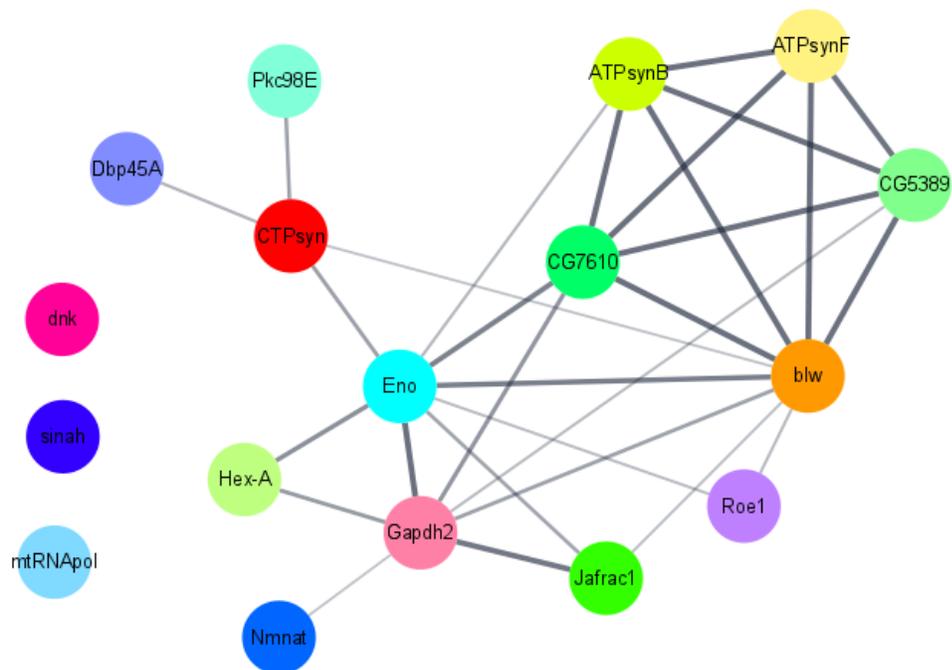
4.2.2 Función de las proteínas identificadas y previamente reportadas en literatura para *Drosophila melanogaster*

Con el fin de obtener un interactoma que relacionara un mayor número de las proteínas identificadas, se decidió elaborar un interactoma con un organismo homólogo ampliamente estudiado, la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*, el cual se muestra en la Figura 8.

De las 36 proteínas identificadas en MASCOT, 14 se reportan en *Drosophila melanogaster*. Comparado con el interactoma elaborado para *Ae. aegypti*, la diferencia no es muy grande, solo 3 proteínas más fueron relacionadas. En general, se observa un grupo de proteínas altamente relacionadas, en la parte superior derecha, estas hacen parte de la ATP sintasa o están relacionadas con la cadena transportadora de electrones mitocondrial. También es evidente que 3 proteínas no presentaron ningún tipo de relación con las demás, estas se muestran en el extremo izquierdo.

Figura 8

Interactoma de las proteínas identificadas en mitocondrias de larvas de Ae. aegypti, usando como modelo proteínas reportadas para Drosophila melanogaster, mostrando la relación de acuerdo con el nivel de confianza establecido por STRING.

**Tabla 4**

Nomenclatura empleada en el interactoma de las proteínas identificadas en mitocondrias de larvas de Ae. aegypti, usando como modelo proteínas reportadas para Drosophila melanogaster.

() Proteínas identificadas experimentalmente en el presente trabajo de investigación.*

Código en el interactoma	Nombre de la proteína
--------------------------	-----------------------

Eno*	Enolasa
Gapdh2	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa 2
HexA*	Hexoquinasa
Jafrac1*	Peroxi-redoxina
Nmnat*	Nicotinamida mononucleotido adenililtransferasa
Roe1*	Proteína homóloga de GrpE mitocondrial
blw	ATP sintasa subunidad α
CG7610*	ATP sintasa subunidad γ
CG5389*	ATP sintasa subunidad β
ATPsyn b*	ATP sintasa subunidad b
ATP syn f	ATP sintasa subunidad f
CTPsyn*	CTP sintasa
Dbp45A*	ARN helicasa dependiente de ATP
Pkc98E*	Proteína quinasa C
mtRNAPol*	ARN polimerasa mitocondrial
Dnk*	Deoxinucleosido quinasa
Sinah*	E3 ubiquitina ligasa

Llama la atención nuevamente la enolasa, presentada en la Figura 8 como Eno, correspondiente al spot 2. En este interactoma se establece un gran número de interacciones con diferentes proteínas. Como se ha descrito anteriormente, esta enzima está implicada en la glucólisis y también se identificó en el interactoma de *Ae. aegypti*, por lo tanto, su función y algunas interacciones fueron descritas con detalle en la página 37. STRING realizó la adición de una

proteína relacionada con la enolasa, la Gapdh2, llamada gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa 2. La adición de una proteína que no fue identificada experimentalmente, permitió establecer relaciones con otras proteínas como la hexoquinasa (HexA), peroxirredoxina (Jafrac1) y nicotinamida mononucleótido adenililtransferasa (Nmnat). La Gapdh2 es una enzima implicada en diversas funciones, como, metabolismo intermedio, fusión de membranas, sensor redox, muerte celular, autofagia y homeostasis del hierro (Pelley, 2012).

Las relaciones mostradas entre la Gapdh2, con la enolasa se debe a la participación en la misma ruta metabólica, la glucólisis. La Gapdh2 convierte el gliceraldehído 3-fosfato en 1,3-bifosfoglicerato. Esta reacción ocurre en dos etapas, primero se oxida el gliceraldehído 3-fosfato, donde el grupo aldehído se convierte en ácido carboxílico y simultáneamente se reduce el NAD^+ a NADH. La segunda etapa emplea la energía liberada de la anterior reacción en transferir una molécula de fosfato inorgánico al sustrato y finalmente se obtiene el 1,3-bifosfoglicerato (Pelley, 2012). La vía de glucólisis resulta en la generación de moléculas de piruvato que a su vez promueven la actividad de la cadena transportadora de electrones y esta se acopla con la ATP sintasa a través del potencial de membrana mitocondrial, y es por ello que en la figura 7, se establece la relación entre Gapdh con las sub-unidades α , β y γ de la ATP sintasa.

La proteína Gapdh también juega un papel interesante en la mitocondria, pues se involucra en mecanismos inductores de la permeabilización de la membrana externa mitocondrial, incluido el estrés celular y senescencia, a través de interacciones con el canal aniónico dependiente del voltaje mitocondrial. Adicionalmente, se ha reportado que esta proteína se acumula en las mitocondrias durante la apoptosis (White & Garcin, 2017).

La enolasa y Gapdh2, muestran una relación confiable con la Hexoquinasa, nombrada en el interactoma como Hex-A, correspondiente al spot 31. Las tres proteínas; Eno, Gapdh2 y HexA,

participan en la glucólisis. La hexoquinasa participa en el primer paso del proceso, fosforilando la glucosa, pero esta enzima también tiene la capacidad de fosforilar cualquier hexosa (Pelley, 2012). Este proceso se lleva a cabo en el citosol, sin embargo, también se han encontrado en la superficie externa de la mitocondria (Arden et al., 2006), por lo cual se puede inferir que estas proteínas se encuentran en la superficie de las membrana mitocondrial externa de larvas de *Ae. aegypti*.

Desde 1960 se han reportado hexoquinasas unidas a la membrana externa mitocondrial. Esta unión facilita el acoplamiento entre la glucólisis y la fosforilación oxidativa a través del acceso privilegiado/preferencial de las hexoquinasas al ATP generado por las mitocondrias. El ADP generado por la actividad catalítica de la hexoquinasa se transporta de regreso a las mitocondrias para la re-fosforilación, lo que confiere una ventaja metabólica (Roberts & Miyamoto, 2015). De esta manera, se comprende que las proteínas implicadas en la glucólisis tienen una relación estratégica con la mitocondria.

Debido a que la actividad de la hexoquinasa no se limita a la glucosa, esta enzima participa en otros procesos que promueve el anclaje de dicha enzima a la superficie mitocondrial. Por ejemplo, se ha reportado en mitocondrias de hígado de rata una relación de las hexoquinasas con proteínas BCL-2 implicadas en la apoptosis. BCL-2, es una familia de proteínas que regulan el proceso de permeabilización mitocondrial y constituyen una vía intrínseca de la apoptosis, entre ellas se encuentra la proteína BAD, la cual hace parte de un complejo holoenzimático ubicado en la membrana externa mitocondrial, junto con la proteína quinasa A y las unidades catalíticas de fosfatasa 1 y su proteína de anclaje WAVE-1. Los autores al evaluar la relación entre la hexoquinasa y BAD, encontraron que una privación de la glucosa induce la desfosforilación de BAD y en consecuencia la muerte celular dependiente de BAD, y cuando se evaluó una deficiencia de BAD se presentó una homeostasis anormal de glucosa. Finalmente, Arden y colaboradores no

descartan la posibilidad que este anclaje de las hexoquinasas en las membranas mitocondriales se deban a una unión intermediada por el citoesqueleto (Arden et al., 2006).

En el interactoma la Nmnat, nicotinamida mononucleotido adenililtransferasa, una proteína de la familia de las transferasas, pues se encarga de transferir grupos de nucleótidos que contienen fósforo, sintetiza NAD^+ a partir de ATP y mononucleótico de nicotinamida (NMN). Esta proteína puede encontrarse en el núcleo, citoplasma o mitocondrias. Se estableció una relación entre la Nmnat y la Gapdh2, porque la Gapdh2 participa en la glucólisis y en este proceso se requiere el NAD^+ que actúa como aceptor de electrones, que se reduce a su forma de NADH. Luego esta molécula reducida, puede ceder sus electrones a la cadena de transporte de electrones y así volver a su forma oxidada, y de esta manera se mantienen los niveles adecuados para las funciones celulares (Pelley, 2012).

Otra relación que se estableció con la Gapdh2 fue con la Jafrac1, la peroxirredoxina identificada del spot 30, cuya función fue descrita para la figura 4. En la figura 6 es posible apreciar nuevamente las relaciones con la enolasa y una subunidad de la ATP sintasa.

Retomando las relaciones que se establecen con la enolasa, se encuentra la proteína homóloga GrpE mitocondrial, nombrada en el interactoma como Roe1, descrita anteriormente en la página 42. Roe1 hace parte del complejo PAM implicado en la traslocación de proteínas hacia la matriz mitocondrial (Cox et al., 2010). En el interactoma de la figura 7, se observa su relación con la enolasa y la subunidad α de la ATP asa, de la misma forma como se ilustró en el interactoma de *Ae. aegypti*.

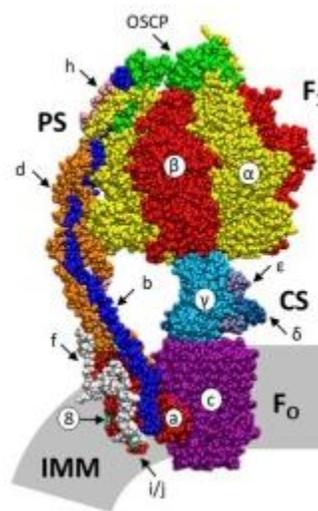
El cluster superior izquierdo, está conformado por subunidades de la ATP sintasa. Las proteínas que se repiten en el interactoma de la Figura 6, son las subunidades α , β , γ , y b. Como

ya se discutió en la página 32, estas hacen parte de la ATP sintasa y, por lo tanto, se evidencia una relación de alta confianza entre todas ellas. También se evidencia la relación con la enolasa que se mostraba en el interactoma del *Ae. aegypti*.

La herramienta STRING realizó la inclusión de la subunidad f, esta subunidad hace parte de la región Fo, ubicada en la membrana interna mitocondrial como se ilustra en la Figura 9 (Zancani et al., 2020).

Figura 9

Representación de la estructura de la ATP sintasa de Saccharomyces cerevisiae. Tomado de Structural and functional properties of plant mitochondrial F-ATP synthase, (p-179) por Zancani y colaboradores, 2020.

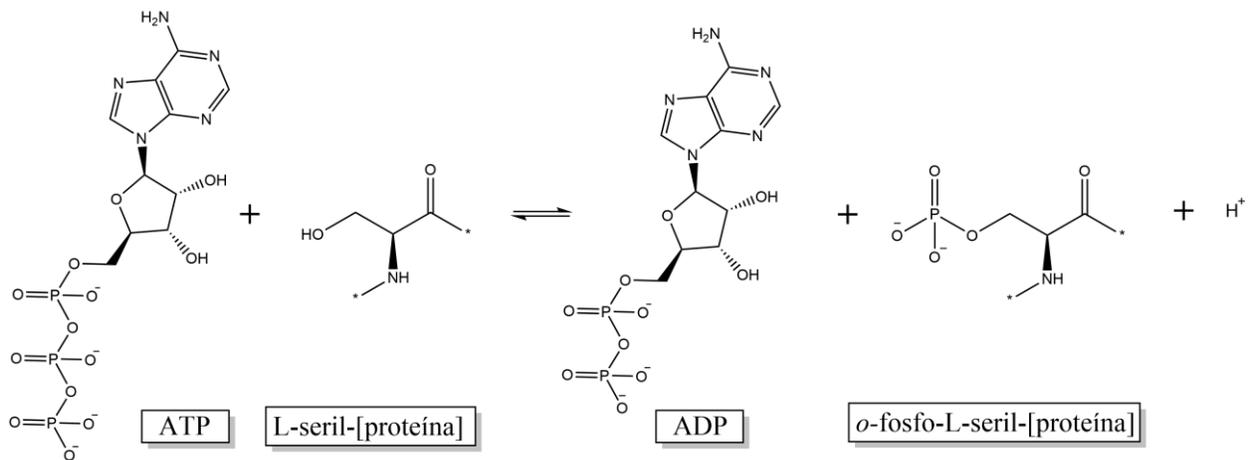


En la figura 8 también se encontró la CTP sintasa, de la cual se discutió anteriormente su función en la síntesis del CTP, otra molécula energética. En cuanto a sus interacciones, se evidenciaron las mismas que en la figura 6, con la enolasa y la ARN helicasa dependiente de ATP, esta última proteína se ha identificado tanto en *Drosophila* como en *Ae. aegypti*.

La función de la proteína quinasa C se representa en el esquema 4, su actividad se ha relacionado con la regulación de las señales de traducción, crecimiento celular, transformación, y expresión génica en las que fosforilan y modulan receptores, canales y factores de transcripción (Shieh et al., 2002).

Esquema 6

Actividad catalítica de la proteína quinasa C



Dentro de la familia de las proteínas quinasas C, se clasifican subfamilias de isoformas como; α , β I, β II y γ , reguladas por calcio, diacilglicerol y fosfolípidos. Otras isoformas como δ , ϵ , θ y η , reguladas por diacilglicerol y fosfolípidos (Shieh et al., 2002).

La proteína identificada de forma experimental en este trabajo fue la isoforma δ . Se ha reportado la presencia de esta proteína en mitocondrias bajo condiciones de estrés. En la literatura se ha demostrado un direccionamiento mitocondrial de la proteína quinasa C δ , en células expuestas a peróxido de hidrógeno. Se ha descrito que la liberación del citocromo induce la apoptosis, y esta liberación inducida por especies reactivas de oxígeno está regulada por la activación y traslocación de la proteína quinasa C δ a las mitocondrias (Majumder et al., 2001).

Otra proteína quinasa identificada experimentalmente y reportada en *Drosophila melanogaster*, fue la timidina quinasa. En el interactoma de la Figura 8, se reportó como Deoxinucleósido quinasa (Dnk), pues la proteína no solo se limita a la timidina si no a todos los deoxinucleósidos. Su función y actividad catalítica se describió anteriormente en el texto en la página 43. En la Figura 8 no se establecieron relaciones con las demás proteínas, a diferencia del interactoma de la figura 6, donde se mostraron interacciones con las subunidades de la ATP sintasa. Probablemente no se pudo establecer las relaciones con las demás proteínas por falta de reportes en literatura de esta proteína en la especie *Drosophila melanogaster*.

En la figura 8 el interactoma dejó 3 proteínas sin establecer relación; la proteína E3 ubiquitina ligasa, la deoxinucleótido quinasa y la ARN polimerasa. La ARN polimerasa (mtRNAPol) identificada experimentalmente del spot 7, cuya función es catalizar la transferencia de nucleótidos para sintetizar ARN mediante el uso de precursores de ribonucleótido trifosfato como sustratos, fue descrita anteriormente en el texto en la página 44.

La proteína E3 ubiquitina ligasa, nombrada como Sinah en la figura 7, correspondiente al spot 3, es una proteína de membrana mitocondrial implicada en muchos procesos de regulación fisiológica como el crecimiento celular, apoptosis y mitofagia (Peng et al., 2016). Su estructura consta de un dominio, llamado RING, expuesto al citoplasma. Una de sus funciones es ubiquitinar un grupo de moléculas señal para la degradación de proteínas a través del sistema ubiquitina-proteosoma. La ubiquitina es una pequeña proteína de 76 aminoácidos (Peng et al., 2016)

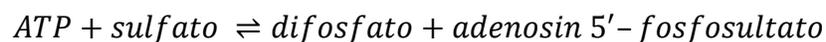
También actúa como una ligasa E3 de pequeños modificadores de tipo ubiquitina, como SUMO, el cual se enlaza covalentemente con residuos de lisina específicos de la proteína sustrato, por ejemplo; la Drp1 o Mfn2, proteínas clave en el control de la fisión y fusión mitocondrial (Peng et al., 2016).

4.2.3 Función de las proteínas identificadas adicionales a las presentadas en los interactomas

De las 36 proteínas identificadas, se lograron relacionar en los interactomas aproximadamente la mitad de ellas. Por lo tanto, es necesario describir la función de las demás proteínas en otros organismos y analizar cómo podrían estar relacionadas.

La proteína sulfato adenililtransferasa, correspondiente al spot 1, mostró un SCORE aceptable de 61 y una diferencia del peso reportado en literatura con el deducido a partir del gel bidimensional. Esta proteína también conocida como ATP sulforilasa, pertenece a la familia de las transferasas, específicamente a las que transfieren nucleótidos que contienen fósforo (Rotte & Leustek, 2000).

Las vías metabólicas para la asimilación del azufre, ya sea en su forma oxidada o reducida, implica la incorporación al grupo tiol de la cisteína, el cual hace parte de proteínas o coenzimas que sirven como donantes de tiol. El papel principal de esta proteína es la activación del sulfato inorgánico, la reacción que cataliza se muestra a continuación:



Sin embargo, esta proteína no se ha reportado en mitocondrias, pues participa en el metabolismo de las purinas, el azufre y estos procesos ocurren en el citosol.

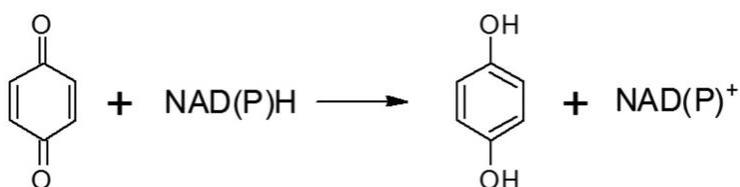
El adenosin 5'-fosfato (APS), es un ahídrido mixto de fosfato y sulfato, el cual se puede fosforilar por acción de APS quinasa, formando 3'-fosfo-5'-adenililsulfato (PAPS). Este producto final, es el donador para la esterificación de metabolitos catalizados por sulfotransferasas (Rotte & Leustek, 2000).

En cuanto a la ubicación de la enzima, la mayoría de sulfotransferasas se encuentran en el citosol, como se ha reportado para la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. También existen reportes en plantas como *Euglena gracilis*, donde encontraron la ATP sulforilasa en mitocondrias, y en *Arabidopsis* en cloroplastos. Sin embargo, esta información está limitada a la falta de estudios en otros organismos (Rotte & Leustek, 2000).

La NAD(P)H-quinona oxidoreductasa, identificada del spot 5, es una enzima que cataliza la reducción de las quinonas. Inusualmente, la enzima trabaja con la misma eficiencia al emplear NADH o NADPH como cofactor. Su ubicación sub-celular es en el citosol, mitocondria, incluso se ha reportado en el núcleo de células cancerosas. En la mitocondria tiene la capacidad de transferir electrones desde el NAD(P)H a quinonas, junto con la traslocación de protones o sodio a través de la membrana interna. Esta enzima cataliza la reacción mostrada en el esquema 5 (Pey et al., 2019).

Ecuación 3

Actividad catalítica de la enzima NAD(P)H-quinona oxidoreductasa



La función de la enzima requiere un cofactor de FAD fuertemente unido, este es reducido por el NAD(P)H en la primera etapa en un mecanismo de sustitución. El cofactor NAD(P)⁺ oxidado luego deja el sitio activo, permitiendo la entrada del segundo sustrato. El segundo sustrato luego es reducido por el FADH₂ (Pey et al., 2019).

La reducción de quinonas a hidroquinonas se ha propuesto como un mecanismo de desintoxicación. La reducción evita la formación de semiquinonas que pueden interactuar con el oxígeno molecular para generar especies reactivas de oxígeno capaces de inducir daño celular.

Otras funciones de la NAD(P)H quinona oxidorreductasa incluyen la capacidad para funcionar como un componente del sistema redox generando formas antioxidantes de ubiquinona (Ross & Siegel, 2017).

La proteína “ubiquinona/menaquinona C-metiltransferasa UbiE”, correspondiente al spot 13, fue identificada y relacionada para *E. coli*. En la literatura se indica que los eucariotas no poseen menaquinona (Marreiros et al., 2016), por lo tanto, la proteína que correspondería en este estudio mitocondrial de larvas de *Ae. aegypti*, sería la ubiquinona c-metiltransferasa. Esta proteína se ha estudiado en levaduras, su función es transferir un grupo metilo a la ubiquinona en su biosíntesis. La ubiquinona, o coenzima Q es un transportador de electrones lipofílicos esencial que se encuentra dentro de la membrana interna mitocondrial de los eucariotas.

En cuanto a la localización subcelular de la ubiquinona c-metiltransferasa, se ha mostrado que se asocia con la membrana interna mitocondrial en el lado de la matriz (Marreiros et al., 2016). Esto indica que la identificación en MASCOT es confiable, según su SCORE y su ubicación celular (Marreiros et al., 2016).

La proteína hipotética cisteína ligasa, identificada del spot 14, es una enzima que cataliza la adición de cisteína al malato de glucosamina, en el proceso de generación de bacilitiol, un compuesto de tiol que se encuentra en las especies de *Bacillus* spp. El bacilitiol puede sustituir al glutatión, que es el tiol intracelular más común en eucariotas. La falta de información de la identificación de esta proteína en organismos cercanos al mosquito *Ae. aegypti*, dificulta relacionar

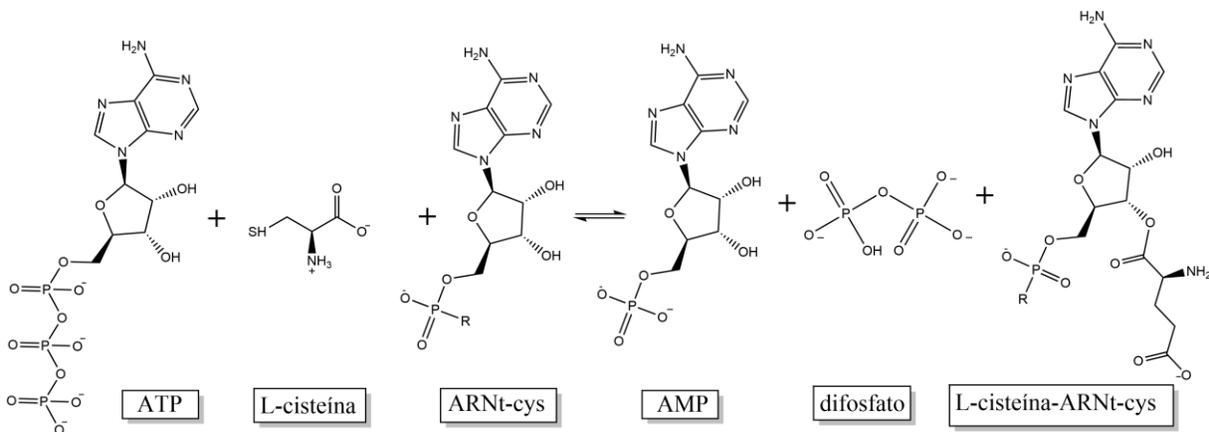
esta proteína con la reportada en este trabajo. La proteína análoga en eucariotas es la glutamato-cisteína ligasa, su función es la condensación de cisteína al glutamato dependiente de ATP, para producir el glutatión, un antioxidante celular (Krejsa et al., 2010).

La glutamato cisteína ligasa también está involucrada en el mantenimiento de tioles proteicos reducidos, desintoxicación del peróxido de hidrógeno, el metabolismo secundario y la eliminación no enzimática de los radicales libres. También protege contra la muerte celular apoptótica (Krejsa et al., 2010).

En literatura se reporta la proteína cisteína—ARNt ligasa mitocondrial, que puede relacionarse a la proteína descrita, cuya función es adicionar la cisteína empleando ATP, en este caso la adición ocurre sobre el ARNt, como se muestra en la ecuación 6 (Huttlin et al., 2010).

Ecuación 4

Actividad catalítica de proteína cisteína—ARNt ligasa mitocondrial

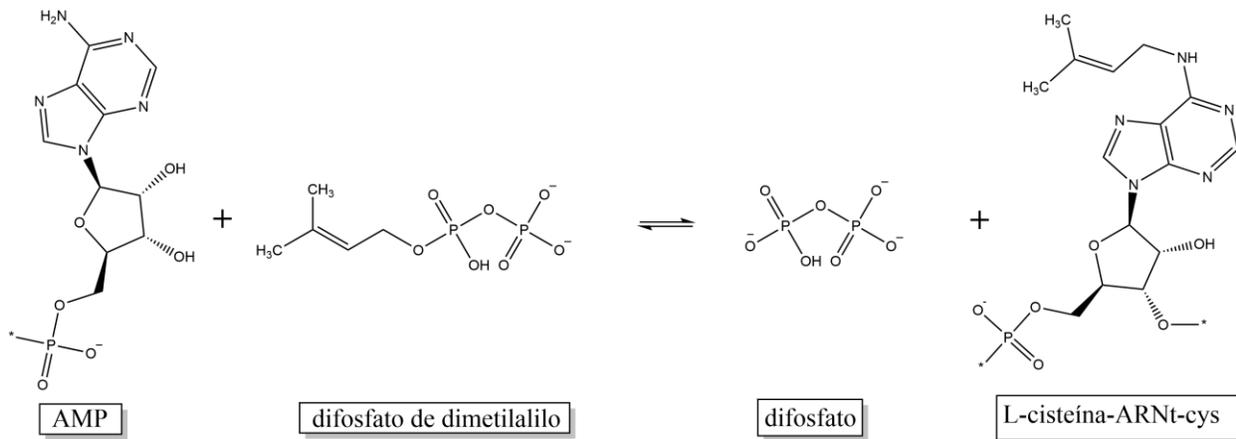


La proteína ARNt dimetilaliltransferasa, identificada del spot 24, conocida también como isopenteniltransferasa, es una enzima que modifica el ARNt citosólico y el ARNt mitocondrial, añadiendo un grupo isopentenilo a la base adenosina en la posición 37, adyacente al anticodón de

subconjuntos específicos de ARNt que decodifican codones que comienzan con uridina. Esta modificación, permite estabilizar el par de bases codón-anticodón adyacente, aumentando la eficiencia de decodificación de los codones correspondientes del código genético. La reacción se muestra en la ecuación 8 (Khalique et al., 2020).

Ecuación 5

Actividad catalítica de la ARNt dimetilaliltransferasa

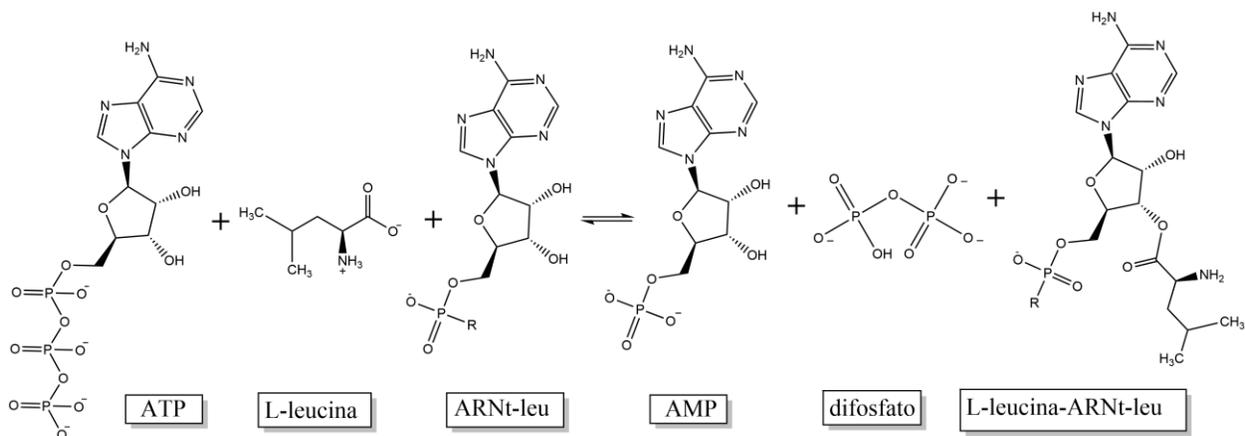


La proteína leucina-ARNt ligasa, identificada del spot 25, pertenece a la familia de proteínas aminoacil.ARNt sintetasas, que participan en la biosíntesis de las proteínas. Su función es catalizar la unión de un aminoácido a su molécula de ARN de transferencia análoga en una

reacción específica, en este caso la L-leucina. Su actividad catalítica se representa en el esquema 9. Esta proteína se puede ubicar en el citoplasma y en la matriz mitocondrial (Francklyn et al., 2002).

Ecuación 6

Actividad catalítica de la leucina-ARNt ligasa



La proteína S-ribosilhomocisteina liase se identificó del spot 27. Esta proteína se ha reportado en el organismo *Escherichia coli* y su función es la síntesis del autoinductor AI-2, un diéster de borato de furanosilo, una molécula de señalización generada por bacterias, que es

secretado por la bacteria y se utiliza para comunicar la densidad celular y el potencial metabólico del medio (Hayashi et al., 2006).

El bajo SCORE (59) en la identificación, la falta de información de la presencia de la proteína en otros organismos y su poca relación con el mosquito *Ae. aegypti*, deja a la proteína S-ribosilhomocisteína con baja confianza de identificación.

Se identificaron dos proteínas heat shock 70 kDa, en los spots 28 y 41. La función de las proteínas de choque térmico, es facilitar la importación, el plegamiento y ensamblaje de proteínas codificadas en el núcleo celular de células procariotas y eucariotas. Se han publicado en levaduras el papel de las proteínas heat shock mitocondriales, las cuales son codificadas por el ADN mitocondrial y sintetizadas dentro de la misma organela. Se ha descrito que la disponibilidad de la función de la proteína influye en el patrón de proteínas sintetizadas dentro de la mitocondria en levaduras (Herrmann et al., 1994).

Un ejemplo específico de la actividad de la proteína heat shock 70 kDa en levaduras, es el mantenimiento de la proteína var1, una subunidad de los ribosomas mitocondriales. También participa en el ensamblaje de las subunidades del complejo de la ATP sintasa codificadas en la mitocondria. Además, la proteína heat shock interactúa con otras proteínas que promueven la biogénesis de la citocromo c oxidasa, el complejo IV de la cadena de transporte electrónico (Böttinger et al., 2015).

Se identificó una secuencia relacionada con α -defensina en el spot 29. La proteína α -defensina pertenece a una familia de péptidos ricos en cisteína que actúan como defensa del huésped, pues tienen actividad antimicrobiana o señalización inmunitaria. El sistema inmunológico de los animales se encarga de la producción de estos péptidos que generalmente

tienen una carga positiva que interactúa y altera la superficie celular de microorganismos patógenos que está cargada negativamente (Parvy et al., 2019).

Resulta interesante la identificación de una proteína relacionada con la defensina que se ha publicado en larvas de *Drosophila*, la cual se produce principalmente en el intestino (Parvy et al., 2019). Sin embargo, este es un péptido que se transporta al exterior de la célula y no hay reportes de la presencia de estos péptidos sobre la mitocondria, así que su identificación en mitocondrias de larvas de *Ae. aegypti* no es confiable.

La subunidad de la metiltransferasa de ARN ribosomal identificada del spot 42, tiene por función metilar la uridina del ARN. Se ha demostrado que se requieren algunas modificaciones de los nucleósidos del ARN ribosómico para su ensamblaje correcto, interacción con ligandos ribosómicos y el buen funcionamiento de mecanismos reguladores. Aunque ninguna modificación del ARN es necesaria para la capacidad de sintetizar proteínas de un ribosoma, sí influye en la eficiencia de la biosíntesis. Esta proteína encargada de modificar el ARN, también se ha encontrado en la mitocondria, pues esta organela posee su propio ADN y su propia maquinaria de traducción de proteínas. Las enzimas encargadas de esas modificaciones como la metiltransferasa, son codificadas en el núcleo y se importan a la matriz mitocondrial (Lopez Sanchez et al., 2020).

El transportador de glicina mitocondrial, identificada a partir del spot 44, tiene como función importar glicina a la matriz mitocondrial. Desempeña un papel importante en el suministro de glicina para el primer paso enzimático en la biosíntesis del hemo, la condensación de glicina con succinil-CoA para producir 5-aminolevulinato (ALA) en la matriz mitocondrial. Esta proteína se ha descrito en levaduras y humanos hasta el momento (Lunetti et al., 2016).

Por otro lado, las chaperonas son aquellas proteínas implicadas en el plegamiento correcto de otras proteínas recién sintetizadas y evita la agregación de proteínas. La chaperona HscA, se identificó experimentalmente del spot 59, y en literatura se ha reportado en procariotas, es una proteína homóloga de la Hsp70 y la estructura de estas proteínas si está altamente conservada entre especies. La actividad de esta familia de chaperonas se correlaciona con su capacidad para unirse e hidrolizar ATP a ADP. A su vez, la actividad de la ATPasa se estimula mediante la unión del sustrato. Se ha descrito que la función específica de la chaperona HscA está relacionada con la biogénesis de grupos de hierro-azufre (Puglisi & Pastore, 2018).

La función de la chaperona HscA se relaciona con la función de la proteína previamente mencionada GrpE, porque esta última se encarga de transportar hacia la matriz mitocondrial precursores de proteínas que al llegar a la matriz mitocondrial, requieren adquirir su estructura terciaria para ser funcionales, y es allí donde la proteína HscA interviene y por medio de secuencias específicas, participa en este plegamiento (Puglisi & Pastore, 2018).

La proteína importadora de fosfato de unión a ATP se identificó a partir del spot 60, su función es transportar fosfato inorgánico a la matriz mitocondria, que es esencial para la síntesis aeróbica de ATP. Este proceso es dependiente de energía. Los portadores mitocondriales facilitan el transporte de una variedad de sustancias a través de la membrana mitocondrial interna y se caracterizan por una estructura común de seis hélices transmembrana y comparten motivos conservados en su secuencia primaria (Mayr et al., 2007).

En los geles de proteínas solubles se identificaron tres proteínas ribosomales 50S, en general los ribosomas se ubican en el citosol, en mitocondrias, cloroplastos y retículo endoplasmático rugoso. Y se diferencian de acuerdo con su coeficiente de sedimentación, en el caso de los mitocondriales, se pueden encontrar en un intervalo de 50-70S. Los ARN ribosomales

mitocondriales están codificados por el ADNmt, mientras que las proteínas ribosómicas están codificadas en el genoma nuclear y luego se importan a las mitocondrias, donde finalmente se ensamblan para formar los ribosomas mitocondriales, encargados de traducir los ARNm (Sylvester et al., 2004).

Las proteínas identificadas fueron proteínas ribosomales 50S L6 del spot 61, L11 del spot 63 y L16 del spot 70, descritas para microorganismos y bacterias. En literatura se ha encontrado evidencia experimental a nivel de transcritos de los ribosomas mitocondriales en *Ae. aegypti* que son 39S. Al comparar la proteína L16 con la L27 de *Ae. aegypti*, resulta que la proteína L16 posee 139 residuos con una masa calculada de 15270 Da y la L27 141 con una masa calculada de 16100 Da. Para futuros análisis sería recomendable verificar su identidad.

La mioglobina identificada a partir del spot 68, es una proteína estructural y funcionalmente parecida a la hemoglobina. Su función es almacenar oxígeno. En literatura se ha reportado la localización de la mioglobina en fracciones mitocondriales aisladas de músculo esquelético de rata. Específicamente los autores reportan una interacción de la mioglobina con la subunidad IV de la citocromo c oxidasa, lo cual le permite a la miglobina obtener directamente el O₂ (Yamada et al., 2013).

La anterior explicación resulta interesante al ser la mioglobina la proteína con mayor SCORE (90), es decir su identidad es confiable y además su ubicación en el extracto mitocondrial ha sido reportada en literatura.

Finalmente, se evidencia la ausencia de información para el vector *Ae. aegypti*. Con base en los reportes realizados en diferentes organismos es posible describir la función y ubicación de las proteínas anteriormente reportadas. Además de identificar las proteínas mitocondriales en

larvas, el interés del presente trabajo de investigación es comprender algunos aspectos de la mitocondria, como su expresión proteínica, y también su funcionamiento. Es por ello, que se realizaron algunas mediciones de respiración mitocondrial y actividad enzimática de la CTE de larvas (L4) de *Ae. aegypti*.

4.3 Medición de bioenergética y actividad enzimática mitocondrial

En literatura se ha descrito en detalle el funcionamiento de la CTE mitocondrial, sin embargo, también se conoce bien que la actividad de la organela depende del tipo de tejido en el que se encuentra. Por ejemplo, se ha descrito que en insectos voladores, el músculo de vuelo posee una de las tasas metabólicas más altas de la naturaleza y por lo tanto posee una cantidad de mitocondrias considerablemente mayor con respecto a otros tejidos (Aw et al., 2016). Así mismo, la actividad mitocondrial también varía dentro de un individuo cuando se trata de insectos que experimentan metamorfosis, tal como se ha reportado para *Drosophila melanogaster* (Jacobs et al., 2020).

Teniendo en cuenta que la actividad mitocondrial no es igual en todos los organismos ni en todos los tejidos, resulta interesante medir parámetros respiratorios sobre larvas (L4) de *Ae. aegypti*. Para ello, en el presente trabajo de investigación se realizó un control respiratorio, que consiste en medir las tasas de consumo de oxígeno empleando un oxígrafo de alta resolución. En los experimentos se varia la disponibilidad de los sustratos oxidables que donan los electrones a la CTE para promover el proceso de respiración, que finalmente se cuantifica experimentalmente

como una disminución de la concentración de oxígeno en el medio de reacción (Djafarzadeh & Jakob, 2017).

El control respiratorio se inicia con la adición del extracto mitocondrial en un medio de respiración isotónico a 37 °C y agitación constante. Luego se adicionan los sustratos oxidables junto con una fuente de fosfato inorgánico, con el fin de iniciar la transferencia electrónica a través de la CTE y por lo tanto se observa un aumento en la tasa de respiración que corresponde a una disminución de la concentración de oxígeno en el medio. A este intervalo de tiempo se le denomina **Estado 2**. Seguidamente se adiciona ADP para inducir la síntesis de ATP, en este paso la mitocondria se encontrará con las condiciones adecuadas para promover una respiración alta, es decir, se observa en el experimento el mayor estado de tasa respiratoria, y se denomina **Estado 3**. Pasado unos minutos, se espera que la concentración de ADP haya disminuido por acción de la ATP sintasa y por lo tanto se llegaría a un **Estado 4**, donde los sustratos oxidables y el ADP se agotan y la mitocondria disminuye su tasa respiratoria (Gnaiger, 2014).

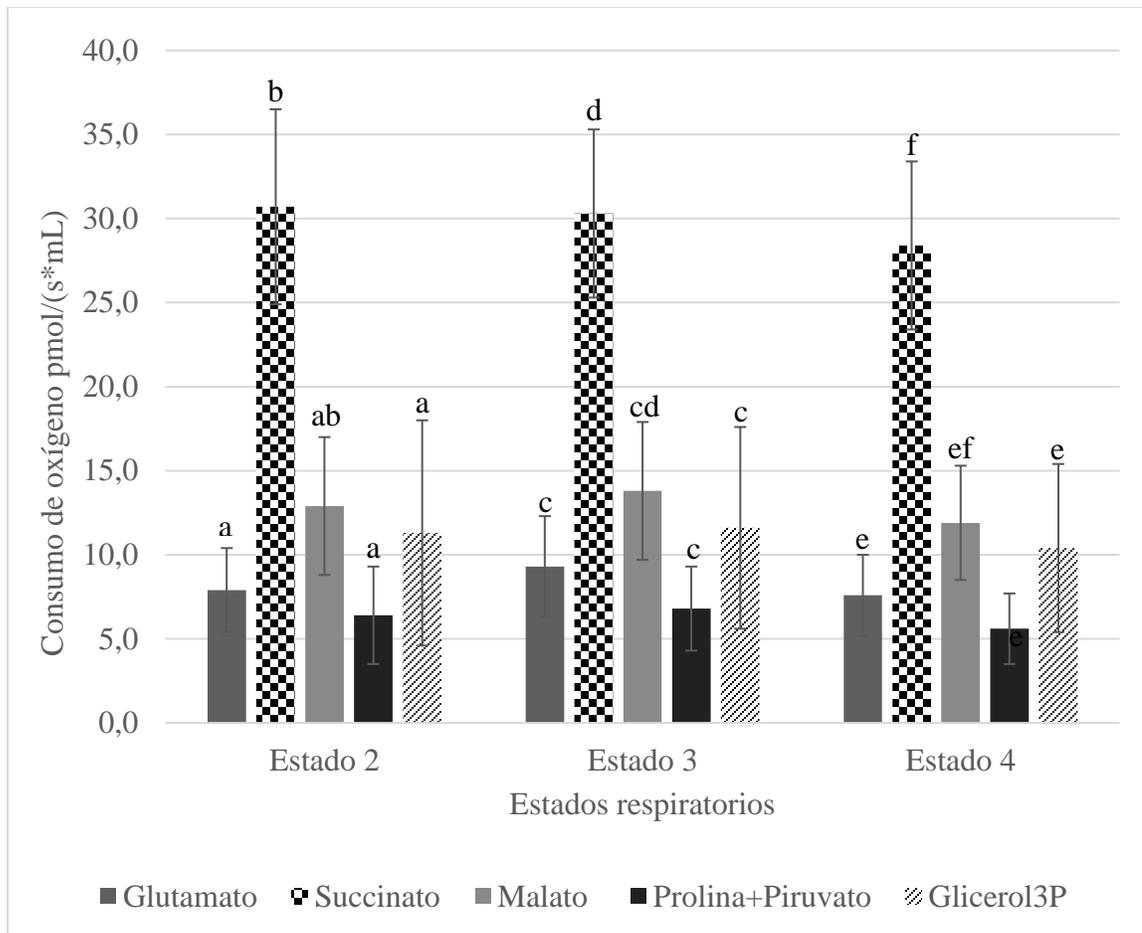
El control respiratorio se realizó sobre mitocondrias aisladas de larvas (L4) de *Ae. aegypti*, y se evaluó la adición de sustratos oxidables como; glutamato, malato, succinato, prolina+piruvato y glicerol 3-fosfato. Los resultados del consumo de oxígeno dependiente del sustrato oxidable, durante cada uno de los estados respiratorios se presentan en la Figura 10.

Los valores más altos en la velocidad de consumo de oxígeno en mitocondrias aisladas de larvas L4 se observaron al adicionar el sustrato succinato. Este comportamiento de la respiración mitocondrial se observó en todos los estados respiratorios, con valores de oxígeno consumido para el estado 2 de 30.7 ± 5.8 pmol/(s*mL), estado 3 de 30.3 ± 5.0 pmol/(s*mL) y estado 4 de 28.4 ± 5.0 pmol/(s*mL). Al comparar los valores de oxígeno de mitocondrias de larvas L4 entre sustratos oxidables para cada estado respiratorio, se encontraron diferencias estadísticas significativas entre

succinato y los sustratos glutamato, prolina+piruvato y glicerol 3-fosfato para el Estado 3 (KW test H: (4, N=72) =54.766580 p=0.0000) y el Estado 4 (KW test H: (4, N=72) =56.11636 p=0.000000).

Figura 10

*Velocidad de consumo de oxígeno (pmol/(seg*mL)) de mitocondrias aisladas de larvas L4 de Aedes aegypti para los estados respiratorios Estado 3, Estado 4.*



Nota: Se emplearon los sustratos oxidables glutamato, malato, prolina+piruvato, succinato y glicerol 3-fosfato (G3P). Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre (a,b) Sustratos oxidables para Estado 2 (KW test H: (4, N=72) =54.766580 $p \leq 0.05$). (c,d) Sustratos oxidables para Estado 3 (KW test H: (4, N=72) =56.11636 $p \leq 0.05$). (e,f) Sustratos oxidables para Estado 4 (KW test H: (4, N=72) =44.54037 $p \leq 0.05$).

El objetivo de realizar el control respiratorio sobre las mitocondrias aisladas de larvas, fue evidenciar cual sustrato promovía un transporte electrónico de forma más eficiente, el cual se aprecia por un mayor consumo de oxígeno, es decir, una tasa de reducción del aceptor electrónico final de la CTE.

La adición del glutamato, malato y la mezcla de prolina + piruvato, promovió el paso de electrones a través del complejo I. Cada una de estas moléculas ingresa a la matriz mitocondrial por acción de transportadores específicos. El glutamato, malato y piruvato, ingresan al ciclo del ácido cítrico y generan moléculas de NADH (Gnaiger, 2014). El NADH se oxida por acción del complejo I, y allí inicia el transporte electrónico hasta llegar al oxígeno que acepta este par de electrones finalmente (Gnaiger, 2014).

La adición del succinato permitió evidenciar la entrada de los electrones a la CTE por medio del complejo II. Para la medición se adicionó rotenona, un inhibidor del complejo I, así el ingreso de succinato hacia la matriz mitocondrial inicia la transferencia electrónica a través del complejo II, hasta el aceptor final de electrones el oxígeno (Cantó & Garcia-Roves, 2015).

Es evidente la diferencia de las tasas respiratorias con la adición de succinato, esto se puede justificar teniendo en cuenta que el estudio se realizó sobre larvas L4 de *Ae. aegypti*, esta corresponde a la última etapa larval antes de llegar a su estado de pupa. En organismos donde ocurre la metamorfosis, como la mosca de la fruta *Drosophila*, se ha observado que en la etapa larval el insecto almacena toda la energía necesaria para la metamorfosis y durante su etapa pupal, el individuo no se alimenta y no consume oxígeno, finalmente cuando emerge el adulto su actividad metabólica vuelve a aumentar. Esta tendencia de la actividad metabólica a lo largo del ciclo de vida describe una curva en forma de U reportada por Merkey y colaboradores. Los autores resaltan las bajas tasas de consumo de oxígeno durante la etapa pupal, y sugieren que en el último estadio larval también tenga una tendencia de baja respiración (Merkey et al., 2011).

En literatura se ha reportado una acumulación de succinato como una señal de la insuficiencia de suministro de oxígeno en la mitocondria. El succinato, es uno de los productos

intermedios del ciclo del ácido cítrico, esta molécula se oxida a fumarato por la acción del complejo II de la cadena de transporte de electrones mitocondrial (Pekny et al., 2018).

La anterior afirmación puede explicar las altas tasas de consumo de oxígeno en presencia de succinato, por lo tanto, se concluye que las larvas de *Ae. aegypti*, emplean preferencialmente el succinato como sustrato oxidable para el proceso de la respiración mitocondrial.

Adicionalmente a los controles respiratorios se midió la actividad específica de las enzimas de la CTE y se determinaron polarográficamente y por espectrofotometría. Los resultados se consignan en la tabla 4.

Tabla 5

Resultados de la actividad específica de las enzimas de la cadena transportadora de electrones mitocondrial, de larvas (L4) de Aedes aegypti.

Enzima	Valor de la actividad específica
NADH oxidasa	8,55 ±0,6 pmol de O ₂ /s*mL
NADH deshidrogenasa	1430,5±21,0 μmol de ferrocianato reducido/min*mg de proteína mitocondrial
Succinato oxidasa	7,5±0,6 pmol de O ₂ /s*mL
Succinato deshidrogenasa	66,0±2,7 μmol de DCPIP reducido/min*mg de proteína
NADH citocromo c reductasa	57,0±3,2 μmol de citocromo c reducido/min*mg de proteína mitocondrial

Succinato citocromo c reductasa	12,0±1,1 μ mol de citocromo c reducido/min*mg de proteína mitocondrial
Citocromo c oxidasa	11,5±1,1 μ mol de citocromo c reducido/min*mg de proteína mitocondrial
ATPasa	1510,9±135,8 μ mol de fosfato hidrolizado/mg de proteína mitocondrial

Las enzimas NADH oxidasa y NADH deshidrogenasa, pertenecen al complejo I de la CTE mitocondrial. La determinación de la actividad de la NADH oxidasa consistió en evaluar el paso de electrones a partir de la molécula de NADH, luego el paso de estos electrones hacia el complejo III y IV hasta llegar al aceptor final, el oxígeno molecular presente en el medio de reacción del ensayo. En la actividad de NADH deshidrogenasa se evaluó el paso de electrones hacia el centro Fe-S y de allí hacia el receptor electrónico ferrocianuro de potasio, por lo que este compuesto se reduce a ferrocianato.

Las enzimas succinato oxidasa y succinato deshidrogenasa pertenecen al complejo II de la CTE mitocondrial. De la succinato oxidasa, se determinó el paso de electrones a partir de la molécula de succinato, hacia el complejo II, luego al complejo III, IV y finalizando en el aceptor de electrones el oxígeno. Por otra parte, con la succinato deshidrogenasa se evaluó el paso de electrones desde la molécula de succinato hacia el complejo II pasando por varios centros Fe-S hacia el receptor de electrones DCPIP.

Al comparar los resultados de la actividad enzimática de la NADH oxidasa de $8,55 \pm 0,6$ pmol de $O_2/s \cdot mL$ y succinato oxidasa de $7,5 \pm 0,6$ pmol de $O_2/s \cdot mL$. Se evidencia que la NADH

oxidasa es ligeramente mayor con respecto a la succinato oxidasa. Mientras que la actividad de la NADH deshidrogenasa es notablemente mayor con respecto a la succinato deshidrogenasa.

Experimentalmente se obtuvo la actividad específica de la NADH deshidrogenasa de $1430,5 \pm 21,0$ μmol de ferrocianato reducido/min*mg de proteína mitocondrial, considerablemente mayor con respecto a la succinato deshidrogenasa de $66,0 \pm 2,7$ μmol de DCPIP reducido/min*mg de proteína.

No obstante, no es posible relacionar los resultados obtenidos de la actividad específica de la NADH deshidrogenasa, con las tasas de respiración mediadas por el complejo I, porque hay una diferencia procedimental a considerar. Por una parte, al determinar la actividad del complejo I se adicionó directamente NADH al medio de reacción que contenía las mitocondrias fragmentadas. Esta adición de NADH garantiza una transferencia electrónica directamente al complejo I. Mientras que para la evaluación de la respiración vía complejo I, se emplearon los sustratos glutamato, malato y prolina+piruvato. Estas moléculas promueven la transferencia electrónica a través del complejo I indirectamente, porque los sustratos deben participar del ciclo del ácido cítrico donde se genera el NADH y esta molécula es la que transferirá los electrones al complejo I.

La metodología para el control respiratorio no contempla la adición de NADH al medio de reacción, pues se considera que la membrana interna mitocondrial es impermeable a dicha molécula. Aunque recientemente se identificó la importación del NADH en mitocondrias de mamíferos (Dillin et al., 2018), aunque esta afirmación aún no se ha evidenciado para artrópodos.

Los resultados de las tasas de respiración mediadas por el complejo II y la actividad enzimática de la succinato oxidasa y deshidrogenasa, si resultan comparables, pues en ambos casos

se adiciona succinato, que tras su paso por el ciclo del ácido cítrico y la formación de FADH_2 , dona sus electrones al complejo II.

La determinación de la actividad de la NADH-citocromo c reductasa, permitió evaluar el paso de electrones provenientes del complejo I hasta el citocromo c, atravesando el complejo III. En este caso se monitoreó la reducción del citocromo c bloqueando el complejo IV con cianuro. Y la actividad de la succinato citocromo c reductasa, el paso de electrones del complejo II al complejo III.

La comparación de la actividad de las enzimas reductasas, resultó en una actividad considerablemente mayor para la NADH citocromo c reductasa de $57,0 \pm 3,2$ μmol de citocromo c reducido/min*mg de proteína mitocondrial, comparada con la succinato citocromo c reductasa de $12,0 \pm 1,1$ μmol de citocromo c reducido/min*mg de proteína mitocondrial, lo que estaría a favor de la tendencia observada con las oxidasas y deshidrogenasas. Si se tiene una actividad alta en la transferencia electrónica vía complejo I, se esperaría también observarla en la NADH citocromo c reductasa.

La actividad de la citocromo c oxidasa, permitió evaluar la tasa del paso de electrones desde el citocromo c hasta el complejo IV, sin importar si el paso de los electrones se dio a través del complejo I o II. En este caso se obtuvo un valor promedio de $11,5 \pm 1,1$ μmol de citocromo c reducido/min*mg de proteína mitocondrial.

Finalmente se determinó la actividad de la ATP sintasa, donde se midió la actividad de la enzima en presencia de ATP, es decir en su acción por hidrolizar y obtener ADP y Pi. Dando un valor promedio de $1510,9 \pm 135,8$ μmol de fosfato hidrolizado*mg de proteína mitocondrial.

4.4 Relación de los resultados de proteómica, respiración y actividad enzimática de la CTE mitocondrial

Para analizar la función y relación con la bioenergética mitocondrial de todas las proteínas identificadas, en este estudio se realizó una representación esquemática (Figura 11) que permite resumir los procesos en los cuales participan. Se resaltan aquellas implicadas en procesos de replicación, transcripción y traducción del ADNmt (ARNt dimetilalil transferasa, ARN helicasa, ARN polimerasa, cisteína, leucina y glutamato – ARNt ligasa). Esto podría estar asociado con el rápido crecimiento que atraviesan las larvas de mosquitos en esta etapa del ciclo de vida y su preparación para su metamorfosis que implica generación de nuevos tejidos, por lo tanto, se aumentaría la división celular, y a su vez se aumentaría la síntesis de las proteínas.

De la cadena respiratoria mitocondrial, se identificó la NAD(P)H quinona oxidoreductasa, perteneciente al complejo I, que en relación a la actividad enzimática, presentó una actividad mayor con respecto al complejo II. En literatura se ha publicado la importancia de la actividad de este complejo protéico, ya que permite el ingreso de electrones promovido mediante diferentes sustratos iniciales que participan del ciclo del ácido cítrico. Los electrones donados por el NADH, pasan por un centro Fe-S del complejo I y luego se ceden a la ubiquinona, el transportador liposoluble representado con la letra “Q” en la Figura 11. Aunque no fue posible identificarla experimentalmente, si se identificó la ubiquinona c metil transferasa, que se ubica en la matriz mitocondrial unida a la membrana interna, de forma que tiene la capacidad de participar en la síntesis de este transportador electrónico.

De todo el proceso de transporte de electrones, la CTE finaliza cediendo los electrones al oxígeno molecular. En la Figura 11 se representó la mioglobina, una proteína que se describió que interactuaba con el complejo IV, pues le permite acceder al oxígeno de forma preferencial.

Finalmente, la ATP sintasa, cuyas subunidades fue posible identificar experimentalmente, es la encargada de sintetizar el ATP, necesario para muchas otras proteínas representadas en la figura, por ejemplo, la glucoquinasa o la CTP sintasa. Estas proteínas descritas en el citosol, pero adheridas a la membrana externa mitocondrial por conveniencia en la captación del ATP. La identificación de estas proteínas citosólicas, permiten visualizar el dinamismo proteico dentro de la célula y las interacciones con la mitocondria,

Las proteínas transportadoras, que son proteínas integrales de membrana que se pudieron identificar, por ejemplo, el transportador de fosfato, el transportador de glicina y la proteína GrpE. Permiten afirmar que fue posible solubilizar estas proteínas con la primera adición de buffer. En consecuencia, se entiende la razón de no encontrar una cantidad de spots significativos en los geles que correspondían a las proteínas de membrana, pues estas ya se encontraban solubilizadas en un primer paso.

Figura 11

Resumen gráfico de las proteínas identificadas en mitocondrias de larvas L4 de Ae. aegypti.

Imagen creada con BioRender.com

ribosomal protein L16, leucina--ARNt ligasa, glutamato--ARNt ligasa, cisteína—ARNt ligasa, ARNt dimetilaliltransferasa), 2 de transcripción (ARN helicasa, ARN polimerasa AND-dirigido subunidad β), 5 modificaciones proteicas incluyendo plegamiento proteico (Proteína ligasa-ubiquitina E3, proteína quinasa C, proteína de choque térmico 70kDa 14, proteína de choque térmico 70 kDa mitocondrial y homólogo de proteína chaperona HscA), 5 de biosíntesis (adenililtransferasa, sulfato adenililtransferasa, CTP sintasa, ubiquinona c-metiltransferasa y s-ribosilhomocisteina liase), 4 de fosforilación oxidativa (NAD(P)H-quinona oxidoreductasa subunidad H, ATP syntasa subunidad b, ATP sintasa sub-unidad β , ATP sintasa cadena γ), 6 proteínas de transporte (Homologo de proteina MAEA, proteína GrpE, transportador de glicina mitocondrial, transportador de fosfato, timidina quinasa y mioglobina), 1 de señalización (peroxirredoxina), 2 implicadas en la glucólisis (Enolasa y hexoquinasa), 1 de defensa celular (α -defensina), una sub unidad de ARN ribosómico (ARN ribosomal subunidad H metiltransferasa) y 1 no caracterizada.

Las mediciones de la función de la CTE mitocondrial, permitió evidenciar una preferencia por el transporte electrónico promovido por el succinato, con el cual se obtuvo la tasa de respiración más alta en todos los estados respiratorios.

La medición de la actividad enzimática específica, presentó una mayor actividad del complejo I con respecto al complejo II. Se obtuvieron los valores para la NADH oxidasa de $8,55 \pm 0,6$ pmol de $O_2/s \cdot mL$, NADH deshidrogenasa de $1430,5 \pm 21,0$ μ mol de ferrocianato reducido/min \cdot mg de proteína mitocondrial, succinato oxidasa $7,5 \pm 0,6$ pmol de $O_2/s \cdot mL$, succinato deshidrogenasa de $66,0 \pm 2,7$ μ mol de DCPIP reducido/min \cdot mg de proteína, NADH citocromo c reductasa de $57,0 \pm 3,2$ μ mol de citocromo c reducido/min \cdot mg de proteína mitocondrial, succinato citocromo c reductasa de $12,0 \pm 1,1$ μ mol de citocromo c reducido/min \cdot mg

de proteína mitocondrial, citocromo c oxidasa de $11,5 \pm 1,1$ μmol de citocromo c reducido/min*mg de proteína mitocondrial y ATP asa en mitocondrias fragmentadas de $1510,9 \pm 135,8$ μmol de fosfato hidrolizado/mg de proteína mitocondrial.

La medición de la actividad enzimática y la identificación en el perfil de expresión proteínica de las enzimas que componen el complejo I de la CTE (NADH oxidasa, NADH deshidrogenasa y NADH citocromo c reductasa), y las subunidades de la ATP sintasa, representan un hallazgo interesante como descripción de la ruta metabólica vía complejo I en larvas de *Ae. aegypti*.

La información descrita en el presente trabajo de investigación resulta una primera aproximación para la comprensión de los mecanismos metabólicos de un organismo de importancia médica, en una de sus etapas más decisivas a nivel energético.

6. Recomendaciones

De los 70 spots solo fue posible identificar 36, es decir quedaron 34 proteínas sin identificar. Posiblemente debido a una baja eficiencia en la extracción de la proteína del gel. Se recomienda investigar un método para obtener mayor concentración de proteína y lograr el material para análisis exitoso.

Algunas de las proteínas identificadas presentaron un bajo SCORE o ninguna relación con el organismo de estudio. Se recomienda una confirmación en la identidad, mediante la determinación de la estructura primaria de estas proteínas.

Puede resultar interesante evaluar la de algunas enzimas implicadas en el ciclo del ácido cítrico en esta etapa del vector, pues los resultados mostraron una actividad enzimática alta del complejo I, pero en el control respiratorio, el uso de glutamato y malato no expresaron tasas muy altas de respiración con respecto al complejo II presentó una mayor velocidad de consumo de oxígeno. Esta información contribuiría a la comprensión del metabolismo mitocondrial en larvas de *Ae. aegypti*.

Referencias

- Aebersold, R., & Mann, M. (2003a). Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*, 422(March), 198–207.
- Aebersold, R., & Mann, M. (2003b). Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*, 422, 198–207.

- Arden, C., Baltrusch, S., & Agius, L. (2006). Glucokinase regulatory protein is associated with mitochondria in hepatocytes. *FEBS Letters*, *580*(8), 2065–2070.
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.03.009>
- Arnold, J. J., Smidansky, E. D., Moustafa, I. M., & Cameron, C. E. (2012). Human mitochondrial RNA polymerase: Structure-function, mechanism and inhibition. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, *1819*(9–10), 948–960.
<https://doi.org/10.1016/j.bbagrm.2012.04.002>
- Aw, W. C., Bajracharya, R., Towarnicki, S. G., & Ballard, J. W. O. (2016). Assessing bioenergetic functions from isolated mitochondria in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Biological Methods*, *3*(2), 42. <https://doi.org/10.14440/jbm.2016.112>
- Azzam, G., & Liu, J. L. (2013). Only One Isoform of *Drosophila melanogaster* CTP Synthase Forms the Cytoophidium. *PLoS Genetics*, *9*(2).
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003256>
- Backes, S., & Herrmann, J. M. (2017). Protein translocation into the intermembrane space and matrix of mitochondria: Mechanisms and driving forces. *Frontiers in Molecular Biosciences*, *4*(DEC), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2017.00083>
- Basu Ball, W., Neff, J. K., & Gohil, V. M. (2018). The role of nonbilayer phospholipids in mitochondrial structure and function. *FEBS Letters*, *592*(8), 1273–1290.
<https://doi.org/10.1002/1873-3468.12887>
- Behura, S., Lobo, N., Haas, B., DeBruyn, B., Lovin, D., Shumway, M., Puiu, D., Romero, J., Nene, V., & Severson, D. W. (2011). Complete Sequences of Mitochondria Genomes of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* and Comparative Analysis of Mitochondrial

DNA Fragments Inserted in the Nuclear Genomes. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 10 (2)(1), 116–125. <https://doi.org/10.1038/nrm2621>

Berger, F., Lau, C., Dahlmann, M., & Ziegler, M. (2005). Subcellular compartmentation and differential catalytic properties of the three human nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase isoforms. *Journal of Biological Chemistry*, 280(43), 36334–36341. <https://doi.org/10.1074/jbc.M508660200>

Borrero Landazabal, M. A., Carreño Otero, A. L., Kouznetsov, V. V., Duque Luna, J. E., & Mendez-Sanchez, S. C. (2017). Alterations of mitochondrial electron transport chain and oxidative stress induced by alkaloid-like α -aminonitriles on *Aedes aegypti* larvae. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 144(November), 64–70. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2017.11.006>

Borrero Landazabal, M. A., Carreño Otero, A. L., Kouznetsov, V. V., Duque Luna, J. E., & Mendez-Sanchez, S. C. (2018). Alterations of mitochondrial electron transport chain and oxidative stress induced by alkaloid-like α -aminonitriles on *Aedes aegypti* larvae. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 144, 19–26. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2017.11.006>

Böttinger, L., Oeljeklaus, S., Guiard, B., Rospert, S., Warscheid, B., & Becker, T. (2015). Mitochondrial heat shock protein (Hsp) 70 and Hsp10 cooperate in the formation of Hsp60 complexes. *Journal of Biological Chemistry*, 290(18), 11611–11622. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.642017>

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

- Brandina, I., Graham, J., Lemaitre-Guillier, C., Entelis, N., Krasheninnikov, I., Sweetlove, L., Tarassov, I., & Martin, R. P. (2006). Enolase takes part in a macromolecular complex associated to mitochondria in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1757(9–10), 1217–1228. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2006.07.001>
- Burt, A. (2003). Site-specific selfish genes as tools for the control and genetic engineering of natural populations. *The Royal Society*, 270(October 2002), 921–928. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2319>
- Cancino-Rodezno, A., Lozano, L., Oppert, C., Castro, J. I., Lanz-Mendoza, H., Encarnación, S., Evans, A. E., Gill, S. S., Soberón, M., Jurat-Fuentes, J. L., & Bravo, A. (2012). Comparative proteomic analysis of *Aedes aegypti* larval midgut after intoxication with Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis*. *PLoS ONE*, 7(5), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037034>
- Cantó, C., & Garcia-Roves, P. M. (2015). High-Resolution Respirometry for Mitochondrial Characterization of Ex Vivo Mouse Tissues. *Current Protocols in Mouse Biology*, 5(2), 135–153. <https://doi.org/10.1002/9780470942390.mo140061>
- Cao, Z., Lindsay, J. G., & Isaacs, N. W. (2007). *Mitochondrial Peroxiredoxins BT - Peroxiredoxin Systems: Structures and Functions* (L. Flohé & J. R. Harris (eds.); pp. 295–315). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6051-9_14
- Castillo-Morales, R. M., Carreño, A. L., Mendez-sanchez, S. C., Navarro Da Silva, M. A., Stashenko, E. E., & Duque, J. E. (2019). Mitochondrial affectation , DNA damage and AChE inhibition induced by *Salvia officinalis* essential oil on *Aedes aegypti* larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 221(December 2018), 29–37.

<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2019.03.006>

Clark, T. M., Koch, A., & Moffett, D. F. (1999). The anterior and posterior “stomach” regions of larval *Aedes aegypti* midgut: Regional specialization of ion transport and stimulation by 5-hydroxytryptamine. *Journal of Experimental Biology*, 202(3), 247–252.

<https://doi.org/10.1242/jeb.202.3.247>

Clemons, A., Haugen, M., Flannery, E., Tomchaney, M., Kast, K., Le, C., Mori, A., Holland, W. S., Sarro, J., Severson, D. W., Duman-scheel, M., Clemons, A., Haugen, M., Flannery, E., Tomchaney, M., Kast, K., Jacowski, C., Le, C., Mori, A., ... Duman-scheel, M. (2013). *Aedes aegypti* : An Emerging Model for Vector Mosquito Development. *Cold Spring Harbor Protocols*, 1–9. <https://doi.org/10.1101/pdb.emo141>

Corena, M. D. P., Fiedler, M. M., VanEkeris, L., Tu, C., Silverman, D. N., & Linser, P. J. (2004). Alkalization of larval mosquito midgut and the role of carbonic anhydrase in different species of mosquitoes. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 137(3), 207–225. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2003.12.004>

Correa Soares, J. B. R., Gaviraghi, A., & Oliveira, M. F. (2015). Mitochondrial physiology in the major arbovirus vector *Aedes aegypti*: Substrate preferences and sexual differences define respiratory capacity and superoxide production. *PLoS ONE*, 10(3), 1–35.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120600>

Cox, A. G., Winterbourn, C. C., & Hampton, M. B. (2010). Mitochondrial peroxiredoxin involvement in antioxidant defence and redox signalling. *Biochemical Journal*, 425(2), 313–325. <https://doi.org/10.1042/BJ20091541>

Cravatt, B. F., Simon, G. M., & Iii, J. R. Y. (2007). The biological impact of mass-spectrometry-

based proteomics. *Nature*, 450(December), 991–1000. <https://doi.org/10.1038/nature06525>

Cui, Y., Liu, P., Mooney, B. P., & Franz, A. W. E. (2020). Quantitative Proteomic Analysis of Chikungunya Virus-Infected *Aedes aegypti* Reveals Proteome Modulations Indicative of Persistent Infection. *Journal of Proteome Research*, 19(6), 2443–2456. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.0c00173>

Devine, G. J., Eza, D., Ogusuku, E., & Furlong, M. J. (2008). INSECTICIDE USE : CONTEXT AND ECOLOGICAL CONSEQUENCES. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 25(1), 74–100.

Dhawan, R., Kumar, M., Kumar, A., Dey, G., Advani, J., Prasad, K., & Kumar, A. (2017). Mosquito-Borne Diseases and Omics : Salivary Gland Proteome of the Female *Aedes aegypti* Mosquito. *OMICS A Journal of Integrative Biology*, 21(1), 45–54. <https://doi.org/10.1089/omi.2016.0160>

Didiasova, M., Schaefer, L., & Wygrecka, M. (2019). When place matters: Shuttling of enolase-1 across cellular compartments. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 7(APR), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00061>

Dillin, A., Davila, A., Liu, L., Chellappa, K., Redpath, P., Nakamaru-Ogiso, E., Paoletta, L. M., Zhang, Z., Migaud, M. E., Rabinowitz, J. D., & Baur, J. A. (2018). Nicotinamide adenine dinucleotide is transported into mammalian mitochondria. *ELife*, 7, 1–22. <https://elifesciences.org/articles/33246><https://doi.org/10.7554/eLife.33246.001>

Djafarzadeh, S., & Jakob, S. M. (2017). High-resolution respirometry to assess mitochondrial function in permeabilized and intact cells. *Journal of Visualized Experiments*, 2017(120), 1–11. <https://doi.org/10.3791/54985>

- Duquesne, K., & Sturgis, J. (2010). Membrane protein solubilization. In I. Mus-Vetau (Ed.), *Heterologous expression of membrane proteins* (pp. 205–218). Springer protocols.
- Dutt, M. J., & Lee, K. H. (2000). Proteomic analysis. *Current Opinion in Biotechnology*, *11*, 176–179.
- Egelhofer, V., Gobom, J., Seitz, H., Giavalisco, P., Lehrach, H., & Nordhoff, E. (2002). Protein identification by MALDI-TOF-MS peptide mapping: A new strategy. *Analytical Chemistry*, *74*(8), 1760–1771. <https://doi.org/10.1021/ac011204g>
- Entelis, N., Brandina, I., Kamenski, P., Krashennnikov, I. A., Martin, R. P., & Tarassov, I. (2006). A glycolytic enzyme, enolase, is recruited as a cofactor of tRNA targeting toward mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes and Development*, *20*(12), 1609–1620. <https://doi.org/10.1101/gad.385706>
- Eriksson, S., Munch-petersen, B., Johansson, K., & Eklund, H. (2002). *Cellular and Molecular Life Sciences Structure and function of cellular deoxyribonucleoside kinases*. *59*, 1327–1346.
- Fillingame, R. H., Angevine, C. M., & Dmitriev, O. Y. (2002). Coupling proton movements to ring rotation in F1FoATP synthase: aqueous access channels and helix rotations at the interface. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1555*, 29–36.
- Francklyn, C., Perona, J. J., Puetz, J., & Hou, Y. M. (2002). Aminoacyl-tRNA synthetases: Versatile players in the changing theater of translation. *Rna*, *8*(11), 1363–1372. <https://doi.org/10.1017/S1355838202021180>
- Friedman, J. R., & Nunnari, J. (2014). Mitochondrial form and function. *Nature*, *505*(7483),

335–343. <https://doi.org/10.1038/nature12985>

Gajewski, J. P., Arnold, J. J., Salminen, T. S., Kaguni, L. S., & Cameron, C. E. (2016).

Expression and purification of mitochondrial RNA polymerase and transcription factor a from *Drosophila melanogaster*. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1351, pp. 199–210). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3040-1_15

Gao, S., Li, H., Cai, Y., Ye, J. T., Liu, Z. P., Lu, J., Huang, X. Y., Feng, X. J., Gao, H., Chen, S.

R., Li, M., & Liu, P. Q. (2014). Mitochondrial binding of α -enolase stabilizes mitochondrial membrane: Its role in doxorubicin-induced cardiomyocyte apoptosis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 542, 46–55. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2013.12.008>

García-rejon, J., Loroño-pino, M. A., Farfan-ale, J. A., Flores-flores, L., Rosado-paredes, E. D.

P., Rivero-cardenas, N., Najera-vazquez, R., Gomez-carro, S., Lira-zumbardo, V., Gonzalez-martinez, P., Lozano-fuentes, S., Elizondo-quirola, D., Beaty, B. J., & Eisen, L. (2008). Dengue Virus – Infected *Aedes aegypti* in the Home Environment. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 79(6), 940–950. <https://doi.org/79/6/940> [pii]

Gaviraghi, A., & Oliveira, M. F. (2019). A method for assessing mitochondrial physiology using

mechanically permeabilized flight muscle of *Aedes aegypti* mosquitoes. *Analytical Biochemistry*, 576(April), 33–41. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2019.04.005>

Giegé, P., Heazlewood, J. L., Roessner-Tunali, U., Harvey Millar, A., Fernie, A. R., Leaver, C.

J., & Sweetlove, L. J. (2003). Enzymes of glycolysis are functionally associated with the mitochondrion in *Arabidopsis* cells. *Plant Cell*, 15(9), 2140–2151. <https://doi.org/10.1105/tpc.012500>

Gill, S. S., Chu, P. B., Smethurst, P., Pietrantonio, P. V., & Ross, L. S. (1998). Isolation of the V-

ATPase A and c subunit cDNAs from mosquito midgut and Malpighian tubules. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 37(1), 80–90. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-6327\(1998\)37:1<80::AID-ARCH10>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-6327(1998)37:1<80::AID-ARCH10>3.0.CO;2-6)

Glick, D., & Singer, T. (2006). Determination of the Activity of Succinate, NADH, Choline, and α -Glycerophosphate Dehydrogenases. In *Methods Biochem. Anal.* (Vol. 22, pp. 123–175). <https://doi.org/10.1002/9780470110423.ch3>

Gnaiger, E. (2014). Respiratory states: coupling control. In *Mitochondrial Pathways and Respiratory Control An Introduction to OXPHOS* (4th ed., pp. 19–31). OROBOROS MiPNet Publications.

Gonçalves, R., Machado, A., Paiva-Silva, G., Sorgine, M., Momoli, M., Oliveira, J., Vannier-Santos, M., Galina, A., Oliveira, P., & Oliveira, M. (2009). Blood-feeding induces reversible functional changes in flight muscle mitochondria of aedes aegypti mosquito. *PLoS ONE*, 4(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007854>

González-Calvar, S., & Corini, H. (2004). *CONTROL RESPIRATORIO* (pp. 1–12).

Departamento de Bioquímica Humana. Facultad de Medicina-Universidad de Buenos Aires.

Goto, M., Omi, R., Nakagawa, N., Miyahara, I., & Hirotsu, K. (2004). Crystal Structures of CTP Synthetase Reveal ATP, UTP, and Glutamine Binding Sites. *Structure*, 12(8), 1413–1423. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.str.2004.05.013>

Hayashi, K., Morooka, N., Yamamoto, Y., Fujita, K., Isono, K., Choi, S., Ohtsubo, E., Baba, T., Wanner, B. L., Mori, H., & Horiuchi, T. (2006). Highly accurate genome sequences of Escherichia coli K-12 strains MG1655 and W3110. *Molecular Systems Biology*, 2, 2006.0007. <https://doi.org/10.1038/msb4100049>

- Hemingway, J., Hawkes, N. J., Mccarroll, L., & Ranson, H. (2004). The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *34*, 653–665. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2004.03.018>
- Henein, S., Adams, C., Bonaparte, M., Moser, J. M., Munteanu, A., Baric, R., & De Silva, A. M. (2021). Dengue vaccine breakthrough infections reveal properties of neutralizing antibodies linked to protection. *Journal of Clinical Investigation*, *131*(13). <https://doi.org/10.1172/JCI147066>
- Herrmann, J. M., Stuart, R. A., Craig, E. A., & Neupert, W. (1994). Mitochondrial heat shock protein 70, a molecular chaperone for proteins encoded by mitochondrial DNA. *Journal of Cell Biology*, *127*(4), 893–902. <https://doi.org/10.1083/jcb.127.4.893>
- Huttlin, E. L., Jedrychowski, M. P., Elias, J. E., Goswami, T., Rad, R., Beausoleil, S. A., Villén, J., Haas, W., Sowa, M. E., & Gygi, S. P. (2010). A tissue-specific atlas of mouse protein phosphorylation and expression. *Cell*, *143*(7), 1174–1189. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.12.001>
- Iturbe-ormaeche, I., Walker, T., & Neill, S. L. O. (2011). Wolbachia and the biological control of mosquito-borne disease. *EMBO Reports*, *12*(6), 508–518. <https://doi.org/10.1038/embor.2011.84>
- Jacobs, H. T., George, J., & Kempainen, E. (2020). Regulation of growth in *Drosophila melanogaster*: The roles of mitochondrial metabolism. *Journal of Biochemistry*, *167*(3), 267–277. <https://doi.org/10.1093/jb/mvaa002>
- Khalique, A., Mattijssen, S., Haddad, A. F., Chaudhry, S., & Maraia, R. J. (2020). Targeting mitochondrial and cytosolic substrates of TRIT1 isopentenyltransferase: Specificity

determinants and tRNA-i6A37 profiles. In *PLoS Genetics* (Vol. 16, Issue 4).

<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008330>

Khidr, L., Wu, G., Davila, A., Procaccio, V., Wallace, D., & Lee, W. (2008). *Role of SUV3 Helicase in Maintaining Mitochondrial Homeostasis in Human Cells* *. 283(40), 27064–27073. <https://doi.org/10.1074/jbc.M802991200>

Kraemer, M. U. G., Reiner, R. C., Brady, O. J., Messina, J. P., Gilbert, M., Pigott, D. M., Yi, D., Johnson, K., Earl, L., Marczak, L. B., Shirude, S., Davis Weaver, N., Bisanzio, D., Perkins, T. A., Lai, S., Lu, X., Jones, P., Coelho, G. E., Carvalho, R. G., ... Golding, N. (2019). Past and future spread of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Nature Microbiology*, 4(5), 854–863. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0376-y>

Krejsa, C. M., Franklin, C. C., White, C. C., Ledbetter, J. A., Schieven, G. L., & Kavanagh, T. J. (2010). Rapid activation of glutamate cysteine ligase following oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*, 285(21), 16116–16124. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.116210>

Kulawiak, B., Höpker, J., Gebert, M., Guiard, B., Wiedemann, N., & Gebert, N. (2013). The mitochondrial protein import machinery has multiple connections to the respiratory chain. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1827(5), 612–626. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.12.004>

Lacey, L. A. (2007). BACILLUS THURINGIENSIS SEROVARIETY ISRAELENSIS AND BACILLUS SPHAERICUS FOR MOSQUITO CONTROL. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 23, 133–163.

Lehner, I., Niehof, M., & Borlak, J. (2003). An optimized method for the isolation and identification of membrane proteins. *Electrophoresis*, 24(11), 1795–1808.

<https://doi.org/10.1002/elps.200305387>

- Linser, P. J., Smith, K. E., Seron, T. J., & Neira Oviedo, M. (2009). Carbonic anhydrases and anion transport in mosquito midgut pH regulation. *The Journal of Experimental Biology*, *212*(Pt 11), 1662–1671. <https://doi.org/10.1242/jeb.028084>
- Lopez Sanchez, M. I. G., Cipullo, M., Gopalakrishna, S., Khawaja, A., & Rorbach, J. (2020). Methylation of Ribosomal RNA: A Mitochondrial Perspective. *Frontiers in Genetics*, *11*(July). <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00761>
- Lunetti, P., Damiano, F., De Benedetto, G., Siculella, L., Pennetta, A., Muto, L., Paradies, E., Marobbio, C. M. T., Dolce, V., & Capobianco, L. (2016). Characterization of human and yeast mitochondrial glycine carriers with implications for heme biosynthesis and anemia. *Journal of Biological Chemistry*, *291*(38), 19746–19759. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.736876>
- Magni, G., Amici, A., Emanuelli, M., Orsomando, G., Raffaelli, N., & Ruggieri, S. (2005). Structure and Function of Nicotinamide Mononucleotide Adenylyltransferase. *Current Medicinal Chemistry*, *11*(7), 873–885. <https://doi.org/10.2174/0929867043455666>
- Mailloux, R. J. (2018). Mitochondrial antioxidants and the maintenance of cellular hydrogen peroxide levels. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2018*(1). <https://doi.org/10.1155/2018/7857251>
- Majumder, P. K., Mishra, N. C., Sun, X., Bharti, A., Kharbanda, S., Saxena, S., & Kufe, D. (2001). Targeting of protein kinase C δ to mitochondria in the oxidative stress response. *Cell Growth and Differentiation*, *12*(9), 465–470.

- Marinotti, O., Ngo, T., Kojin, B. B., Chou, S.-P., Nguyen, B., Juhn, J., Carballar-Lejarazú, R., Marinotti, P. N., Jiang, X., Walter, M. F., Tu, Z., Gershon, P. D., & James, A. A. (2014). Integrated proteomic and transcriptomic analysis of the *Aedes aegypti* eggshell. *BMC Developmental Biology*, *14*(1), 15. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-14-15>
- Marreiros, B. C., Calisto, F., Castro, P. J., Duarte, A. M., Sena, F. V., Silva, A. F., Sousa, F. M., Teixeira, M., Refojo, P. N., & Pereira, M. M. (2016). Exploring membrane respiratory chains. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, *1857*(8), 1039–1067. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2016.03.028>
- Matthews, B. J., Dudchenko, O., Kingan, S. B., Koren, S., Antoshechkin, I., Crawford, J. E., Glassford, W. J., Herre, M., Redmond, S. N., Rose, N. H., Weedall, G. D., Wu, Y., Batra, S. S., Brito-Sierra, C. A., Buckingham, S. D., Campbell, C. L., Chan, S., Cox, E., Evans, B. R., ... Vosshall, L. B. (2018). Improved reference genome of *Aedes aegypti* informs arbovirus vector control. *Nature*, *563*(7732), 501–507. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0692-z>
- Mayr, J. A., Merkel, O., Kohlwein, S. D., Gebhardt, B. R., Böhles, H., Fötschl, U., Koch, J., Jaksch, M., Lochmüller, H., Horváth, R., Freisinger, P., & Sperl, W. (2007). Mitochondrial phosphate-carrier deficiency: A novel disorder of oxidative phosphorylation. *American Journal of Human Genetics*, *80*(3), 478–484. <https://doi.org/10.1086/511788>
- McGraw, E. a., & O'Neill, S. L. (2013). Beyond insecticides: new thinking on an ancient problem. *Nature Reviews. Microbiology*, *11*(3), 181–193. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2968>
- Merkey, A. B., Wong, C. K., Hoshizaki, D. K., & Gibbs, A. G. (2011). Energetics of metamorphosis in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology*, *57*(10), 1437–

1445. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2011.07.013>

Morais, K., Magalhães-júnior, M. J. De, Baracat-pereira, M. C., & Ferreira, G. (2016). Proteomic analysis of *Aedes aegypti* midgut during post-embryonic development and of the female mosquitoes fed different diets. *Parasitology International*, 65(6), 668–676. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2016.08.008>

Morlais, I., & Severson, D. W. (2009). Complete Mitochondrial DNA Sequence and Amino Acid Analysis of the Cytochrome C Oxidase Subunit I (COI) from *Aedes aegypti* Complete Mitochondrial DNA Sequence and Amino Acid Analysis of the Cytochrome C Oxidase Subunit I (COI) from *Aedes aegypti*. *DNA Sequence*, 5179, 123–127. <https://doi.org/10.1080/10425170290030051>

Morrison, A. C., Zielinski-gutierrez, E., Scott, T. W., & Rosenberg, R. (2008). Defining Challenges and Proposing Solutions for Control of the Virus Vector *Aedes aegypti*. *PLoS Medicine*, 5(3), 362–366. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0050068>

Murray, N. E. A., Quam, M. B., & Wilder-Smith, A. (2013). Epidemiology of dengue: Past, present and future prospects. *Clinical Epidemiology*, 5(1), 299–309. <https://doi.org/10.2147/CLEP.S34440>

Nene, V., Wortman, J. R., Lawson, D., Haas, B., Kodira, C., Tu, Z., Loftus, B., Xi, Z., Megy, K., Grabherr, M., Ren, Q., Zdobnov, E. M., Lobo, N. F., Campbell, K. S., Brown, S. E., Bonaldo, M. F., Zhu, J., Sinkins, S. P., Hogenkamp, D. G., ... Severson, D. W. (2007). Genome Sequence of *Aedes aegypti*, a Major Arbovirus Vector. *Science*, 316(5832), 1718–1723. <https://doi.org/10.1126/science.1138878>

Pancholi, V. (2001). Multifunctional α -enolase: Its role in diseases. *Cellular and Molecular Life*

Sciences, 58(7), 902–920. <https://doi.org/10.1007/PL00000910>

- Parvy, J., Yu, Y., Dostalova, A., Kondo, S., Kurjan, A., Bulet, P., & Lemai, B. (2019). *The antimicrobial peptide defensin cooperates with tumour necrosis factor to drive tumour cell death in Drosophila*. 1–26.
- Patterson, J., Sammon, M., & Garg, M. (2016). Dengue, Zika and Chikungunya: Emerging Arboviruses in the New World. *Western Journal of Emergency Medicine*, XVII(March), 671–679. <https://doi.org/10.5811/westjem.2016.9.30904>
- Pekny, J. E., Smith, P. B., & Marden, J. H. (2018). Enzyme polymorphism, oxygen and injury: A lipidomic analysis of flight-induced oxidative damage in a succinate dehydrogenase d (Sdhd)-polymorphic insect. *Journal of Experimental Biology*, 221(6). <https://doi.org/10.1242/jeb.171009>
- Pelley, J. W. (2012). Glycolysis and Pyruvate Oxidation. *Elsevier's Integrated Review Biochemistry*, 49–55. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-07446-9.00006-4>
- Peng, J., Ren, K.-D., Yang, J., & Luo, X.-J. (2016). Mitochondrial E3 ubiquitin ligase 1: A key enzyme in regulation of mitochondrial dynamics and functions. *Mitochondrion*, 28, 49–53. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2016.03.007>
- Pey, A. L., Megarity, C. F., & Timson, D. J. (2019). NAD(P)H quinone oxidoreductase (NQO1): An enzyme which needs just enough mobility, in just the right places. *Bioscience Reports*, 39(1), 1–9. <https://doi.org/10.1042/BSR20180459>
- Picard, M., McEwen, B. S., Epel, E. S., & Sandi, C. (2018). An energetic view of stress: Focus on mitochondria. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 49(December 2017), 72–85.

<https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2018.01.001>

Picard, M., Taivassalo, T., Gouspillou, G., & Hepple, R. T. (2011). Mitochondria: isolation, structure and function. *The Journal of Physiology*, 589(18), 4413–4421.

<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.212712>

Popova-Butler, A., & Dean, D. H. (2009). Proteomic analysis of the mosquito *Aedes aegypti* midgut brush border membrane vesicles. *Journal of Insect Physiology*, 55(3), 264–272.

<https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2008.12.008>

Puglisi, R., & Pastore, A. (2018). The role of chaperones in iron–sulfur cluster biogenesis. *FEBS Letters*, 592(24), 4011–4019. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13245>

Rabilloud, T., & Lelong, C. (2011). Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics : A tutorial ☆. *Journal of Proteomics*, 74(10), 1829–1841.

<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.05.040>

Ramasamy, R., Thiruchenthooran, V., Jayadas, T. T. P., Eswaramohan, T., Santhirasegaram, S., Sivabalakrishnan, K., Naguleswaran, A., Uzest, M., Cayrol, B., Voisin, S. N., Bulet, P., & Surendran, S. N. (2021). Transcriptomic, proteomic and ultrastructural studies on salinity-tolerant *Aedes aegypti* in the context of rising sea levels and arboviral disease epidemiology. *BMC Genomics*, 22(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12864-021-07564-8>

Rampazzo, C., Fabris, S., Franzolin, E., Crovatto, K., Frangini, M., & Bianchi, V. (2007). Mitochondrial Thymidine Kinase and the Enzymatic Network Regulating Thymidine Triphosphate Pools in Cultured Human Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 282(48), 34758–34769. <https://doi.org/10.1074/jbc.M705923200>

- Resing, K. A., & Ahn, N. G. (2005). Proteomics strategies for protein identification. *FEBS Letters*, 579(4 SPEC. ISS.), 885–889. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.12.001>
- Ribeiro-Filho, H. V., Coimbra, L. D., Cassago, A., Rocha, R. P. F., Guerra, J. V. da S., de Felicio, R., Carnieli, C. M., Leme, L., Padilha, A. C., Paes Leme, A. F., Trivella, D. B. B., Portugal, R. V., Lopes-de-Oliveira, P. S., & Marques, R. E. (2021). Cryo-EM structure of the mature and infective Mayaro virus at 4.4 Å resolution reveals features of arthritogenic alphaviruses. *Nature Communications*, 12(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23400-9>
- Rivera-Pérez, C., Clifton, M. E., & Noriega, F. G. (2017). How micronutrients influence the physiology of mosquitoes. *Current Opinion in Insect Science*, 23, 112–117. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2017.07.002>
- Roberts, D. J., & Miyamoto, S. (2015). Hexokinase II integrates energy metabolism and cellular protection: Akting on mitochondria and TORCing to autophagy. *Cell Death and Differentiation*, 22(2), 248–257. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.173>
- Ross, D., & Siegel, D. (2017). Functions of NQO1 in cellular protection and CoQ10 metabolism and its potential role as a redox sensitive molecular switch. *Frontiers in Physiology*, 8(AUG), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00595>
- Rotte, C., & Leustek, T. (2000). Differential subcellular localization and expression of ATP sulfurylase and 5'-adenylylsulfate reductase during ontogenesis of Arabidopsis leaves indicates that cytosolic and plastid forms of ATP sulfurylase may have specialized functions. *Plant Physiology*, 124(2), 715–724. <https://doi.org/10.1104/pp.124.2.715>
- Russell, R. C., Webb, C. E., Williams, C. R., & Ritchie, S. A. (2005). Mark-release-recapture

study to measure dispersal of the mosquito *Aedes aegypti* in Cairns, Queensland, Australia.

Medical and Veterinary Entomology, 19(4), 451–457. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2005.00589.x>

Santoni, V., Kieffer, S., Desclaux, D., Masson, F., & Rabilloud, T. (2000). Membrane proteomics: Use of additive main effects with multiplicative interaction model to classify plasma membrane proteins according to their solubility and electrophoretic properties.

Electrophoresis, 21(16), 3329–3344. [https://doi.org/10.1002/1522-2683\(20001001\)21:16<3329::AID-ELPS3329>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/1522-2683(20001001)21:16<3329::AID-ELPS3329>3.0.CO;2-F)

Shi, Y., Xiang, R., Horváth, C., & Wilkins, J. A. (2004). The role of liquid chromatography in proteomics. *Journal of Chromatography A*, 1053(1-2 SPEC. ISS.), 27–36.

<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.07.044>

Shieh, B.-H., Parker, L., & Popescu, D. (2002). Protein kinase C (PKC) isoforms in *Drosophila*.

Journal of Biochemistry, 132(4), 523–527.

<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a003252>

Sidoli, S., Kulej, K., & Garcia, B. A. (2016). Why proteomics is not the new genomics and the future of mass spectrometry in cell biology. *The Journal of Cell Biology*, 216(1), 21–24.

Stein, L. R., & Imai, S. I. (2012). The dynamic regulation of NAD metabolism in mitochondria.

Trends in Endocrinology and Metabolism, 23(9), 420–428.

<https://doi.org/10.1016/j.tem.2012.06.005>

Sun, Z., & Liu, J. L. (2019). Forming cytopodia prolongs the half-life of CTP synthase. *Cell*

Discovery, 5(1). <https://doi.org/10.1038/s41421-019-0098-6>

- Sylvester, J. E., Fischel-Ghodsian, N., Mougey, E. B., & O'Brien, T. W. (2004). Mitochondrial ribosomal proteins: Candidate genes for mitochondrial disease. *Genetics in Medicine*, 6(2), 73–80. <https://doi.org/10.1097/01.GIM.0000117333.21213.17>
- Twyman, R. M. (2012). *The Nature of Proteomic Data*. 642–649. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-373932-2.00047-8>
- Vasconcellos, A. F., Vasconcellos, A. F., Mandacaru, S. C., De Oliveira, A. S., Fontes, W., Melo, R. M., De Sousa, M. V., Resende, R. O., & Charneau, S. (2020). Dynamic proteomic analysis of *Aedes aegypti* Aag-2 cells infected with Mayaro virus. *Parasites and Vectors*, 13(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04167-2>
- Westermann, B., Prip-Buus, C., Neupert, W., & Schwarz, E. (1995). The role of the GrpE homologue, Mge1p, in mediating protein import and protein folding in mitochondria. *EMBO Journal*, 14(14), 3452–3460. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb07351.x>
- White, M. R., & Garcin, E. D. (2017). *D-Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Structure and Function BT - Macromolecular Protein Complexes: Structure and Function* (J. R. Harris & J. Marles-Wright (eds.); pp. 413–453). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-46503-6_15
- Xu, T., Pagadala, V., & Mueller, D. M. (2015). Understanding structure, function, and mutations in the mitochondrial ATP synthase. *Microbial Cell*, 2(4), 105–125. <https://doi.org/10.15698/mic2015.04.197>
- Yamada, T., Furuichi, Y., Takakura, H., Hashimoto, T., Hanai, Y., Jue, T., & Masuda, K. (2013). Interaction between myoglobin and mitochondria in rat skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*, 114(4), 490–497. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00789.2012>

Zancani, M., Braidot, E., Filippi, A., & Lippe, G. (2020). Structural and functional properties of plant mitochondrial F-ATP synthase. *Mitochondrion*, 53(May), 178–193.

<https://doi.org/10.1016/j.mito.2020.06.001>

Zhao, L., Pridgeon, J. W., Becnel, J. J., Clark, G. G., & Linthicum, K. J. (2009). Mitochondrial gene cytochrome b developmental and environmental expression in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 46(6), 1361–1369.

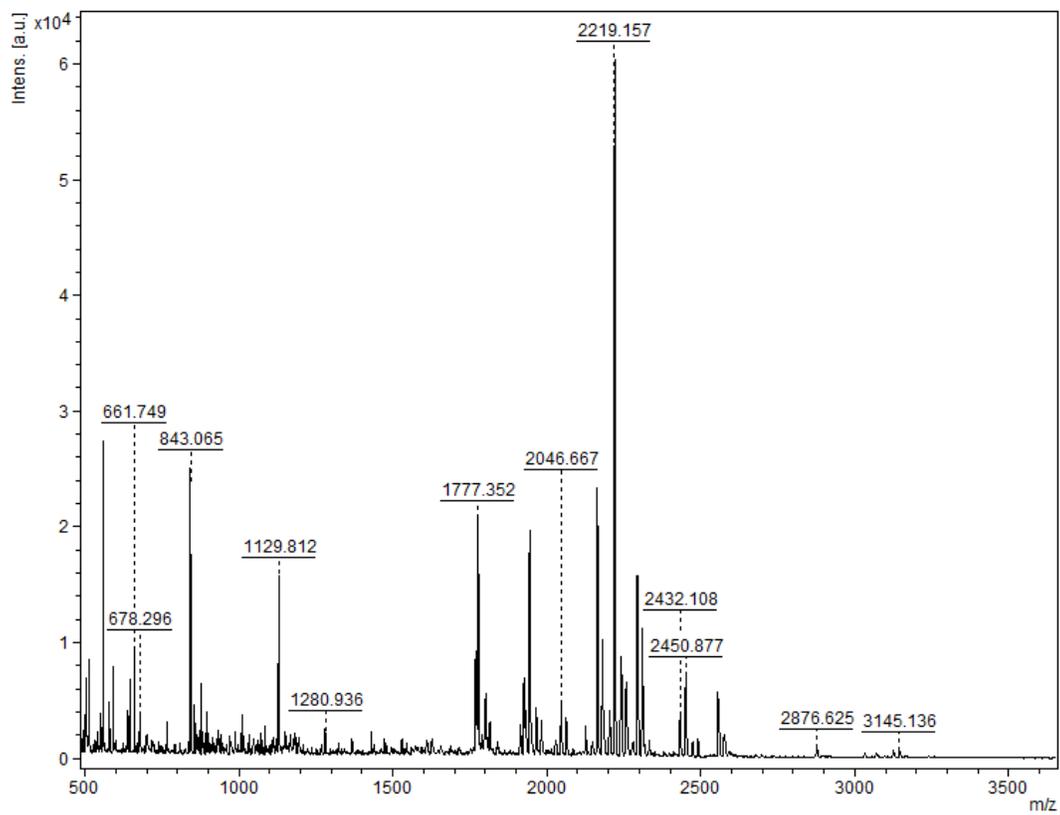
<https://doi.org/10.1603/033.046.0615>

Apendices

Espectros de masas de la huella peptídica de las proteínas analizadas.

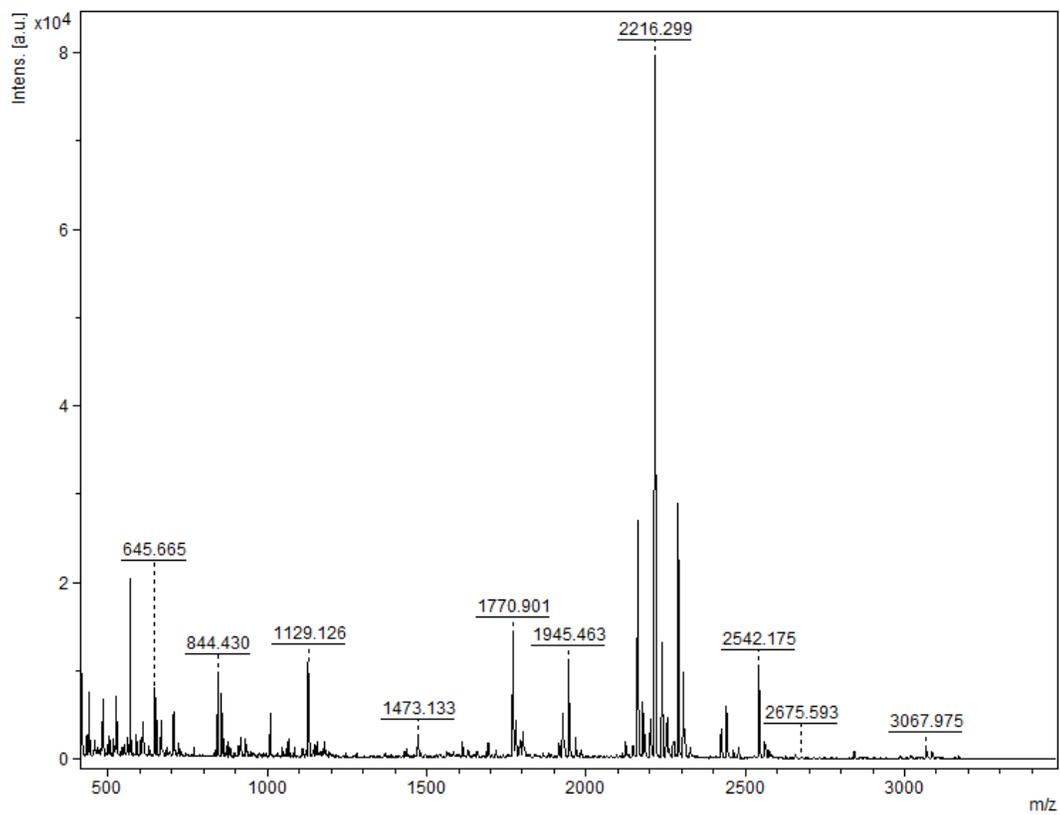
Apéndice 1

Espectro de masas correspondiente a la proteína del spot 1



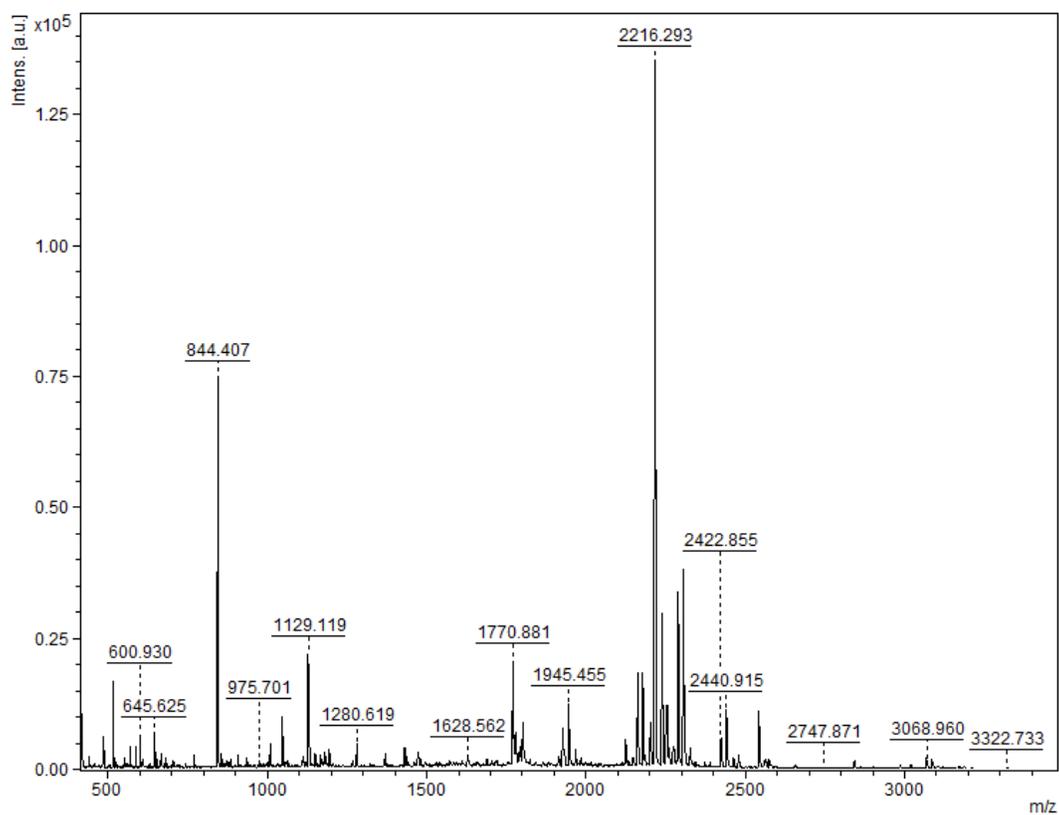
Apéndice 2

Espectro de masas correspondiente a la proteína del spot 2



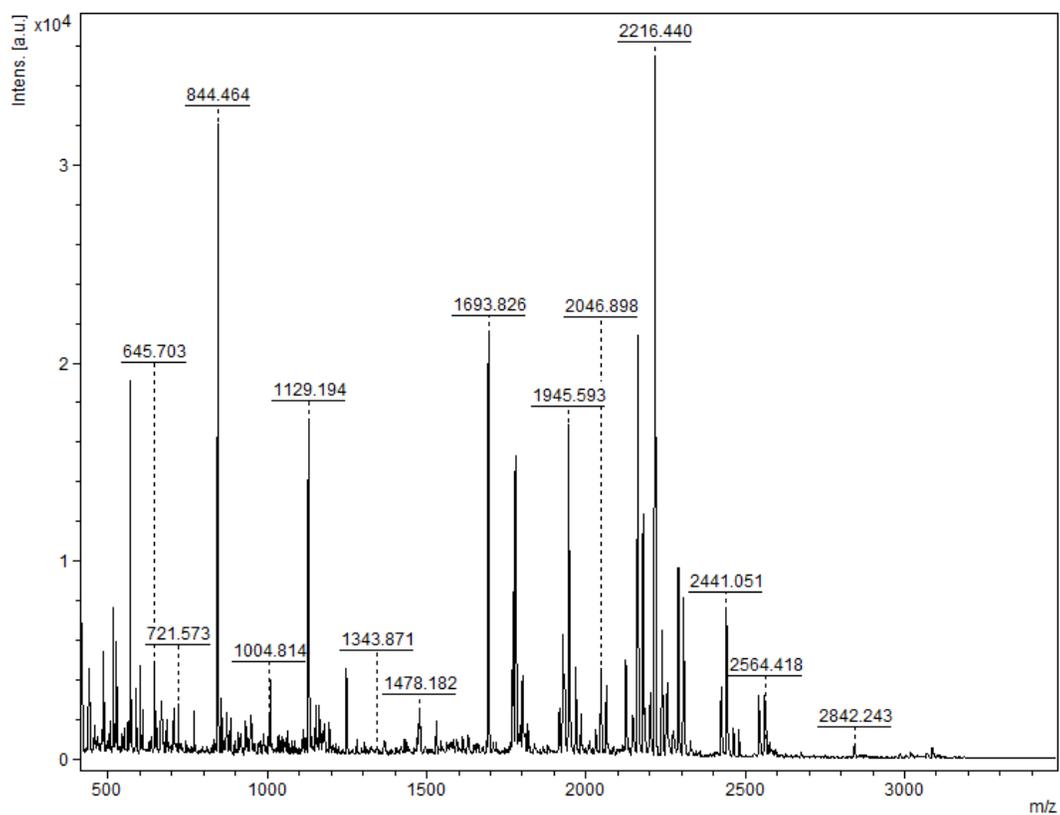
Apéndice 3

Espectro de masas correspondiente a la proteína del spot 3



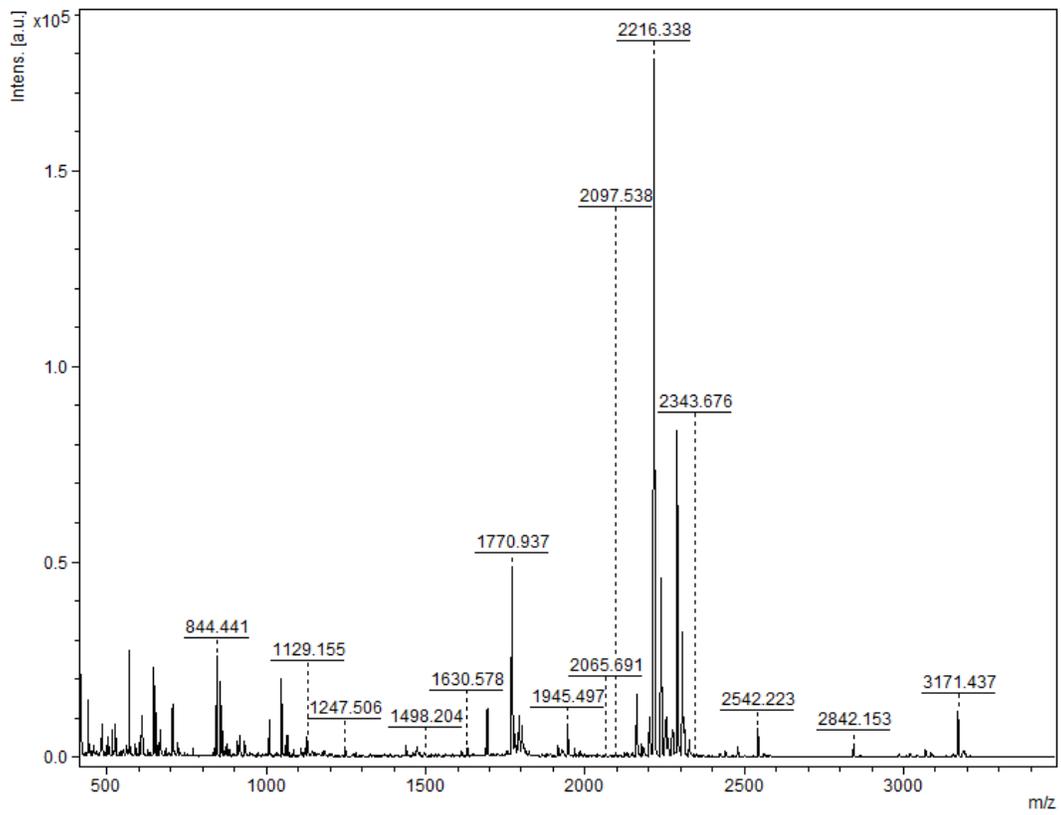
Apéndice 4

Espectro de masas correspondiente a la proteína del spot 5



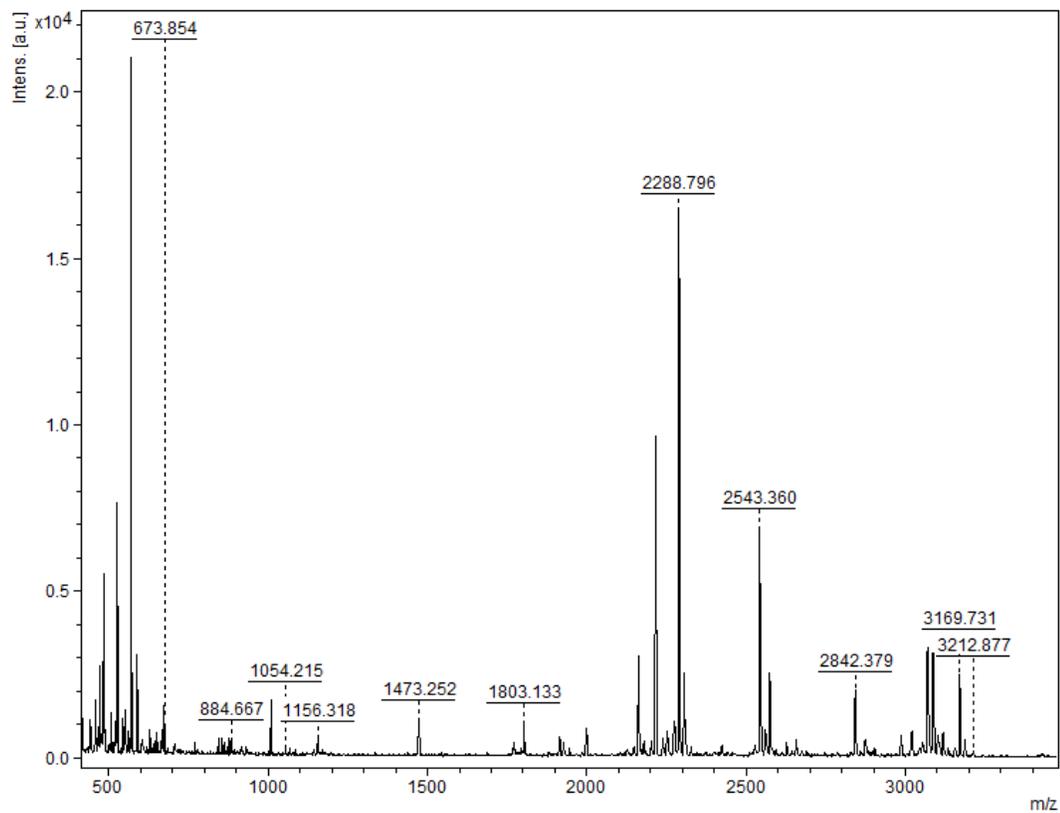
Apéndice 5

Espectro de masas correspondiente a la proteína del spot 7



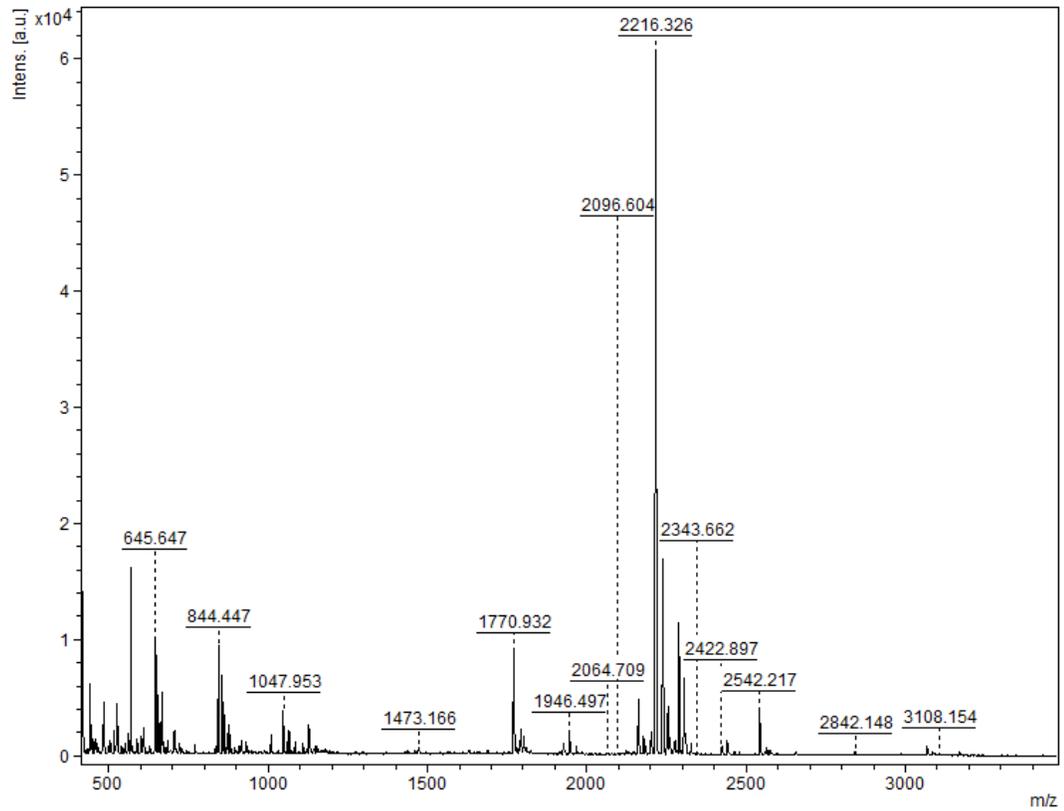
Apéndice 6

Espectro de masas correspondiente a la proteína del spot 8



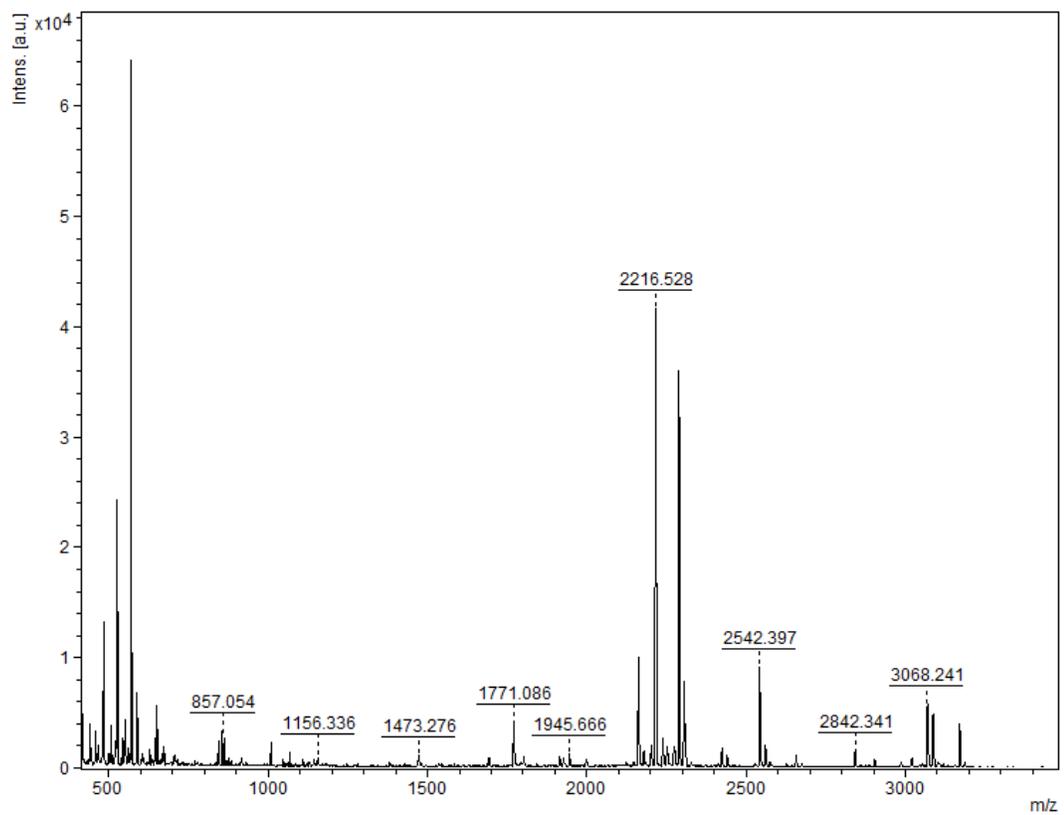
Apéndice 7

Espectro de masas correspondiente a la proteína del spot 10



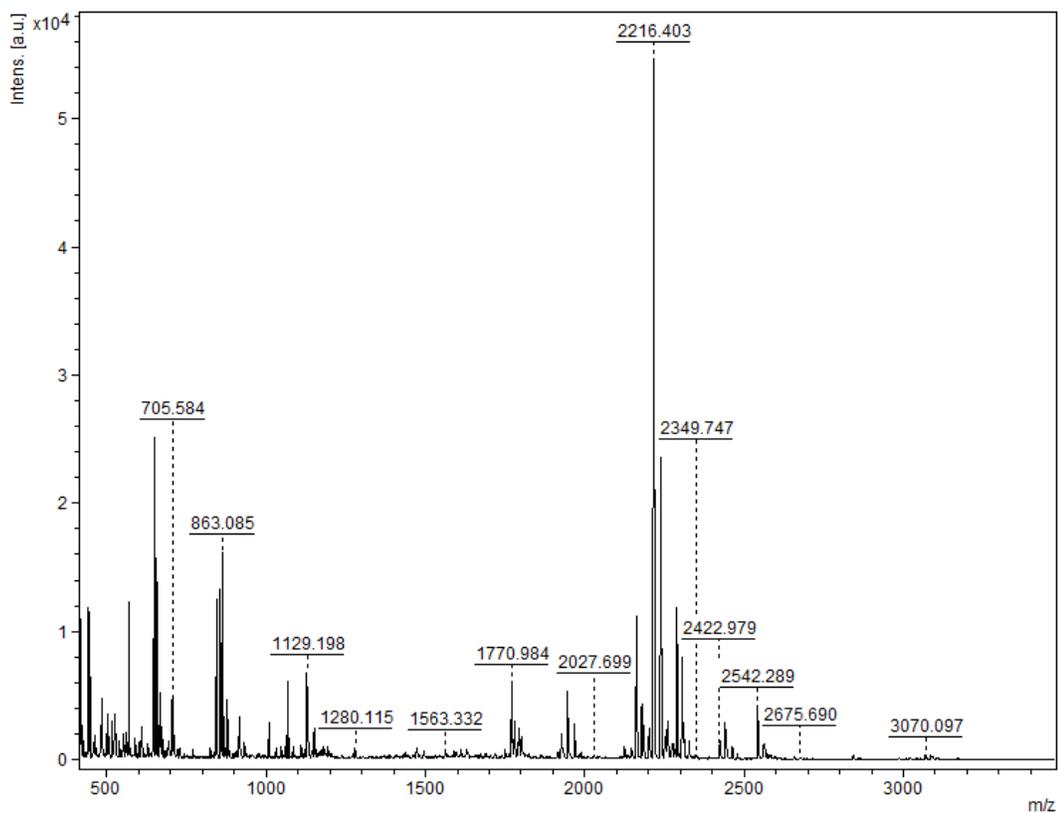
Apéndice 8

Espectro de masas correspondiente a la proteína del spot 13



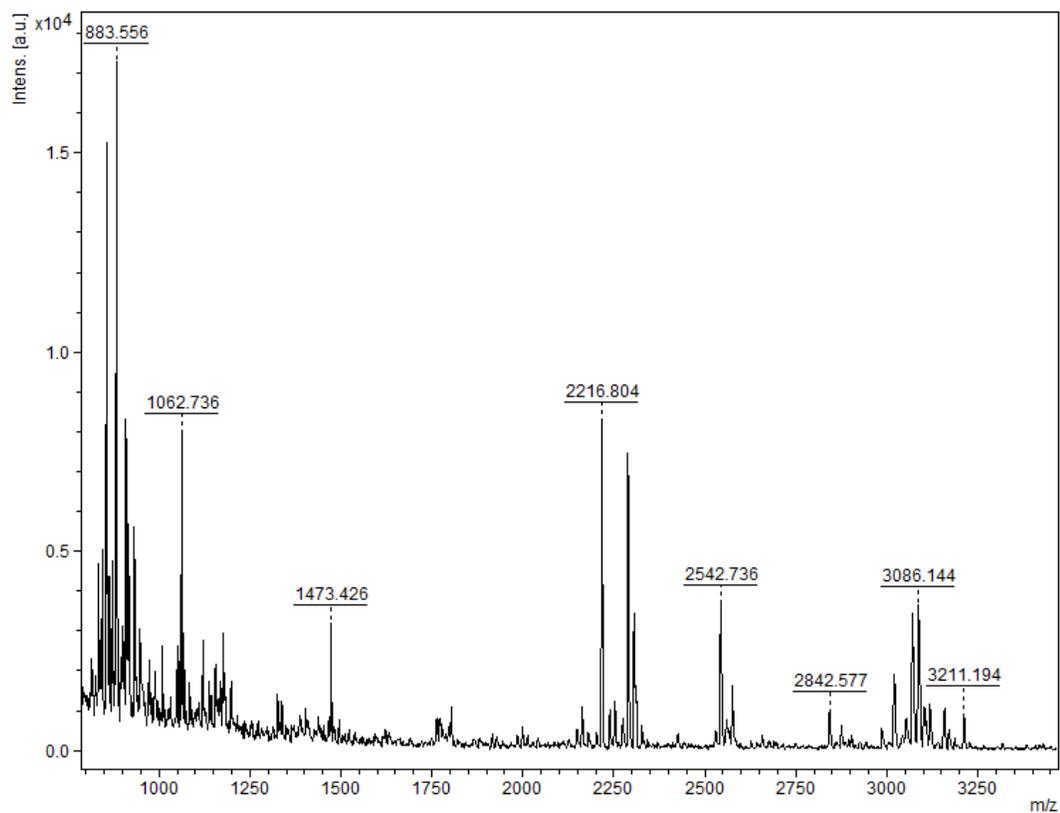
Apéndice 9

Espectro de masas correspondiente a la proteína del spot 14



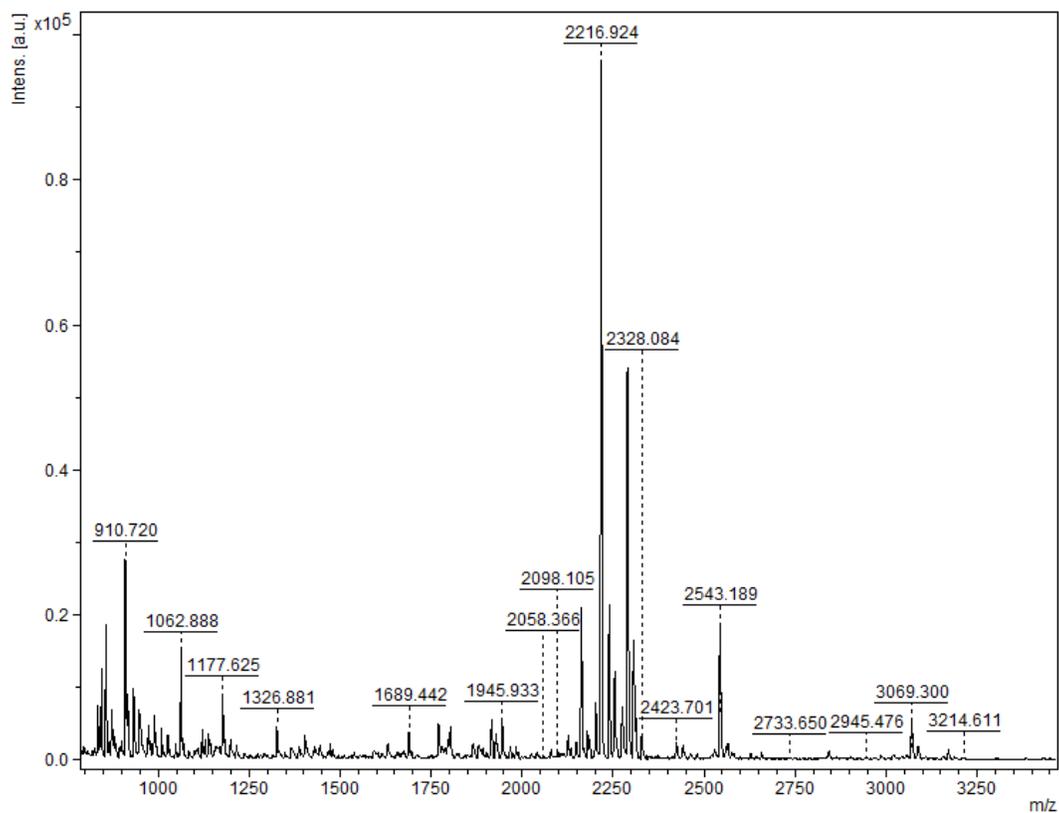
Apéndice 10

Espectro de masas correspondiente a la proteína del spot 18



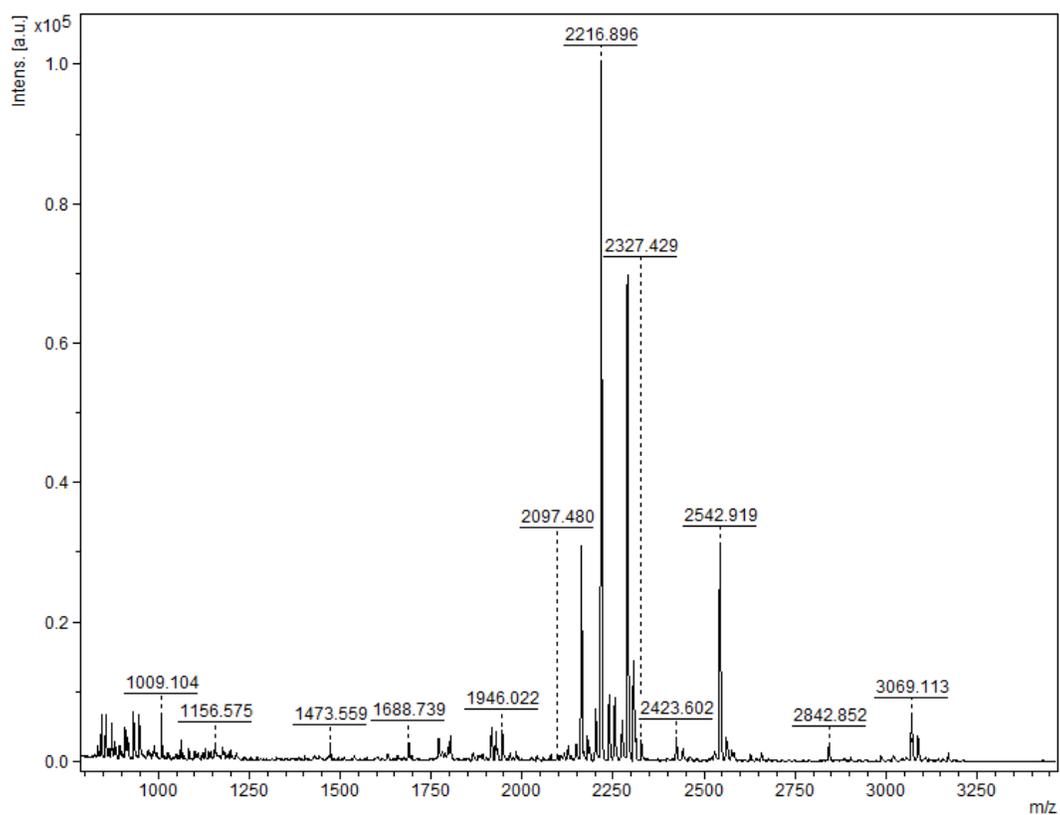
Apéndice 11

Espectro de masas correspondiente a la proteína del spot 20



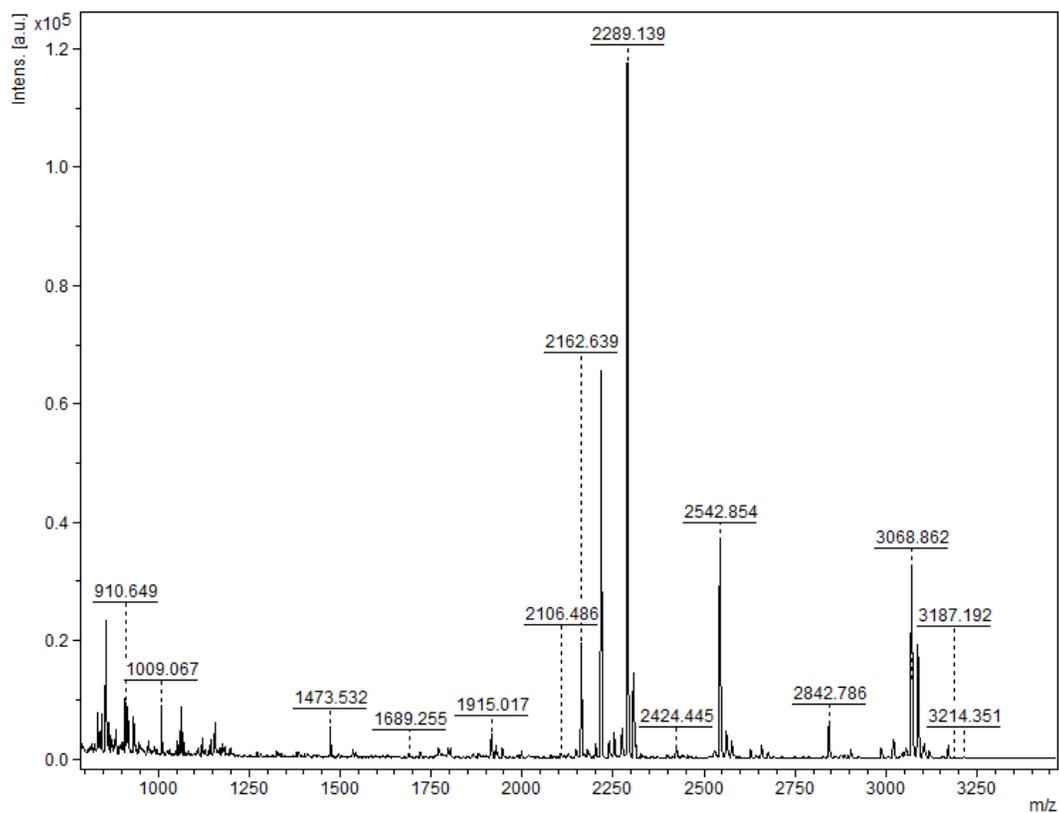
Apéndice 12

Espectro de masas correspondiente a la proteína del spot 23



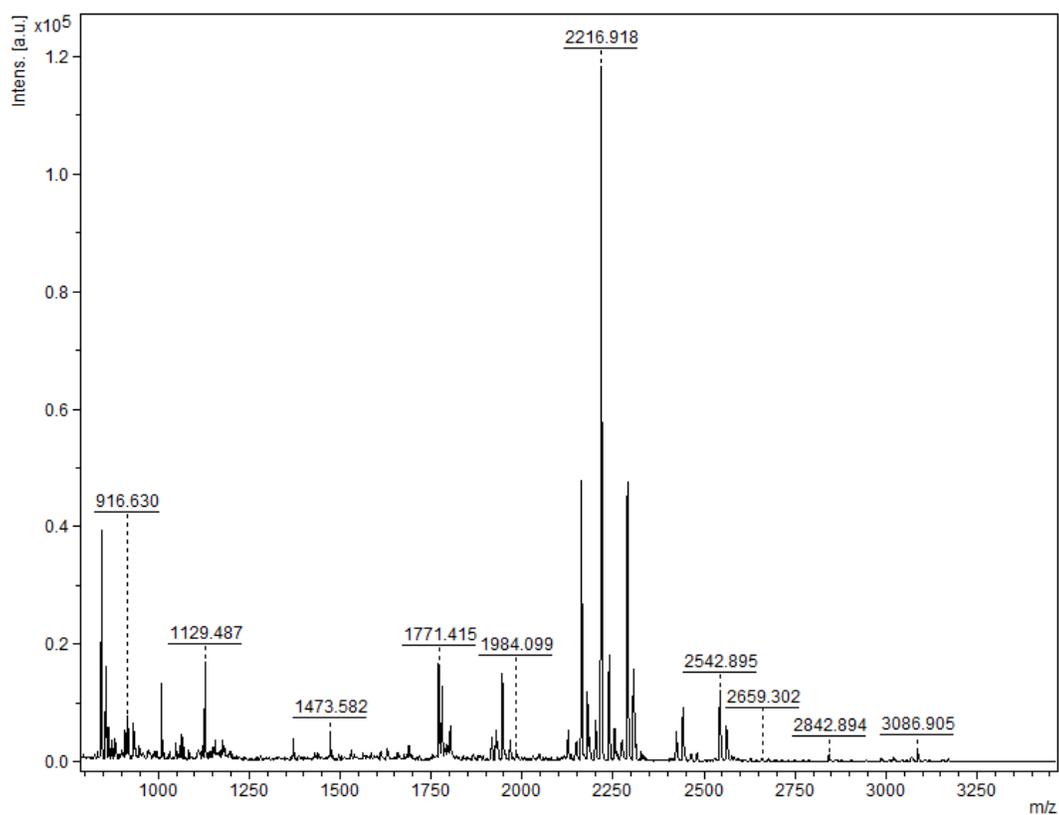
Apéndice 13

Espectro de masas correspondiente a la proteína del spot 24



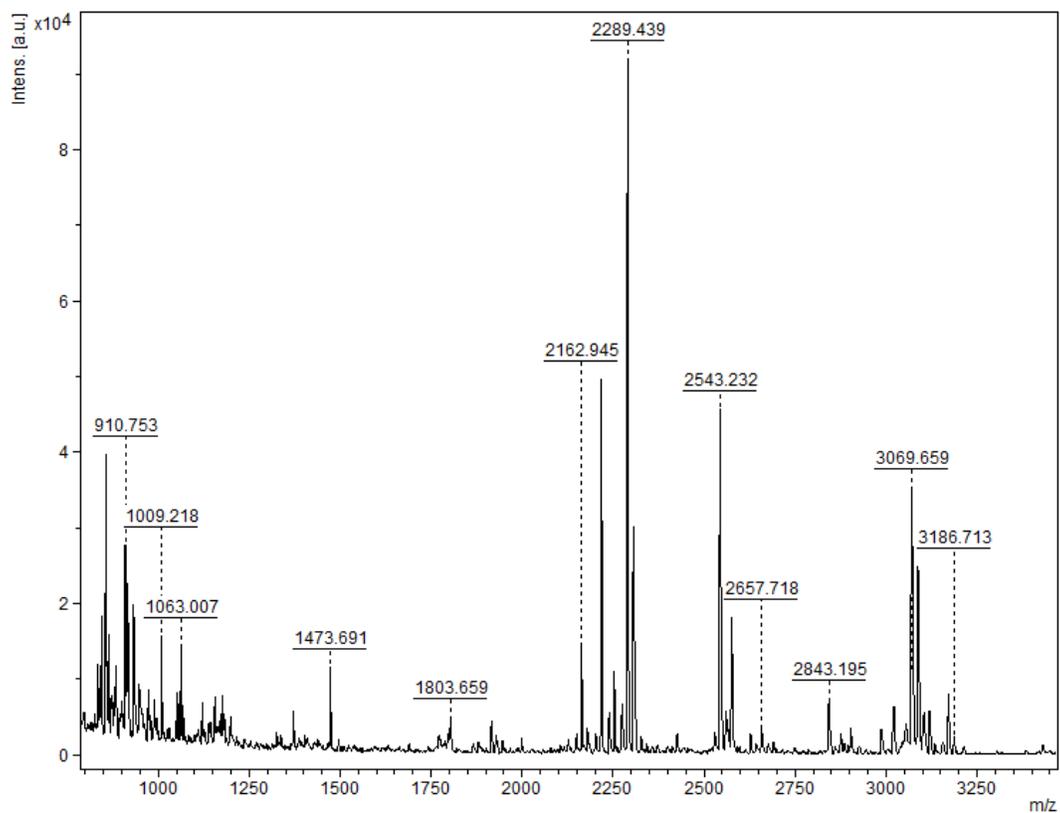
Apéndice 14

Espectro de masas correspondiente a la proteína del spot 25



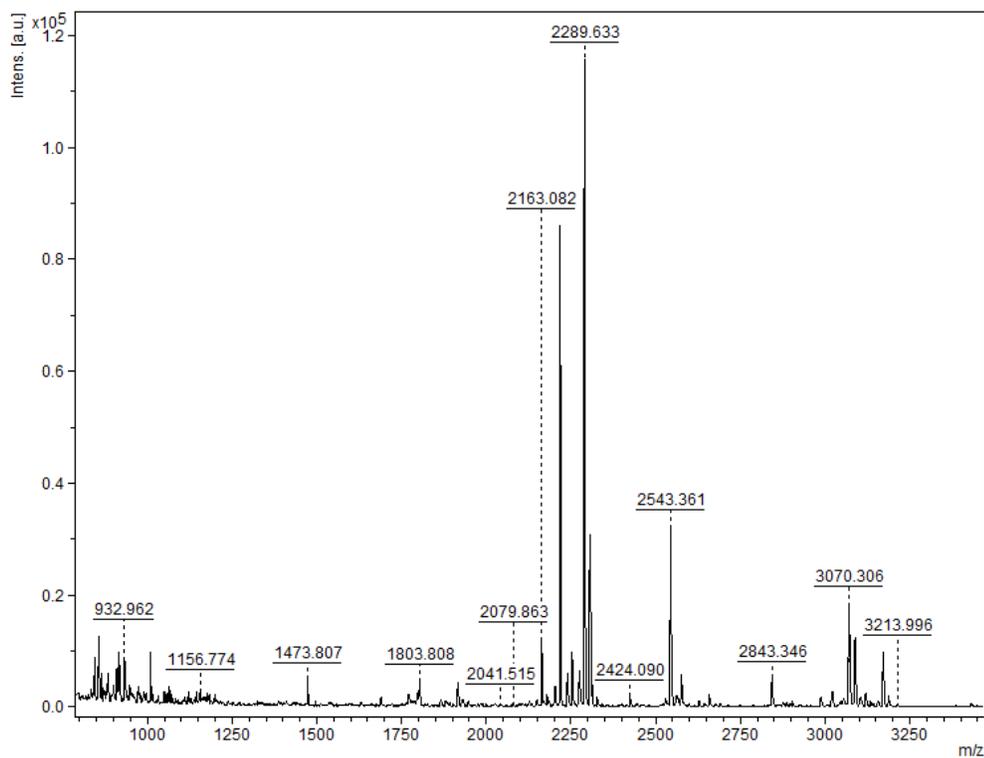
Apéndice 15

Espectro de masas correspondiente a la proteína del spot 27



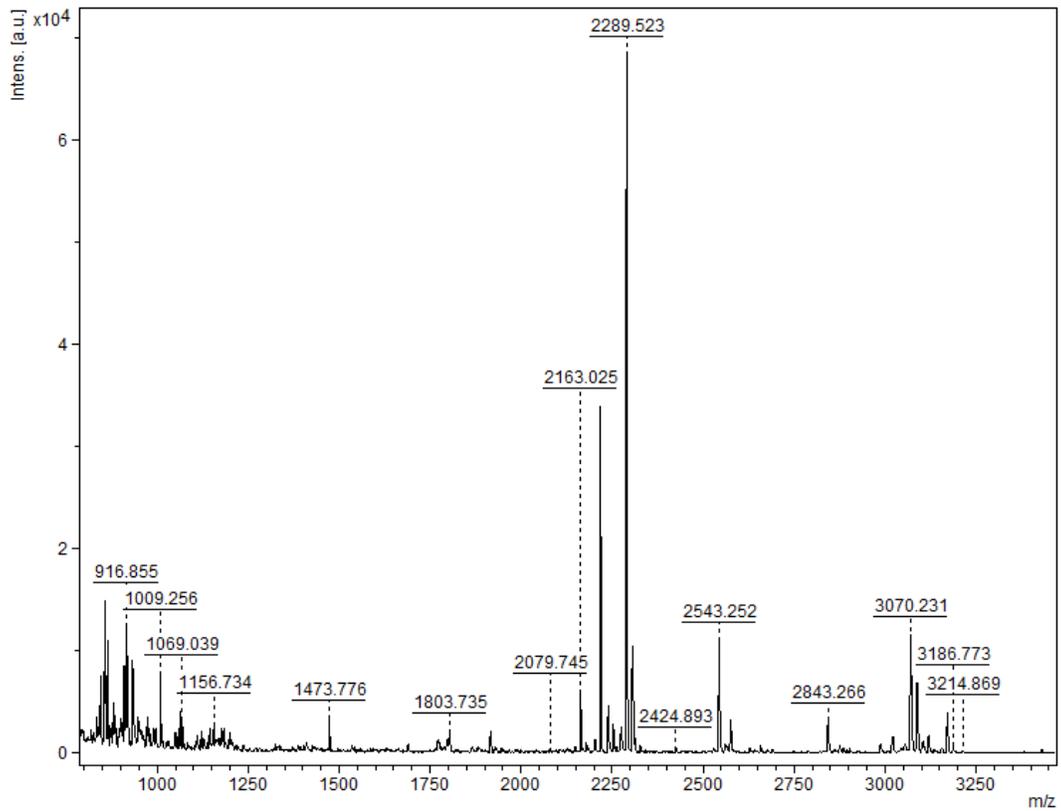
Apéndice 16

Espectro de masas correspondiente a la proteína del spot 28



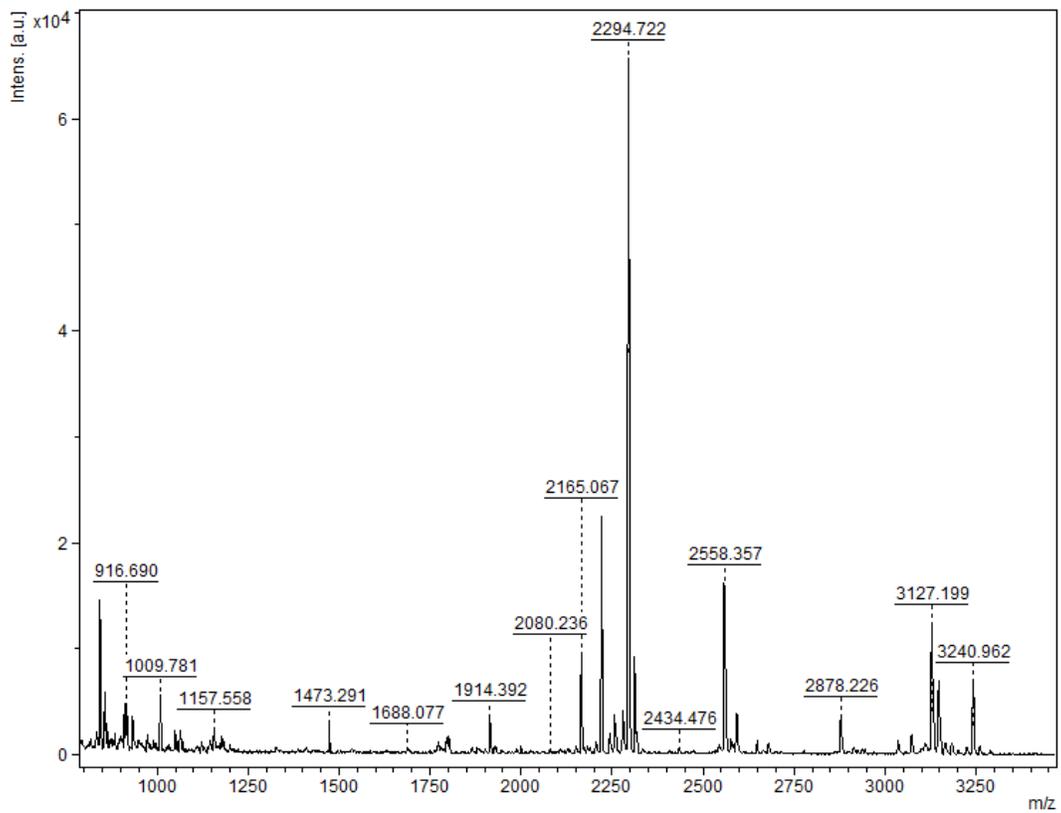
Apéndice 17

Espectro de masas correspondiente a la proteína del spot 29



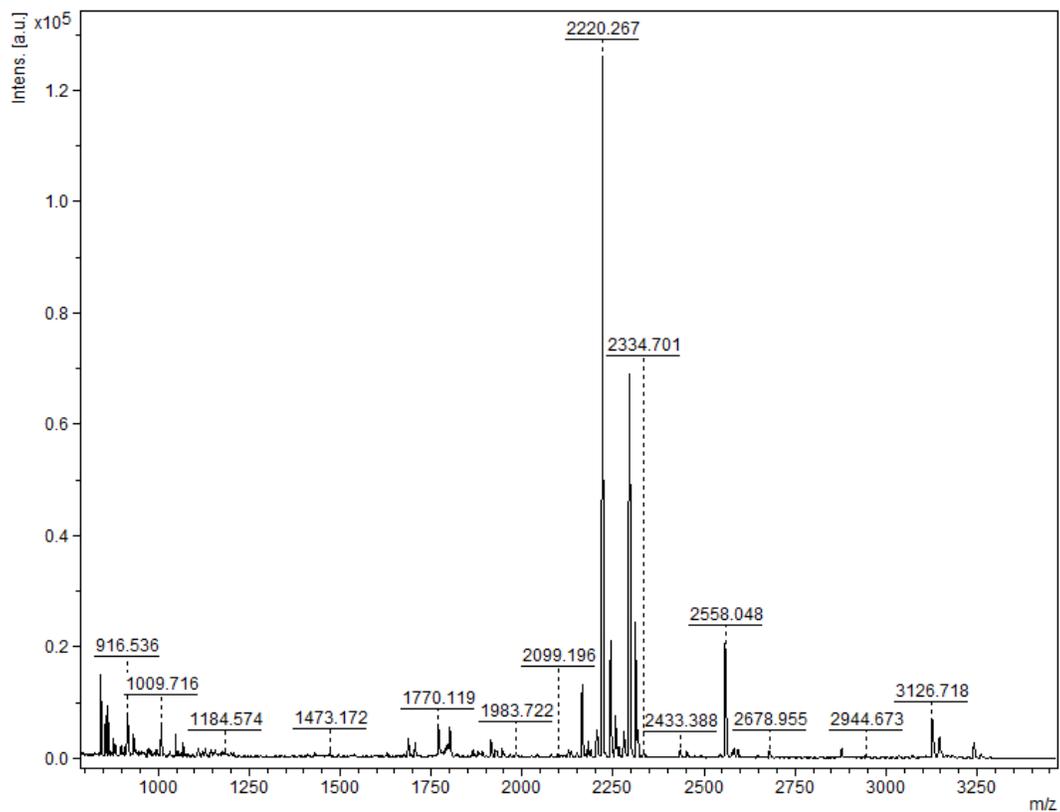
Apéndice 18

Espectro de masas correspondiente a la proteína del spot 31



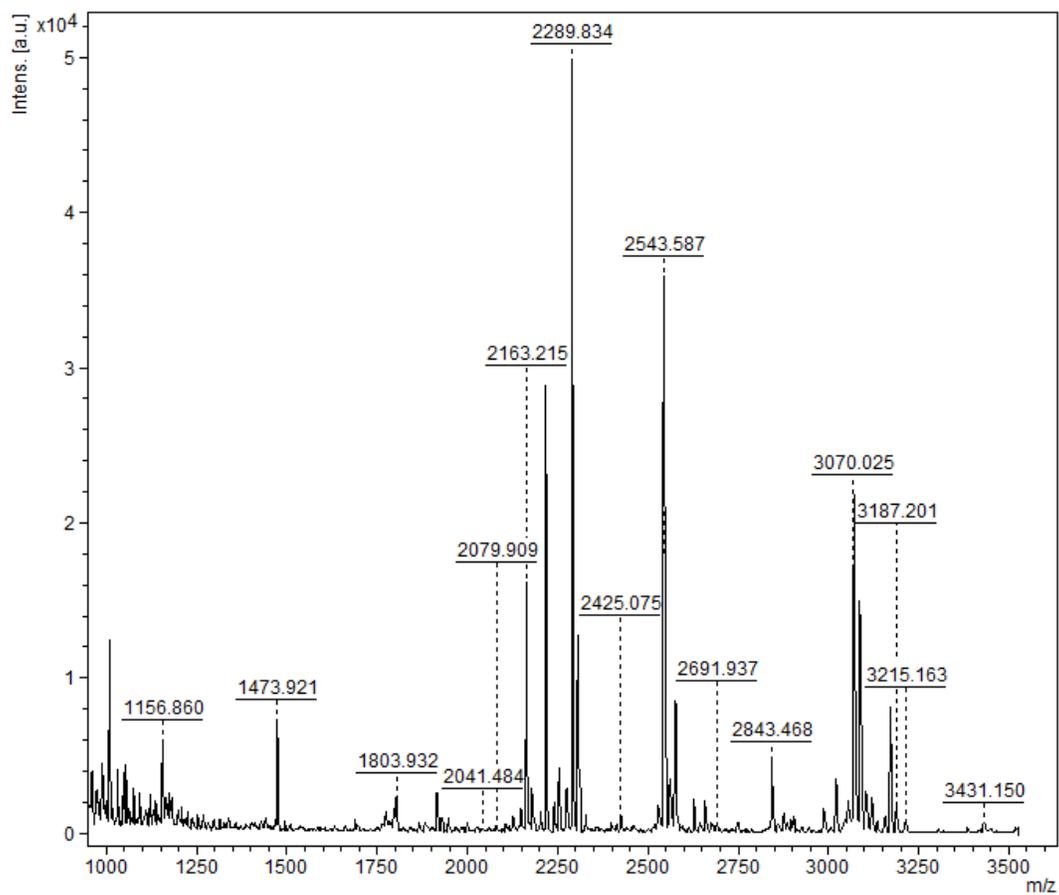
Apéndice 19

Espectro de masas correspondiente a la proteína del spot 37



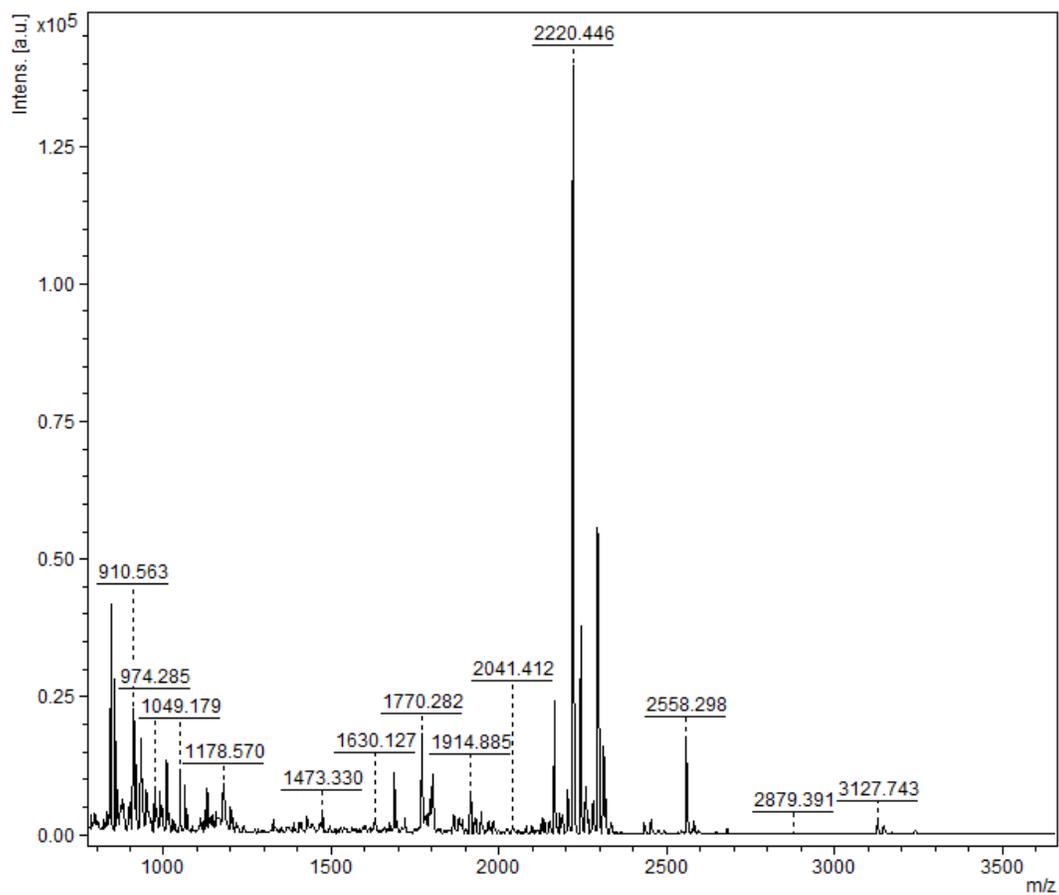
Apéndice 20

Espectro de masas correspondiente a la proteína del spot 38



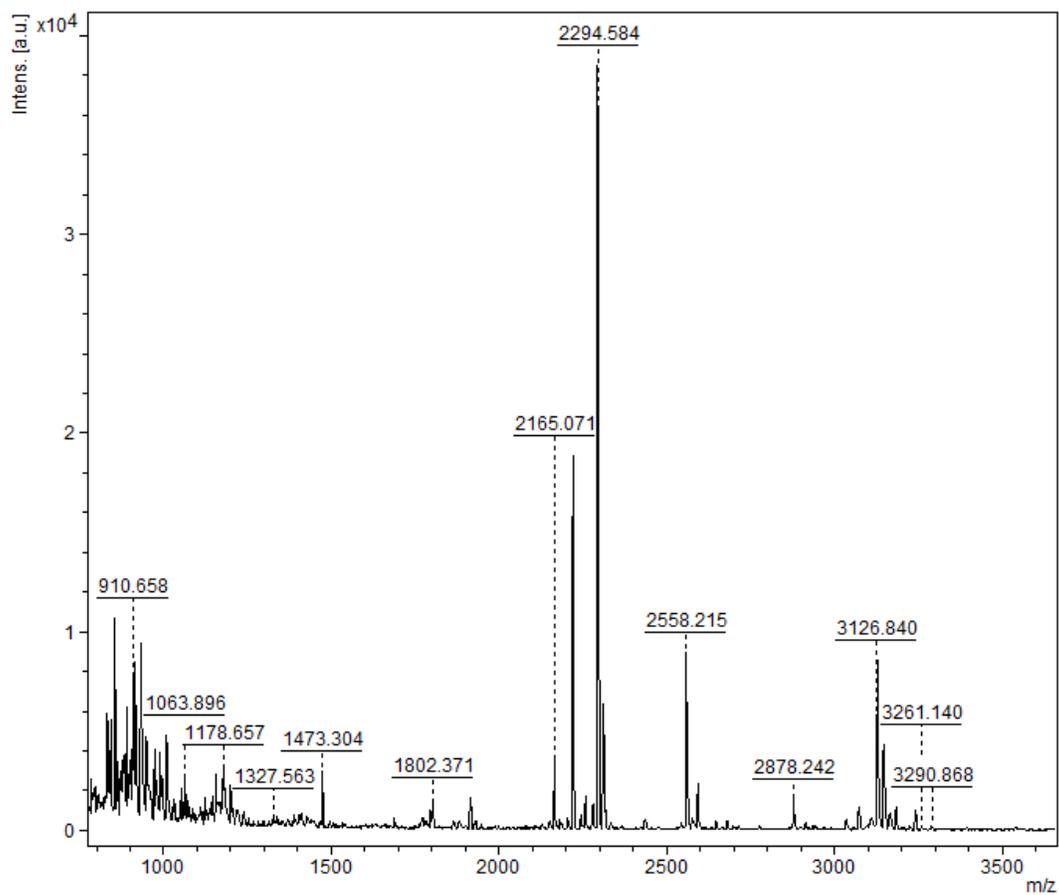
Apéndice 21

Espectro de masas correspondiente a la proteína del spot 39



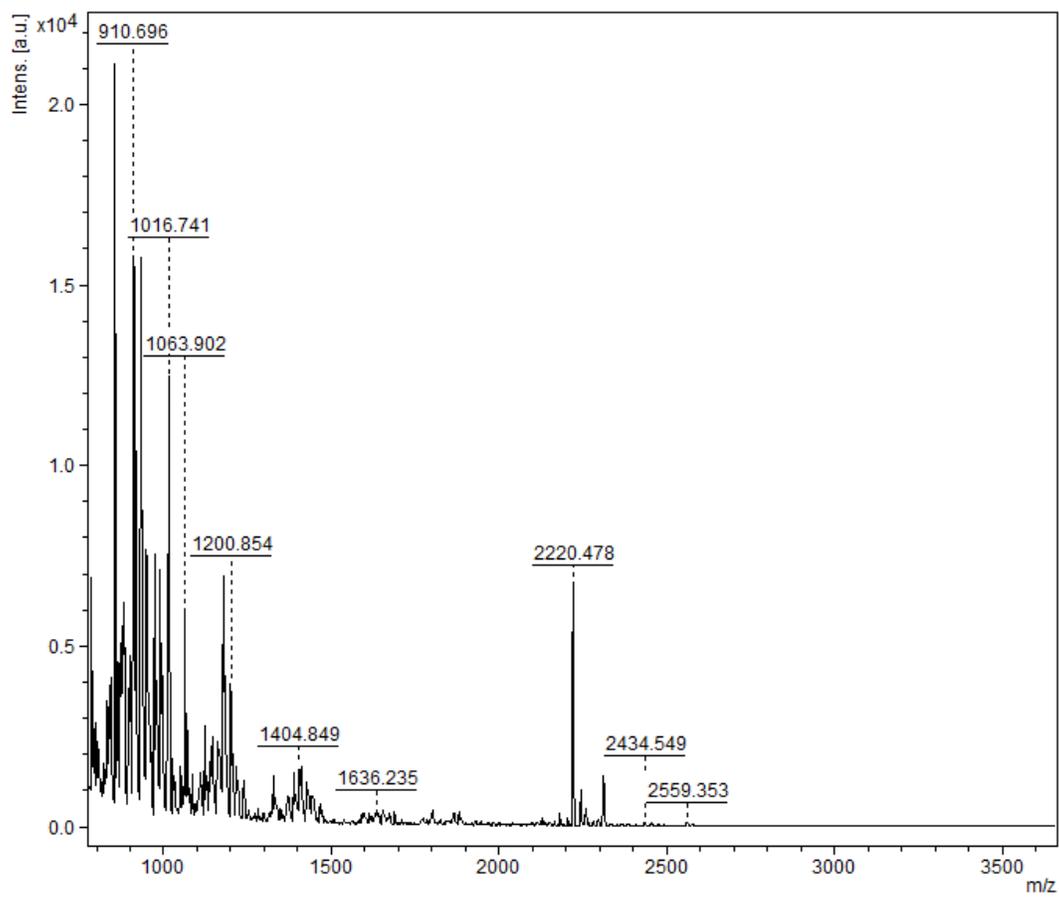
Apéndice 22

Espectro de masas correspondiente a la proteína del spot 41



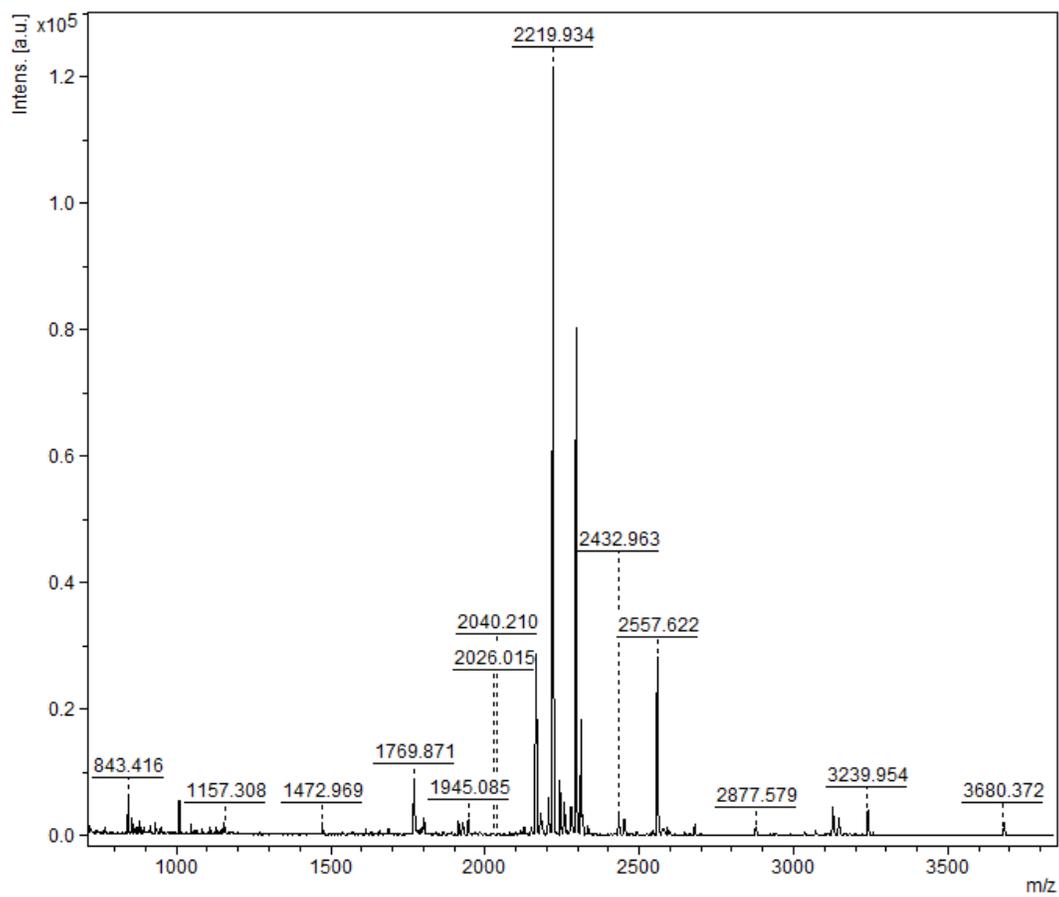
Apéndice 23

Espectro de masas correspondiente a la proteína del spot 42



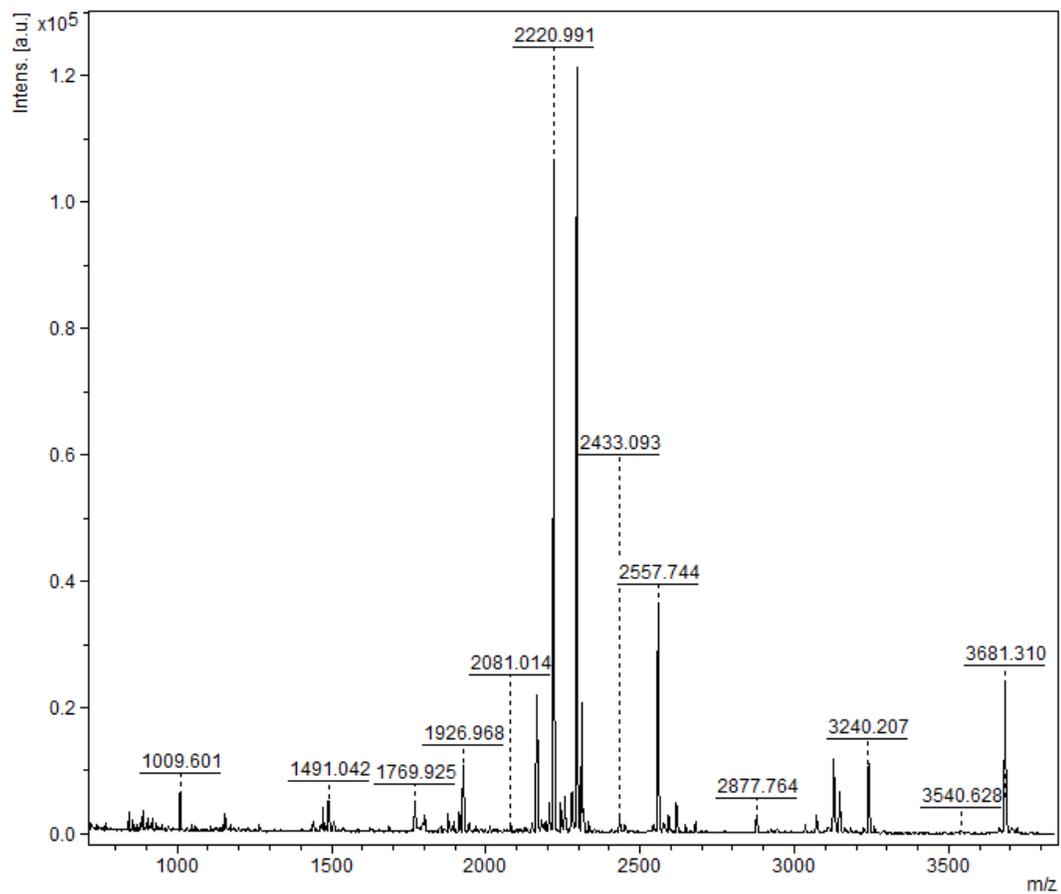
Apéndice 24

Espectro de masas correspondiente a la proteína del spot 44



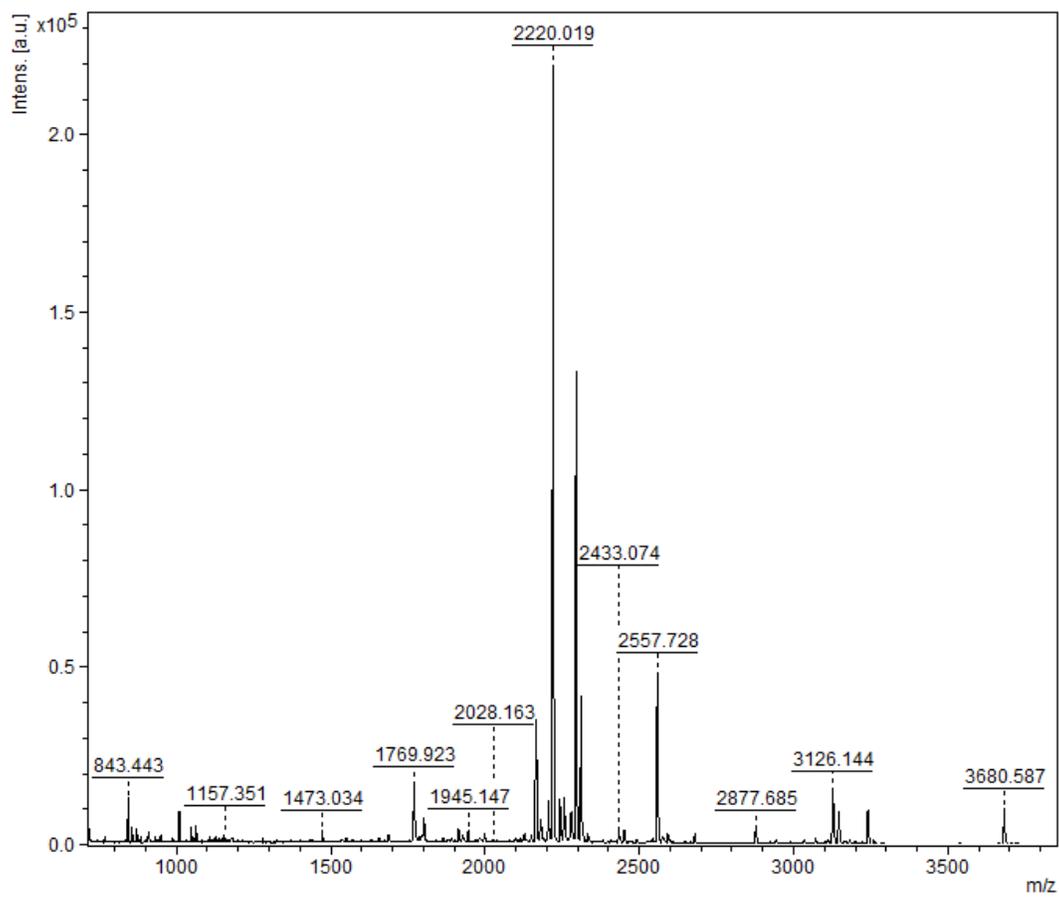
Apéndice 25

Espectro de masas correspondiente a la proteína del spot 46



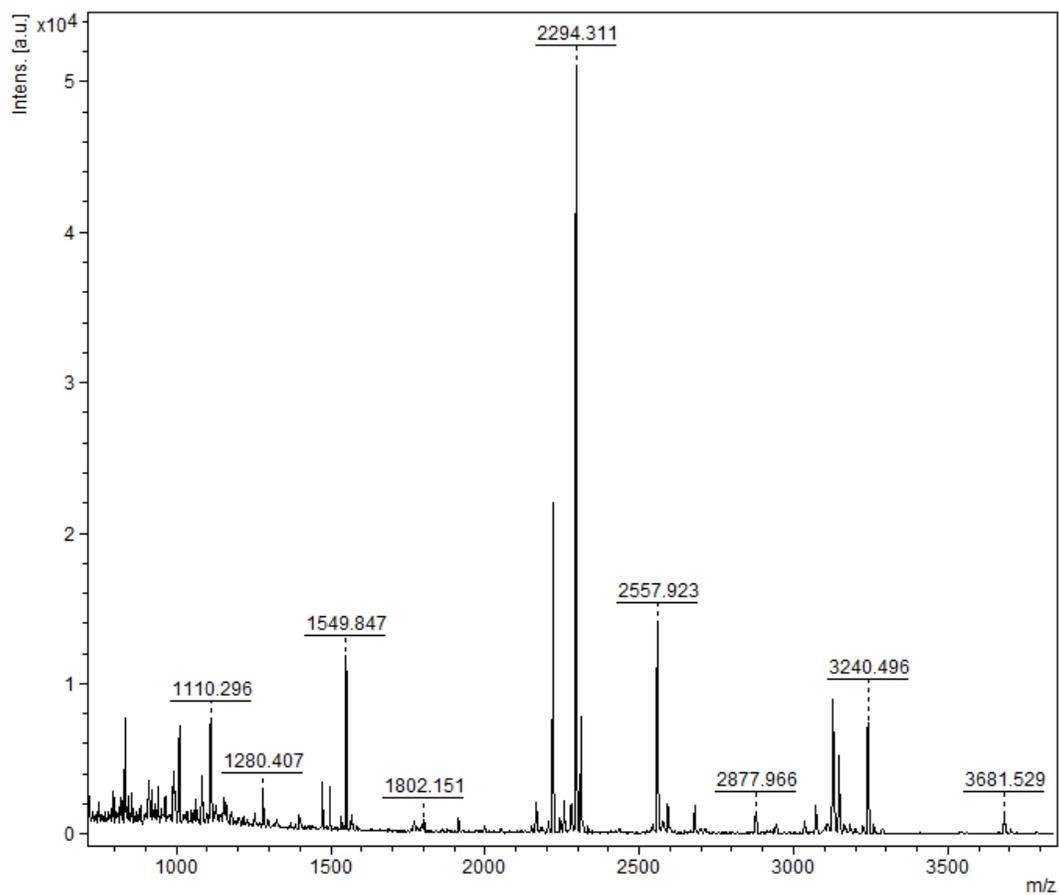
Apéndice 26

Espectro de masas correspondiente a la proteína del spot 52



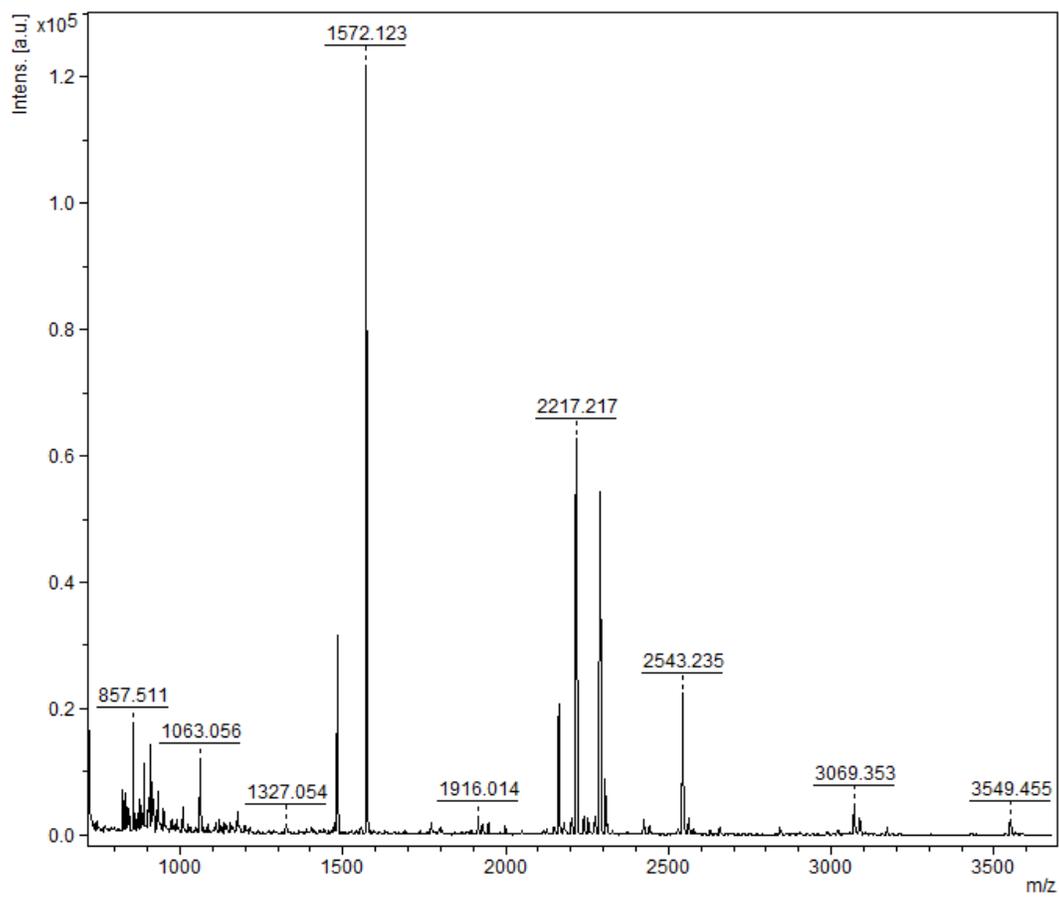
Apéndice 27

Espectro de masas correspondiente a la proteína del spot 53



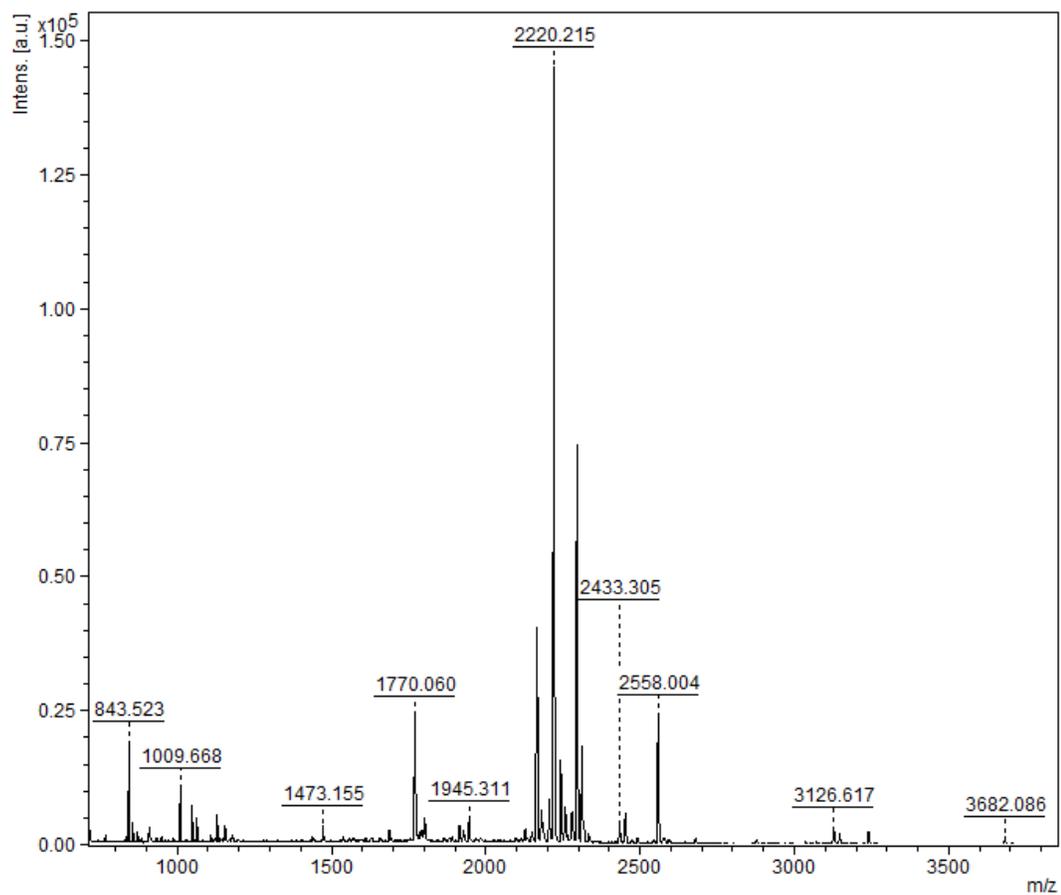
Apéndice 28

Espectro de masas correspondiente a la proteína del spot 58



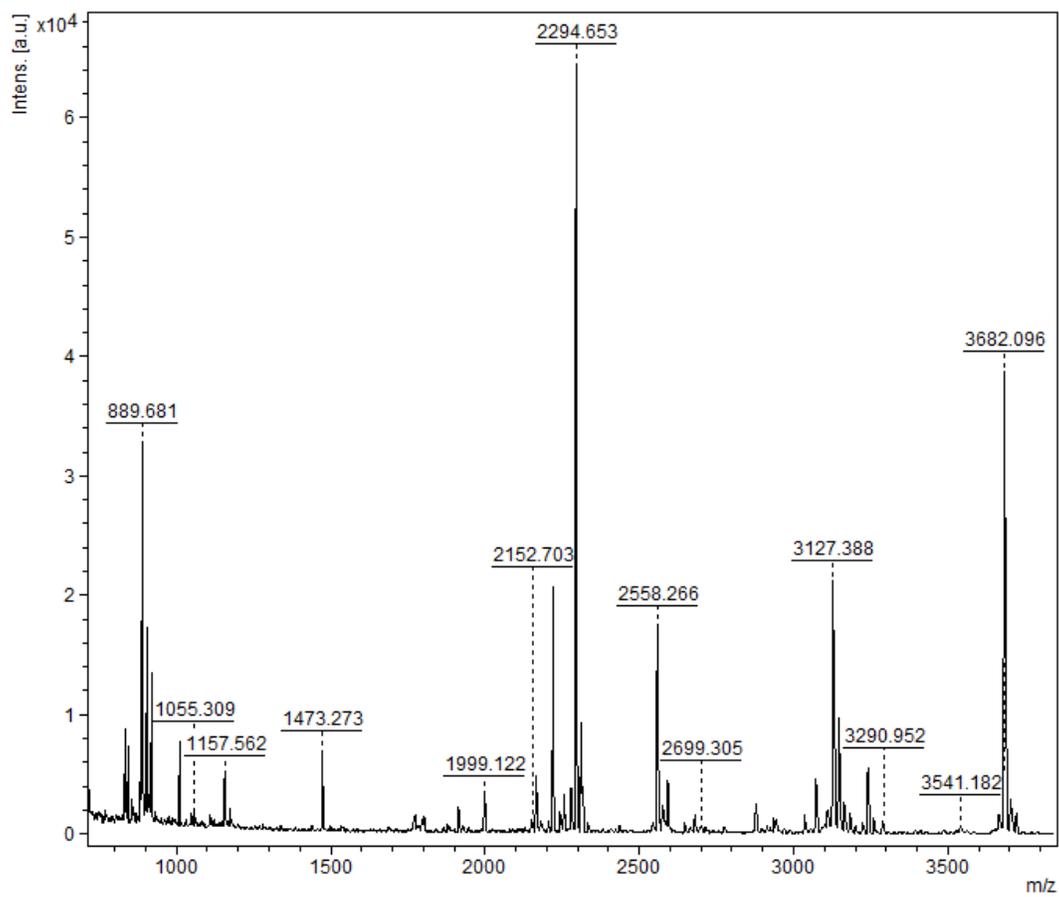
Apéndice 29

Espectro de masas correspondiente a la proteína del spot 59



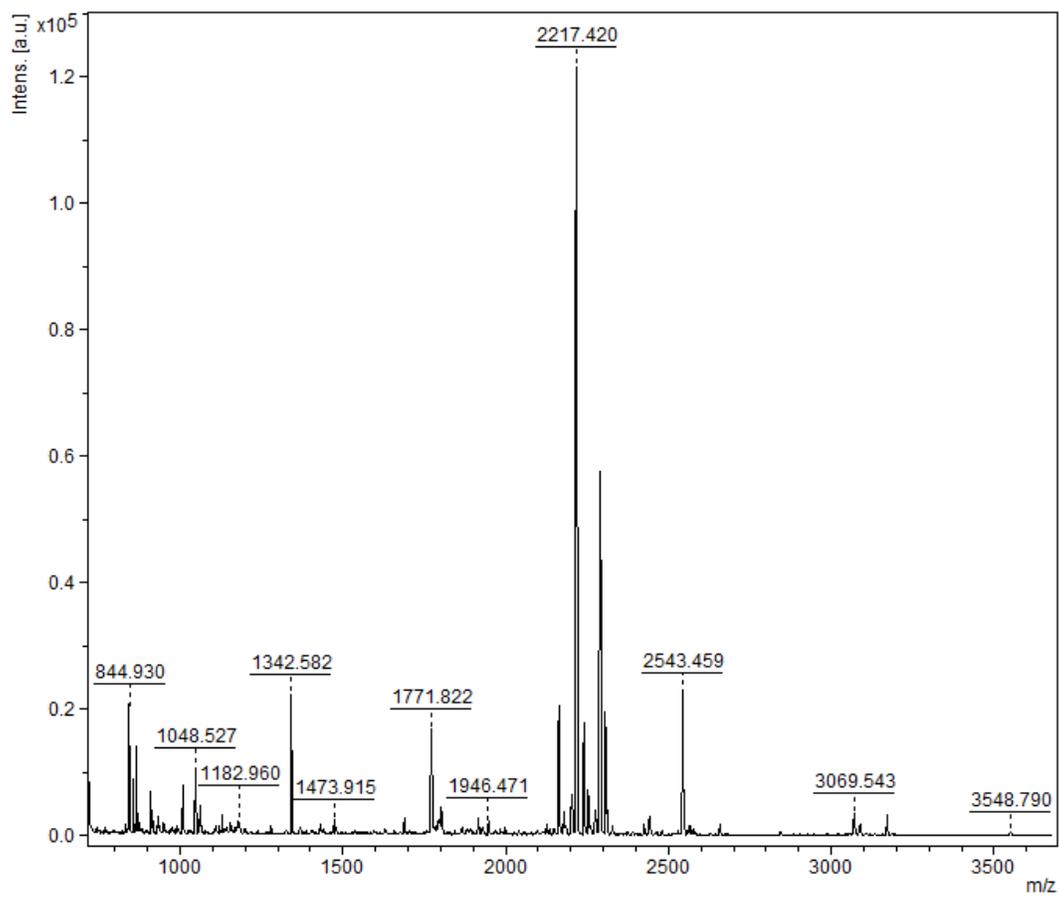
Apéndice 30

Espectro de masas correspondiente a la proteína del spot 60



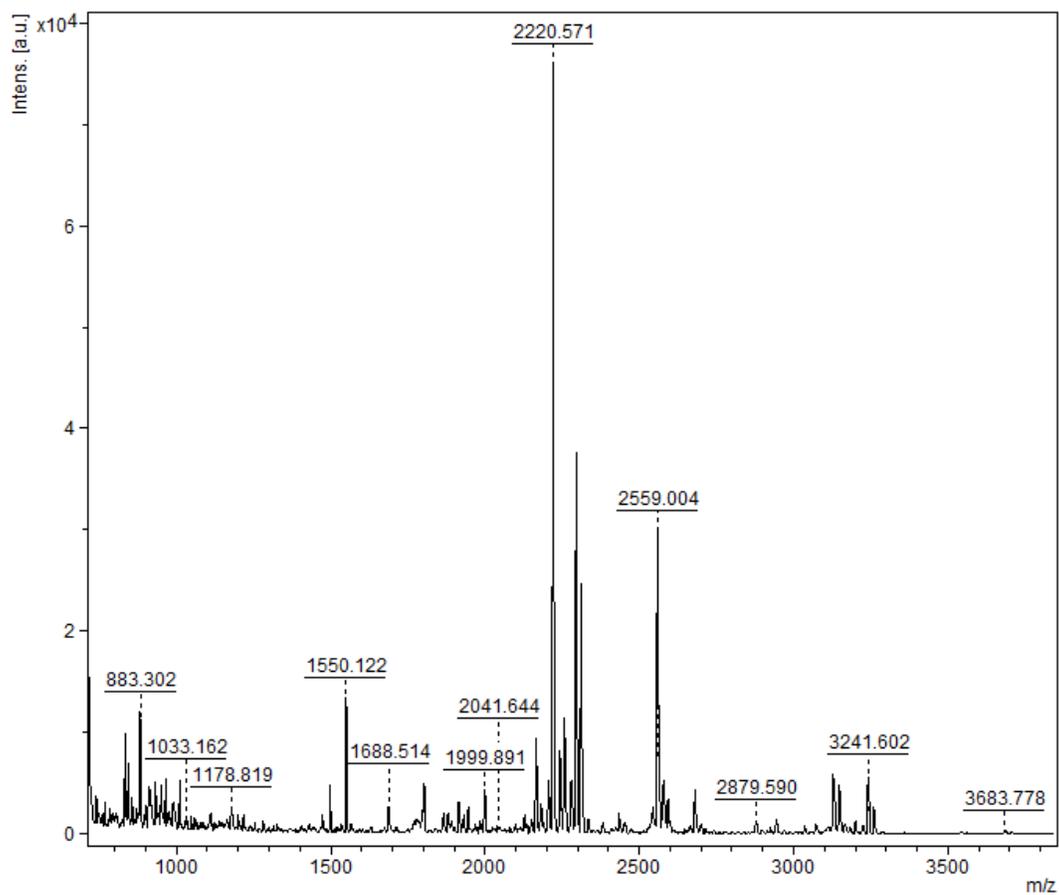
Apéndice 31

Espectro de masas correspondiente a la proteína del spot 61



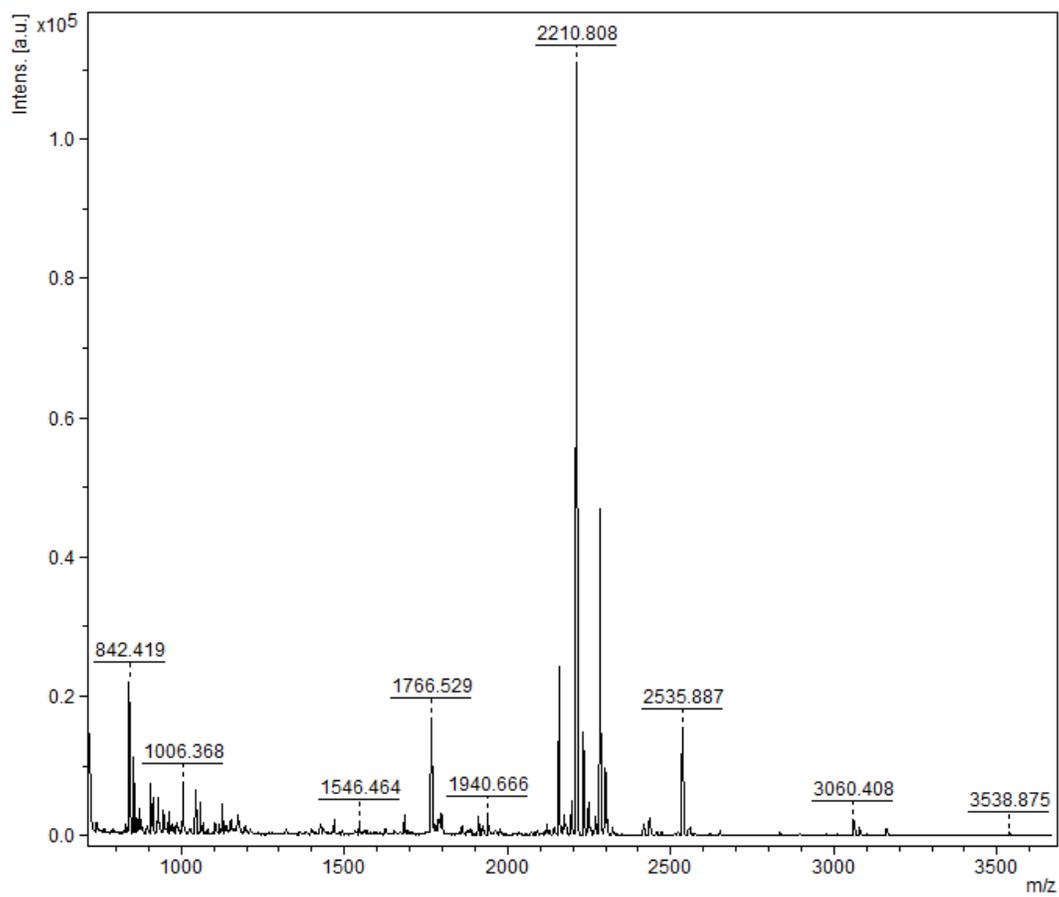
Apéndice 32

Espectro de masas correspondiente a la proteína del spot 62



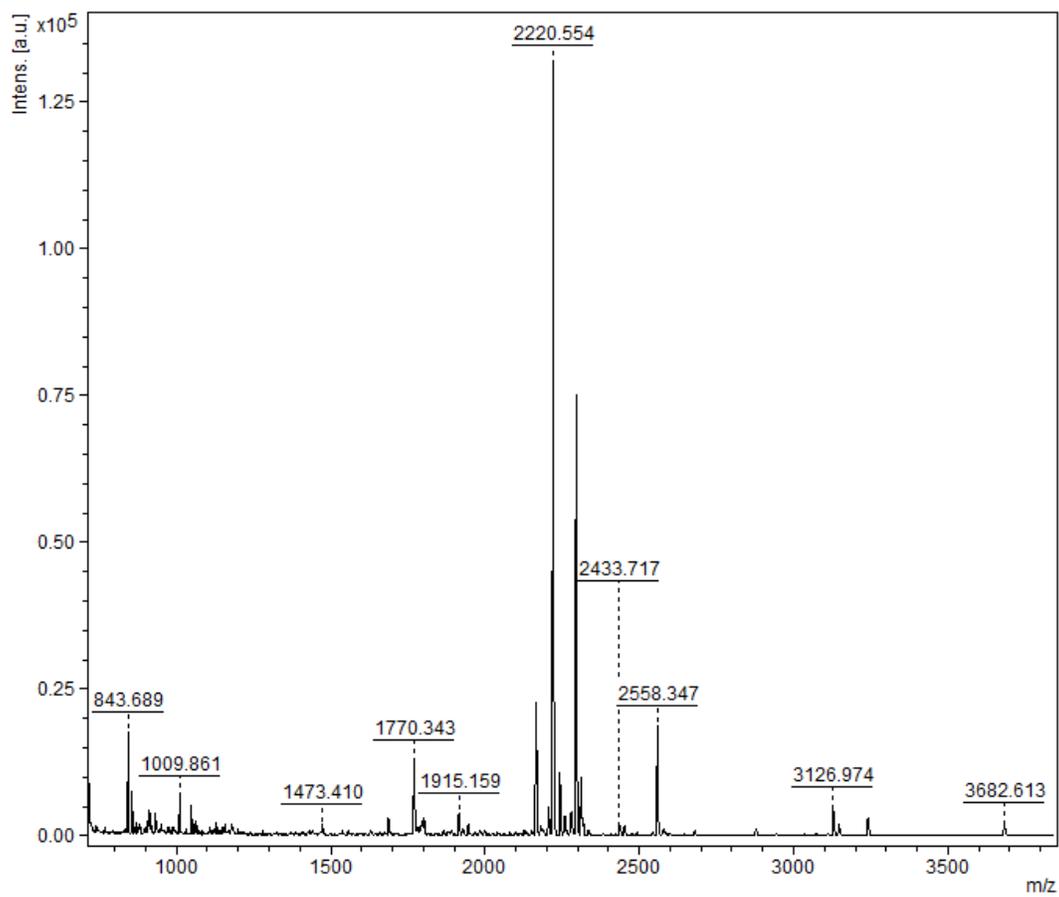
Apéndice 33

Espectro de masas correspondiente a la proteína del spot 63



Apéndice 34

Espectro de masas correspondiente a la proteína del spot 68



Apéndice 35

Espectro de masas correspondiente a la proteína del spot 70

