

PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Ae. aegypti*

PROTEOMA FUNCIONAL MITOCONDRIAL DE

***Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 (Diptera: Culicidae)**

RUTH MARIELA CASTILLO MORALES

Trabajo de Grado para optar al título de doctor en

Ciencias Biomédicas

Director

JONNY EDWARD DUQUE LUNA PhD

Director

STELIA CAROLINA MÉNDEZ PhD

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE SALUD

ESCUELA DE MEDICINA

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

BUCARAMANGA

2023

Dedicatoria

Para Diego, mi amor y mi compañero de vida; quien siempre ha sido mi apoyo y mi cómplice desde el primer momento.

A mi familia, especialmente a mi Padre, quien en momentos difíciles me brindo el apoyo necesario.

A mis hermanos y sobrinos, quienes, a pesar de la distancia, me apoyaron durante todo este proceso.

A mi familia política, mis suegros y mi cuñada, quienes se han convertido en parte importante de mi vida y han contribuido a sustancialmente con su apoyo incondicional.

Y por último, pero no menos importante, a Alma, quien llego a nuestras vidas en el momento adecuado para llenarnos la vida de ronroneos y pelitos.

Agradecimientos

Agradezco a la Universidad Industrial de Santander por darme la oportunidad de cursar mis estudios de postgrado en tan importante institución educativa, al Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales – CINTROP, pues en sus instalaciones tuve la oportunidad de formarme no solo como profesional, sino como ser humano en continuo aprendizaje.

A los profesores Jonny y Stelia Carolina, quienes desde el primer momento confiaron en mis capacidades, me brindaron el apoyo, guía y dedicación necesarios, y se convirtieron en un ejemplo a seguir, no solo en el ámbito académico, sino también en el ámbito personal.

A los docentes adscritos al Departamento de Ciencias Básicas de la Facultad de Salud, pues muchas de sus enseñanzas contribuyeron a mi formación.

A todos y cada uno de los integrantes que hicieron parte del Laboratorio de Entomología Medica del CINTROP, con muchos de ellos compartimos alegrías, tristezas, experimentos, desvelos. Aunque de todos ellos guardo gratos recuerdos, agradezco especialmente a Juliana y Gustavo, con quienes compartí momentos en campo, responsabilidades de cuidado de las colonias y del laboratorio.

A Diana y Sebastián pues con ellos ejecuté gran parte de los experimentos de respiración mitocondrial y de proteómica y con quienes compartí muchas experiencias de vida.

PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Ae. aegypti*

A Alejandro, Edwin, Ramiro, Jose, Aurora, Natalia, Luisa y demás amigos del lab. 110, con quienes compartimos espacios, momentos, recuerdos bonitos.

A muchos de mis compañeros y amigos adscritos a otros laboratorios de la UIS: Luis Carlos, Mayra, Jennifer, Gonzalo, Andrés, Stephania, Marlon, Inés, Martha, quienes siempre mostraron su disposición de ayudar y de quienes aprendí muchas cosas.

También debo agradecer a todo el personal administrativo y de servicios generales, pues con su labor casi silenciosa contribuyen en gran medida a la formación continua de estudiantes.

Al parque Tecnológico UIS Guatiguará, pues se convirtió en un segundo hogar para mí. Por último, a todos con quien cruce caminos y de quienes tome lo mejor para mi aprendizaje.

Tabla de Contenido

1. CAPITULO I.....	35
1.1 INTRODUCCIÓN.....	35
1.2 OBJETIVOS.....	38
1.2.1 General	38
1.2.2 Específicos	38
1.3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
1.3.1 MATERIAL BIOLÓGICO	38
1.3.2 COMPONENTE EXPERIMENTAL	39
1.3.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	50
1.4 RESULTADOS.....	51
1.4.1 Comparación protocolos de aislamiento	51
1.4.2 Medición de parámetros respiratorios en mitocondrias aisladas	56
1.4.3 Verificación de la Integridad mitocondrial.....	65
1.4.4 Medición de respiración sobre larvas, pupas y tórax de hembras permeabilizados	70
1.4.5 Comparación de parámetros respiratorios de mitocondrias aisladas vs tejido permeabilizado.....	94
1.4.6 Actividad enzimática	104
1.5 DISCUSIÓN.....	114
1.5.1 Protocolos de aislamiento de mitocondrias	114

1.5.2 Parámetros respiratorios en mitocondrias aisladas y verificación de la integridad mitocondrial	119
1.5.3 Medición de respiración sobre larvas, pupas y tórax de hembras permeabilizados	125
1.5.4 Actividad enzimática	131
1.6 CONCLUSIONES.....	134
Bibliografía Citada	138
2. CAPITULO II.....	151
2.1 INTRODUCCIÓN.....	151
2.2 OBJETIVOS.....	154
2.2.1 GENERAL	154
2.2.2 ESPECÍFICOS	154
2.3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	154
2.3.1 Colonia <i>Aedes aegypti</i>	154
2.3.2 Componente Experimental.....	155
2.3.2. Componente Bioinformático.....	159
2.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y BIOINFORMÁTICO.....	162
2.5 RESULTADOS.....	163
2.5.1 Electroforesis bidimensional de proteínas mitocondriales de larvas E4	163
2.5.2 Electroforesis bidimensional de pupas	168
2.5.3 Electroforesis bidimensional de adultos	171
2.5.4 Comparación de electroforesis bidimensional entre fases de desarrollo de <i>Ae. aegypti</i>	175

2.5.5 Análisis del transcriptoma de <i>Ae. aegypti</i>	192
2.6 DISCUSIÓN	200
Bibliografía Citada	215
3. CONCLUSIONES GENERALES	228
4. CONSIDERACIONES ÉTICAS	231
4.1 NIVEL DE RIESGO Y BENEFICIO DEL PROYECTO	231
4.2 USO DE ANIMALES	232
4.3 MANEJO DE SUSTANCIAS	233
4.3.1 MANEJO DE RESIDUOS GENERADOS EN EL PROYECTO	235
4.4 ACTA DE APROBACIÓN COMITÉ DE ÉTICA	238
5. DIVULGACIÓN DE LOS RESULTADOS	240
5.1 PARTICIPACIÓN EN EVENTOS ACADÉMICOS	240
5.2 PUBLICACIONES	241

Lista de Tablas

CAPITULO I

Tabla 1 - Coeficiente de Control Respiratorio (CCR: Respiración estado 3 / Respiración estado 4 inducido con oligomicina) de mitocondrias aisladas de larvas L4, pupas y tórax de hembras de *Aedes aegypti*. Se emplearon los sustratos oxidables glutamato, malato, prolina+piruvato, succinato y G3P. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre los sustratos ^{a,b} glutamato y prolina+piruvato para mitocondrias aisladas de pupas ((KW test H: (4, N=39) = 10,21238 p=0,0370), ^{c,d} glutamato y malato para mitocondrias aisladas de tórax (KW test H: (4, N=44) = 16,43407 p=0,0001325).....68

Tabla 2 - Coeficiente de Control Respiratorio (CCR: Respiración estado 3 / Respiración estado 4 inducido con oligomicina) de individuos permeabilizados de larvas L4, pupas y tórax de hembras de *Aedes aegypti*. Se emplearon los sustratos oxidables glutamato, malato, prolina+piruvato, succinato y G3P. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas para: ^{a,b} 1 larva entre sustratos (Tukey test F= 3,043, df=4, p≤0,05); 5 larvas entre sustratos ^{a,b} (KW test H: (4, N=36) = 20,24180 p≤0,05; ^{c,d} 5 larvas entre sustratos (KW test H: (4, N=36) = 20,24180 p≤0,05); ^{e,f,g} 1pupa entre sustratos (ANOVA: F=10,381, df=4, p≤0,05); ^{h,i} 5 pupas entre sustratos (ANOVA: F= 8,308, df=4, p≤0,05); ^{j,k} 5 tórax entre sustratos (KW test H: (4, N=38) = 17,59287 p≤0,05).....92

Tabla 3 - Capacidad bioenergética (OXPHOS) de mitocondrias aisladas y 5 individuos permeabilizados de larvas L4, pupas y tórax de hembras de *Aedes aegypti* con los sustratos oxidables glutamato, malato, prolina+piruvato, succinato y G3P.....104

CAPITULO II

Tabla 1 -Caracterización de las proteínas mitocondriales de larvas de *Ae. aegypti* obtenidas de los geles 2D. Spot: Número asignado a cada spot en el gel master; Protein score: Valor que indica la probabilidad de acierto en la identificación de la proteína al ser cotejada con una base de datos; Masa experimental: Masa de cada proteína estimada directamente en la imagen del gel; Masa teórica: Masa de cada proteína calculada en el programa MASCOT.....165

Tabla 2 - Caracterización de las proteínas mitocondriales de pupas de *Ae. aegypti* obtenidas de los geles 2D. Spot: Número asignado a cada spot en el gel master; Protein score: Valor que indica la probabilidad de acierto en la identificación de la proteína al ser cotejada con una base de datos; Masa experimental: Masa de cada proteína estimada directamente en la imagen del gel; Masa teórica: Masa de cada proteína calculada en el programa MASCOT.....169

Tabla 3 - Caracterización de las proteínas mitocondriales de adultos de *Ae. aegypti* obtenidas de los geles 2D. Spot: Número asignado a cada spot en el gel master; Protein score: Valor que indica la probabilidad de acierto en la identificación de la proteína al ser cotejada con una base de datos; Masa experimental: Masa de cada proteína estimada directamente

en la imagen del gel; Masa teórica: Masa de cada proteína calculada en el programa MASCOT.....173

Tabla 4 -Identificación de proteínas de larvas, pupas y adultos de *Ae. aegypti* obtenidas de los geles 2D. Protein score: Valor que indica la posibilidad de que los péptidos de una muestra coincidan con los de la base de datos de proteínas; Valor E (Expectation value): Valor que indica el número de veces que se espera obtener un score igual o superior aleatoriamente. Cuanto menor sea este valor, más significativo será el resultado. Valores cercanos a 0,05 indican un mayor valor de coincidencia en el programa MASCOT.....176

Tabla 5 -Valores de expresión normalizada de proteínas mitocondriales de larvas, pupas y adultos de *Ae. aegypti* obtenidas de los geles 2D.....183

Tabla 6 -Valores de contribución de las variables (expresión génica) a cada factor calculado en cada fase de desarrollo de *Ae. aegypti*.....192

Tabla 7 -Comparación de la expresión de proteínas obtenidas en los geles 2D con la expresión del transcriptoma mitocondrial de larvas, pupas y adultos de *Ae. aegypti*.....195

Tabla 8 -Valores de contribución de las variables (expresión génica) a cada factor calculado del transcriptoma mitocondrial correspondiente a las proteínas obtenidas en los geles 2D de Larvas (L3-L4), pupas (machos y hembras) y adultos (machos y hembras) de *Ae. aegypti*.....199

Lista de Figuras

CAPITULO I

- Figura 1** -Consumo de oxígeno (pmol/(seg*mL)) de mitocondrias aisladas de larvas L4 de *Aedes aegypti* obtenidas de dos protocolos de aislamiento Gonçalves *et al.* (2009) (Protocolo A) y Borrero *et al.* (2018) (Protocolo B), para los estados respiratorios estado 3, estado 4, estado 4 Inducido con Oligomicina y respiración en presencia de FCCP. Se emplearon los sustratos oxidables glutamato (5mM), prolina (10 mM) + piruvato (10 mM) y succinato (3mM). Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre ^{a,b} para el estado 3 y estado 4 (Mann-Whitney U Test: H (2, N = 15) $p \leq 0,05$).....52
- Figura 2** - Coeficiente de Control Respiratorio (CCR: Respiración estado 3 / Respiración estado 4) y CCR inducido (Respiración estado 3 / Respiración estado 4 inducida con Oligomicina) de mitocondrias aisladas de larvas L4 de *Aedes aegypti* obtenidas de dos protocolos de aislamiento: Gonçalves *et al.* (2009) (Protocolo A) y Borrero *et al.* (2018) (Protocolo B). Se emplearon los sustratos oxidables glutamato, prolina+piruvato y succinato.....54
- Figura 3** -Consumo de oxígeno (pmol/(seg*mL)) de mitocondrias aisladas de larvas L4 de *Aedes aegypti* para los estados respiratorios estado 3, estado 4, estado 4 Inducido con oligomicina y respiración en presencia de FCCP (mitocondrias desacopladas). Se emplearon los sustratos oxidables glutamato, malato, prolina+piruvato, succinato y G3P. Símbolos diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre *

Sustratos oxidables para estado 3 (KW test H: (4, N=72) =54,766580 $p \leq 0,05$).
 **Sustratos oxidables para estado 4 (KW test H: (4, N=72) =56,11636 $p \leq 0,05$). Δ
 Sustratos oxidables para estado 4 inducido (KW test H: (4, N=72) =44,54037 $p \leq 0,05$).
 \square Sustratos oxidables en presencia de FCCP (KW test H: (4, N=72) =16,15322
 $p \leq 0,05$).59

Figura 4 -Consumo de oxígeno (pmol/(seg*mL)) de mitocondrias aisladas de pupas de *Aedes aegypti* para los estados respiratorios estado 3, estado 4, estado 4 Inducido con oligomicina y respiración en presencia de FCCP (mitocondrias desacopladas). Se emplearon los sustratos oxidables glutamato, malato, prolina+piruvato, succinato y G3P. Símbolos diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre *, **
 Sustratos oxidables para estado 3 (KW test H: (4, N=39) =32,76122 $p \leq 0,05$). Δ , $\Delta\Delta$
 Sustratos oxidables para estado 4 (KW test H: (4, N=39) =31,85306 $p \leq 0,05$). \square , $\square\square$
 Sustratos oxidables para estado 4 inducido (KW test H: (4, N=39) = 27,6700 $p \leq 0,05$).
 \circ , $\circ\circ$ Sustratos oxidables para estado en presencia de FCCP (KW test H: (4, N=39) = 24,77551 $p \leq 0,05$).60

Figura 5 -Consumo de oxígeno (pmol/(seg*mL)) de mitocondrias aisladas de tórax de hembras de *Aedes aegypti* para los estados respiratorios estado 3, estado 4, estado 4 Inducido con oligomicina y respiración en presencia de FCCP (mitocondrias desacopladas). Se emplearon los sustratos oxidables glutamato, malato, prolina+piruvato, succinato y G3P. Símbolos diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre *, **
 Sustratos oxidables para estado 3 (KW test H: (4, N=44) =37,65303 $p \leq 0,05$). Δ , $\Delta\Delta$
 Sustratos oxidables para estado 4 (KW test H: (4, N=39) = 36,27515 $p \leq 0,05$). \square , $\square\square$
 Sustratos oxidables para estado 4 inducido (KW test H: (4, N=39) = 35,52607 $p \leq 0,05$).

^o, ^{oo} Sustratos oxidables en presencia de FCCP (KW test H: (4, N=39) = 25,89530 p≤0,05).....62

Figura 6 -Consumo de oxígeno (pmol/(seg*mL)) en estado 3 de mitocondrias aisladas de larvas, pupas y tórax de hembras de *Aedes aegypti* para los sustratos oxidables glutamato, malato, prolina+piruvato, succinato y G3P. *, **, *** Diferencias estadísticas significativas entre larvas, pupas y adultos para cada sustrato oxidable evaluado: glutamato (Tukey test F=49,1980, df=2, p≤ 0,005); malato (Tukey test F=40,7381, df=2, p≤ 0,005); prolina+piruvato (Tukey test F=58,5959, df=2, p≤0,05); succinato (Tukey test F=61,629, df=2, p≤0,05) y G3P (Tukey test F=14,2520, df=2, p≤0,05).....63

Figura 7 -Histogramas de intensidad de fluorescencia emitida por el colorante Rhodamina 123 en mitocondrias aisladas de larvas L4 de *Aedes aegypti* empleando el protocolo de Castillo-Morales *et al.* (2019), en presencia de diferentes moduladores del potencial eléctrico mitocondrial. A. Histograma consolidado de las fluorescencias obtenidas en las suspensiones mitocondriales control (mitocondrias aisladas – línea negra- y mitocondrias incubadas con Rh 123-línea roja-) vs. las suspensiones tratamiento (Curvas color azul, violeta, verde y amarilla). B. Histogramas individuales de cada suspensión mitocondrial evaluada.....66

Figura 8 - Consumo de oxígeno en mitocondrias aisladas de larvas L4 de *Ae. aegypti* empleando glutamato y succinato como sustrato con adición de Citocromo c (10 μM). La línea azul representa la concentración de oxígeno en el medio. La línea roja representa el flujo de oxígeno en pmol/(seg*mL).....70

Figura 9 - Consumo de oxígeno (pmol/(seg*mL)) de 1 larva permeabilizada en estadio L4 de *Aedes aegypti* para los estados respiratorios estado 3, estado 4, estado 4 Inducido con oligomicina y respiración en presencia de FCCP (mitocondrias desacopladas). Se emplearon los sustratos oxidables glutamato, malato, prolina+piruvato, succinato y G3P. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre ^{a,b,c} Sustratos oxidables para estado 3 (Tukey test F= 5,508, df=4, p≤0,05). ^{d,e} Sustratos oxidables para estado 4 (ANOVA: F= 2,776, df=4, p≤0,05). ^{f,g,h} Sustratos oxidables para respiración en presencia de FCCP (ANOVA: F= 5,823, df=4, p≤0,05).....72

Figura 10 - Consumo de oxígeno (pmol/(seg*mL)) de 5 larvas permeabilizada en estadio L4 de *Aedes aegypti* para los estados respiratorios estado 3, estado 4, estado 4 Inducido con oligomicina y respiración en presencia de FCCP (mitocondrias desacopladas). Se emplearon los sustratos oxidables glutamato, malato, prolina+piruvato, succinato y G3P. Símbolos diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre *, ** Sustratos oxidables para estado 3 (ANOVA: F= 59,41, df=4, p≤0,05). Δ, ΔΔ Sustratos oxidables para estado 4 (ANOVA: F= 79,77, df=4, p≤0,05). □, □□ Sustratos oxidables para estado 4 inducido (ANOVA: F= 9,93, df=4, p≤0,05). °, °° Sustratos oxidables para la respiración en presencia de FCCP (ANOVA: F= 31,328, df=4, p≤0,05).....75

Figura 11 - Comparación del consumo de oxígeno (pmol/(seg*mL)) de larvas permeabilizadas en estadio L4 de *Aedes aegypti* para los estados respiratorios estado 3, estado 4, estado 4 Inducido con Oligomicina y respiración en presencia de FCCP (mitocondrias desacopladas), usando succinato y glutamato como sustratos oxidables. * Diferencias

estadísticas significativas entre 1 y 5 larvas con el sustrato glutamato y succinato para cada estado respiratorio evaluado (Mann-Whitney U Test $p \leq 0,05$)76

Figura 12 - Consumo de oxígeno (pmol/(seg*mL)) de 1 pupa permeabilizada de *Aedes aegypti* para los estados respiratorios estado 3, estado 4, estado 4 Inducido con oligomicina y respiración en presencia de FCCP (mitocondrias desacopladas). Se emplearon los sustratos oxidables glutamato, malato, prolina+piruvato, succinato y G3P. Símbolos diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre *, ** Sustratos oxidables para estado 3 (KW test: H (4, N = 48) $p \leq 0,05$). Δ , $\Delta\Delta$ Sustratos oxidables para estado 4 (KW test: H (4, N = 48) $p \leq 0,05$). \square , $\square\square$ Sustratos oxidables para estado 4 inducido (KW test: H (4, N = 48) $p \leq 0,05$). $^{\circ}$, $^{\circ\circ}$ Sustratos oxidables para respiración en presencia de FCCP (KW test: H (4, N = 48) $p \leq 0,05$).....78

Figura 13 - Consumo de oxígeno (pmol/(seg*mL)) de 5 pupas permeabilizadas de *Aedes aegypti* para los estados respiratorios estado 3, estado 4, estado 4 Inducido con oligomicina y respiración en presencia de FCCP (mitocondrias desacopladas). Se emplearon los sustratos oxidables glutamato, malato, prolina+piruvato, succinato y G3P. Símbolos diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre * Sustratos oxidables para estado 3 (KW test: H (4, N = 32) $p \leq 0,05$). Δ Sustratos oxidables para estado 4 (KW test: H (4, N = 32) $p \leq 0,05$). \square Sustratos oxidables para estado 4 inducido (KW test: H (4, N = 31) $p \leq 0,05$). $^{\circ}$, $^{\circ\circ}$ Sustratos oxidables en presencia de FCCP (KW test: H (4, N = 31) $p \leq 0,05$).....80

Figura 14 - Comparación del consumo de oxígeno (pmol/(seg*mL)) de pupas permeabilizadas de *Aedes aegypti* para los estados respiratorios estado 3, estado 4, estado 4 Inducido con oligomicina y respiración en presencia de FCCP (mitocondrias desacopladas), usando

prolina+piruvato y succinato como sustratos oxidables. * Diferencias estadísticas significativas entre 1 y 5 larvas con el sustrato prolina+piruvato y succinato para cada estado respiratorio evaluado (Mann-Whitney U Test $p \leq 0,05$).....82

Figura 15 - Consumo de oxígeno (pmol/(seg*mL)) de 1 tórax permeabilizado de *Aedes aegypti* para los estados respiratorios estado 3, estado 4, estado 4 Inducido con oligomicina y respiración en presencia de FCCP (mitocondrias desacopladas). Se emplearon los sustratos oxidables glutamato, malato, prolina+piruvato, succinato y G3P. Símbolos diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre * Sustratos oxidables para estado 3 (KW test: H (4, N = 45) $p \leq 0,05$). Δ Sustratos oxidables para estado 4 (KW test: H (4, N = 45) $p \leq 0,05$). \square Sustratos oxidables para estado 4 inducido (KW test: H (4, N = 45) $p \leq 0,05$). \circ Sustratos oxidables para respiración en presencia de FCCP (KW test: H (4, N = 43) $p \leq 0,05$).....84

Figura 16 - Consumo de oxígeno (pmol/(seg*mL)) de 5 tórax permeabilizados de *Aedes aegypti* para los estados respiratorios estado 3, estado 4, estado 4 Inducido con oligomicina y respiración en presencia de FCCP (mitocondrias desacopladas). Se emplearon los sustratos oxidables glutamato, malato, prolina+piruvato, succinato y G3P. Símbolos diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre * Sustratos oxidables para estado 3 (KW test: H (4, N = 38) $p \leq 0,05$). Δ Sustratos oxidables para estado 4 (KW test: H (4, N = 38) $p \leq 0,05$). \square Sustratos oxidables para estado 4 inducido (KW test: H (4, N = 38) $p \leq 0,05$). \circ Sustratos oxidables para respiración en presencia de FCCP (KW test: H (4, N = 37) $p \leq 0,05$).....86

Figura 17 - Comparación del consumo de oxígeno (pmol/(seg*mL)) de tórax permeabilizados de *Aedes aegypti* para los estados respiratorios estado 3, estado 4, estado 4 inducido con

oligomicina y respiración en presencia de FCCP (mitocondrias desacopladas), usando succinato y G3P como sustratos oxidables. * Diferencias estadísticas significativas entre 1 y 5 larvas con el sustrato succinato y G3P para cada estado respiratorio evaluado (Mann-Whitney U Test $p \leq 0,05$).....87

Figura 18 - Comparación del consumo de oxígeno ($\text{pmol}/(\text{seg} \cdot \text{mL})$) en estado 3 de individuos permeabilizados de larvas, pupas y tórax de hembras de *Aedes aegypti* para los sustratos oxidables glutamato, malato, prolina+piruvato, succinato y G3P. a. Un individuo permeabilizado. *Diferencias estadísticas significativas entre larvas, pupas y adultos para cada sustrato oxidable evaluado: glutamato (KW test H: (2, N=29) =19,11232 $p \leq 0,005$); malato (ANOVA: F=56,022, df=2, $p \leq 0,005$); prolina+piruvato (KW test H: (2, N=28) =22,91690 $p \leq 0,05$); succinato (ANOVA: F=27,266, df=2, $p \leq 0,05$) y G3P (ANOVA: F=8,2923, df=2, $p \leq 0,05$). b. Cinco individuos permeabilizados. *Diferencias estadísticas significativas entre larvas, pupas y adultos para cada sustrato oxidable evaluado: glutamato (KW test H: (2, N=22) =14,76920 $p \leq 0,005$); malato (KW test H: (2, N=23) =19,21739 $p \leq 0,005$); prolina+piruvato (KW test H: (2, N=23) =19,47826 $p \leq 0,05$); succinato (ANOVA: F=27,266, df=2, $p \leq 0,05$) y G3P (KW test H: (2, N=19) =12,32556 $p \leq 0,05$).....89

Figura 19 - Grafica de consumo de oxígeno en 5 tórax permeabilizados de adultos de *Ae. aegypti* empleando succinato como sustrato. La línea azul representa la concentración de oxígeno en el medio. La línea roja representa el flujo de oxígeno en $\text{pmol}/(\text{seg} \cdot \text{mL})$94

Figura 20 - Comparación de consumo de oxígeno ($\text{pmol}/(\text{seg} \cdot \text{mL})$) para mitocondrias aisladas de larvas L4 y 1 – 5 larvas permeabilizadas de *Aedes aegypti* para los estados respiratorios

estado 3, estado 4, estado 4 Inducido con oligomicina y respiración en presencia de FCCP (mitocondrias desacopladas), usando glutamato y succinato como sustratos oxidables. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre mitocondrias aisladas e individuos permeabilizados (1 y 5) para a. Sustrato glutamato ^{a,b} estado 3 (MW-U test: $p \leq 0,05$). ^{c,d} estado 4 (MW-U test: $p \leq 0,05$), ^{e,f} estado 4 inducido (MW-U test: $p \leq 0,05$) ^{g,h} respiración en presencia de FCCP (MW-U test: $p \leq 0,05$). b. Sustrato succinato ^{a,b,c} estado 3 (MW-U test: $p \leq 0,05$), ^{d,e,f} estado 4 (MW-U test: $p \leq 0,05$), ^{g,h,i} estado 4 inducido (MW-U test: $p \leq 0,05$), ^{j,k,l} respiración en presencia de FCCP (MW-U test: $p \leq 0,05$).....95

Figura 21 -Comparación de la velocidad de consumo de oxígeno (pmol/(seg*mL)) para mitocondrias aisladas de pupas y 1 – 5 pupas permeabilizadas de *Aedes aegypti* para los estados respiratorios estado 3, estado 4, estado 4 Inducido con oligomicina y respiración en presencia de FCCP (mitocondrias desacopladas) usando prolina+piruvato y succinato como sustratos oxidables. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre mitocondrias aisladas e individuos permeabilizados (1 y 5) para a. Sustrato prolina+piruvato ^{a,b,c} estado 3 (MW-U test: $p \leq 0,05$). ^{d,e,f} estado 4 (MW-U test: $p \leq 0,05$), ^{g,h,i} estado 4 inducido (MW-U test: $p \leq 0,05$), ^{j,k} respiración en presencia de FCCP (MW-U test: $p \leq 0,05$). b. Sustrato succinato ^{a,b,c} estado 3 (MW-U test: $p \leq 0,05$), ^{d,e} estado 4 (MW-U test: $p \leq 0,05$), ^{f,g,h} estado 4 inducido (MW-U test: $p \leq 0,05$), ^{i,j} respiración en presencia de FCCP (MW-U test: $p \leq 0,05$).....98

Figura 22 - Comparación de la velocidad de consumo de oxígeno (pmol/(seg*mL)) para mitocondrias aisladas de tórax y 1 – 5 tórax permeabilizados de *Aedes aegypti* para los

estados respiratorios estado 3, estado 4, estado 4 Inducido con oligomicina y respiración en presencia de FCCP (mitocondrias desacopladas) usando el sustrato succinato como sustrato oxidable. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre mitocondrias aisladas y tórax permeabilizados (1 y 5) para ^{a,b,c} estado 3 (MW-U test: $p \leq 0,05$). ^{d,e,f} estado 4 (MW-U test: $p \leq 0,05$), ^{g,h,i} estado 4 inducido (MW-U test: $p \leq 0,05$) ^{j,k,l} respiración en presencia de FCCP (MW-U test: $p \leq 0,05$).....99

Figura 23 -Consumo de oxígeno (pmol/(seg*mL)) en estado 2 para mitocondrias aisladas e individuos permeabilizados (5) de Larvas (L4), pupas y hembras adultas (tórax) de *Aedes aegypti*.....100

Figura 24 - Consumo de oxígeno (pmol/(seg*mL)) en estado 3 para mitocondrias aisladas e individuos permeabilizados (5) de Larvas (L4), pupas y hembras adultas (tórax) de *Aedes aegypti* con cada uno de los sustratos oxidables evaluados: glutamato, malato, prolina+piruvato, succinato y G3P.....102

Figura 25 -NADH Ubiquinona reductasa. Actividad de la NADH oxidasa (pmol de O_2 /(seg*mL)*mg de proteína mitocondrial) y de la NADH deshidrogenasa (μ mol de ferrocianato reducido/min*mg de proteína mitocondrial) para mitocondrias aisladas de Larvas L4, pupas y tórax de hembras de *Aedes aegypti*. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre la actividad de las enzimas para cada estadio de desarrollo. a. NADH oxidasa ^{a,b,c} (ANOVA: $F= 433,089$, $df=2$, $p=0,00124$); b. NADH deshidrogenasa ^{a,b,c} (ANOVA: $F= 1954,67$, $df=2$, $p=0,000125$).....105

Figura 26 -Succinato Ubiquinona oxidorreductasa. Actividad de la succinato oxidasa (pmol de O_2 /(seg*mL) *mg de proteína mitocondrial) y de la Succinato deshidrogenasa (μ mol

de DCPIP reducido/min*mg de proteína mitocondrial) para mitocondrias aisladas de Larvas L4, pupas y tórax de hembras de *Aedes aegypti*. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre la actividad de las enzimas para cada estadio de desarrollo. a. Succinato oxidasa ^{a,b,c} (ANOVA: F= 8233,60, df=2, p=0,00120); b. Succinato deshidrogenasa ^{a,b,c} (ANOVA: F= 245,140, df=2, p=0,000127).....107

Figura 27 - Ubiquinona citocromo c oxidorreductasa. Actividad de la NADH Cyt c reductasa y Succinato Cyt c reductasa (μmol de Cyt c reducido/min*mg de proteína mitocondrial) para mitocondrias aisladas de Larvas L4, pupas y tórax de hembras de *Aedes aegypti*. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre la actividad de las enzimas para cada estadio de desarrollo. a. NADH Cyt c reductasa ^{a,b} (ANOVA: F= 329,244, df=2, p=0,00168); b. Succinato Cyt c reductasa ^{a,b,c} (ANOVA: F= 59,8782, df=2, p=0,000244).....109

Figura 28 - Citocromo oxidasa. Actividad de la Cyt c oxidasa (μmol de Cyt c reducido/min*mg de proteína mitocondrial) para mitocondrias aisladas de Larvas L4, pupas y tórax de hembras de *Aedes aegypti*. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre la actividad de las enzimas para cada estadio de desarrollo. ^{a,b,c} (ANOVA: F= 52,1293, df=2, p=0,000212).....111

Figura 29 -ATPasa. Actividad de la ATPasa (μmol de fosfato hidrolizado*mg de proteína mitocondrial) para mitocondrias aisladas de Larvas L4, pupas y tórax de hembras de *Aedes aegypti*. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre la

actividad de las enzimas para cada estadio de desarrollo. ^{a,b} (ANOVA: F= 148,872, df=2, p=0,000144).....112

Figura 30 -Comparación de la actividad de la NADH y Succinato oxidasas (pmol de O₂/(seg*mL)*mg de proteína mitocondrial) para mitocondrias aisladas de Larvas L4, pupas y tórax de hembras de *Aedes aegypti*. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre la actividad de las enzimas para cada estadio de desarrollo: ^{a,b} entre larvas (ANOVA: F= 40,257, df=1, p=0,000112), ^{c,d} pupas (Mann-Whitney U Test p=0,000911), y ^{e,f} adultos (Mann-Whitney U Test p=0,008151).....114

CAPITULO II

Figura 1 -Perfil proteico bidimensional de proteínas de mitocondrias de larvas L4 de *Aedes aegypti*. a. Ubicación de los spots identificados en uno de los geles 2D. b. Master gel señalando la ubicación de cada spot (Se muestra uno de los geles que componen el triplicado de cada estadio y el master gel correspondiente).....164

Figura 2 -Perfil proteico bidimensional de proteínas de mitocondrias de pupas L4 de *Aedes aegypti*. a. Ubicación de los spots identificados en uno de los geles 2D. b. Master gel señalando la ubicación de cada spot (Se muestra uno de los geles que componen el triplicado de cada estadio y el master gel correspondiente).....168

Figura 3 - Perfil proteico bidimensional de proteínas de mitocondrias de adulto L4 de *Aedes aegypti*. a. Ubicación de los spots identificados en uno de los geles 2D. b. Master gel

señalando la ubicación de cada spot (Se muestra uno de los geles que componen el triplicado de cada estadio y el master gel correspondiente).....	171
Figura 4 -Asociación de las proteínas identificadas a una ubicación celular para cada uno de los estadios de desarrollo de <i>Ae. aegypti</i> (larva, pupa y adulto).....	181
Figura 5 -Diagramas de Ven mostrando las proteínas coincidentes entre los estadios del ciclo de vida del mosquito <i>Ae. aegypti</i> (larva, pupa y adulto). a. Para el total de proteínas identificadas. b. Para proteínas ubicadas en la mitocondria.....	182
Figura 6 -Heat Map de la expresión diferencial de proteínas mitocondriales de larvas, pupas y adultos de <i>Ae. aegypti</i>	189
Figura 7 -Interactoma de todas las proteínas mitocondriales identificadas de larvas, pupas y adultos de <i>Ae. aegypti</i> obtenido con el software STRING y empleando como organismo de referencia a <i>Ae. aegypti</i>	191
Figura 8 -Análisis de componentes principales (ACP) del transcriptoma mitocondrial de Larvas (L3-L4), pupas (machos y hembras) y adultos (machos y hembras) de <i>Ae. aegypti</i>	194
Figura 9 -Heat Map de la expresión génica diferencial de proteínas mitocondriales a lo largo del ciclo de vida de <i>Ae. aegypti</i> : larvas (L3, L4), pupas (hembra y macho), macho adulto y hembra adulta no alimentada con sangre.....	198
Figura 10 -Análisis de componentes principales (ACP) del transcriptoma mitocondrial correspondiente a las proteínas obtenidas en los geles 2D de Larvas (L3-L4), pupas	

PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Ae. aegypti*

(machos y hembras) y adultos (machos y hembras) de *Ae. aegypti*.....200

Figura 11 -Resumen grafico de las proteínas que presentaron un aumento progresivo a lo largo del ciclo de vida de *Ae. aegypti* (Imagen creada con BioRender.com).....203

CONSIDERACIONES ÉTICAS

Figura 1 - Etiqueta Residuos Infecciosos, Riesgo Biológico y biosanitarios.....236

Figura 2 - Etiqueta Residuos Químicos236

Lista de Apéndices

CAPITULO II

Apéndice A. -Espectro de masas correspondiente a proteínas mitocondriales de larva L3-L4 de *Ae. aegypti*.....225

Apéndice B. Espectro de masas correspondiente a proteínas mitocondriales de pupa de *Ae. aegypti*.....226

Apéndice C. -Espectro de masas correspondiente a proteínas mitocondriales de adulto de *Ae. aegypti*.....227

Resumen

Título: Proteoma funcional mitocondrial de *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 (Diptera: Culicidae)*

Autor: Ruth Mariela Castillo Morales **

Palabras clave: Consumo de oxígeno, tejido permeabilizado, succinato, complejo II, proteínas de biosíntesis, producción de ATP.

Descripción:

Aedes aegypti (Linnaeus, 1762) es el principal transmisor de diferentes arbovirosis como dengue, zika y chikungunya. Entre los *target* fisiológicos de mayor interés para el control de esta especie se encuentra la mitocondria debido a su papel en el funcionamiento celular. Sin embargo, es poco lo que se conoce sobre la expresión del proteoma mitocondrial a lo largo del desarrollo del ciclo de vida del zancudo y su relación con la bioenergética de la cadena respiratoria. El capítulo I tiene como objetivo analizar la bioenergética mitocondrial de las fases de larva, pupa y adulto de *Ae. aegypti* mediante la determinación de los valores de consumo de oxígeno con el suministro de sustratos oxidables (glutamato, malato, prolina + piruvato, succinato y glicerol 3-fosfato). El capítulo II analiza el proteoma mitocondrial de las fases de larva, pupa y adulto de *Ae. aegypti* mediante identificación y caracterización de proteínas (2D PAGE) y su posterior confirmación mediante RNAseq y análisis bioinformáticos. Los valores de función mitocondrial se cuantificaron en mitocondrias aisladas y tejido permeabilizado. La medición *in situ* con 5 individuos permeabilizados fue más eficiente, con valores más altos de consumo de oxígeno con el sustrato succinato en todas las fases de desarrollo. En la expresión proteica, en larvas se observó un aumento en la expresión de proteínas relacionadas con la biosíntesis de tejidos, activación

PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Ae. aegypti*

metabólica y protección frente al daño oxidativo. Las pupas presentaron una mayor actividad en proteínas de síntesis y degradación de tejidos. En adultos se observó un aumento en la producción de ATP, relacionado con la alta demanda energética. Los patrones de expresión génica son concordantes con los valores de respiración mitocondrial, en respuesta a requerimientos fisiológicos y metabólicos propios de cada fase. La acción de factores externos influye en el funcionamiento de la cadena respiratoria mitocondrial, donde la acción de diferentes proteínas contrarresta potenciales condiciones de estrés y aumento de especies reactivas de oxígeno.

* Trabajo de Grado

** Facultad de Salud. Escuela de Medicina. Doctorado en Ciencias Biomédicas. Director: Jonny E. Duque Luna PhD. Director: Stelia Carolina Méndez. PhD.

Abstract

Title: Functional mitochondrial proteome of *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 (Diptera: Culicidae) *

Author: Ruth Mariela Castillo Morales **

Keywords: Oxygen consumption, permeabilized tissue, succinate, complex II, biosynthesis proteins, ATP production

Description:

Aedes aegypti (Linnaeus, 1762) is the main transmitter of different arboviruses such as dengue, Zika and chikungunya. Among the physiological targets of greatest interest for the control of this species is the mitochondria due to its role in cellular functioning. However, little is known about the expression of the mitochondrial proteome throughout the development of the mosquito life cycle and its relationship with the bioenergetics of the respiratory chain. Chapter I aims to analyze the mitochondrial bioenergetics of the larva, pupa, and adult phases of *Ae. aegypti* by determining oxygen consumption values with the supply of oxidizable substrates (glutamate, malate, proline + pyruvate, succinate and glycerol 3-phosphate). Chapter II analyzes the mitochondrial proteome of the larva, pupa, and adult stages of *Ae. aegypti* by protein identification and characterization (2D PAGE) and its subsequent confirmation by RNAseq and bioinformatic analysis. Mitochondrial function values were quantified in isolated mitochondria and permeabilized tissue. The *in situ* measurement with 5 permeabilized individuals was more efficient, with higher values of oxygen consumption with the succinate substrate in all development phases. In protein expression, an increase in the expression of proteins related to tissue biosynthesis, metabolic activation and protection against oxidative damage was observed in

PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Ae. aegypti*

larvae. Pupae presented greater activity in tissue synthesis and degradation proteins. In adults, an increase in ATP production was observed, related to high energy demand. The gene expression patterns are consistent with the mitochondrial respiration values, in response to the physiological and metabolic requirements of each phase. The action of external factors influences the functioning of the mitochondrial respiratory chain, where the action of different proteins counteracts potential stress conditions and increases in reactive oxygen species.

* Degree Work

** Faculty of Health. Medicine School. Doctorate in Biomedical Sciences. Director: Jonny E. Duque Luna PhD. Director: Stelia Carolina Méndez. PhD.

Introducción General

Aedes aegypti (Linnaeus, 1762) es una especie de zancudo originaria de África, la cual se desplazó hasta el Nuevo Mundo en los barcos de comercio de esclavos entre los siglos XV y XVIII. Una vez se estableció poblacionalmente en las zonas costeras de las Américas, se dispersó rápidamente hacia el interior del continente (Bruzzone & Utgés, 2022; Ruiz-López *et al.*, 2016). Debido a que presenta hábitos urbanos y antropofílicos, esta especie se ha establecido como el principal vector de los arbovirus del dengue (DENV 1-4) (Bhatt *et al.*, 2013; Bruzzone & Utgés, 2022; Castrillón *et al.*, 2014; Rodríguez Cruz, 2002) y de los alfavirus del chikungunya (CHIKV) y Zika (ZIKV). La transmisión de los virus causantes de estas enfermedades representa un tema de importancia en salud pública internacional debido al número de casos reportados anualmente y a que no existe vacuna para estas patologías (Bruzzone & Utgés, 2022; Rodríguez-Morales, 2015a, 2015b; Weaver & Lecuit, 2015).

Hasta la fecha, se han venido implementando un rango de intervenciones de control cultural, físicas y químicas como estrategias integradas para la disminución poblacional del vector. Sin embargo, no se ha documentado cuál es el nivel de éxito de estas acciones en la prevención de epidemias. Esta problemática se suma al incremento de resistencia a los productos de origen sintético empleados, la contaminación generada en el medio ambiente y los impactos en la salud humana (Achee *et al.*, 2019; Gesto *et al.*, 2021; Shaalan & Canyon, 2018).

Considerando la problemática con los productos de origen sintético, recientemente se ha estimulado la búsqueda de nuevas opciones de control adaptadas a contextos locales (estrategias focalizadas), y que sean eficientes en la disminución poblacional del vector y seguras para el medio

ambiente. El desarrollo de nuevas técnicas moleculares y bioquímicas de los últimos 20 años ha permitido describir nuevos *targets* y modos de acción, los cuales mitigarían la generación de poblaciones resistentes a las moléculas sintéticas empleadas, así como el uso de formulaciones que potencien el efecto insecticida y/o repelente de productos sintéticos. Adicionalmente, como parte de estos nuevos enfoques de control, se encuentra el descubrimiento, desarrollo y uso de moléculas de origen natural, las cuales poseen *targets* poco explorados, como la mitocondria.

Al interior de las células de los insectos se encuentra la mitocondria, que en los últimos años se ha constituido como una organela *target* de interés en la formulación de insecticidas para el control de especies de importancia en salud pública, debido a que desempeña funciones vitales para la célula como la generación de ATP a través de la fosforilación oxidativa, síntesis de moléculas clave en el metabolismo celular, participación en los procesos de inducción de muerte celular y regulación de diferentes vías metabólicas (Lubawy *et al.*, 2022; Pérez, 2013). Adicionalmente, el estudio de su funcionamiento bajo diferentes condiciones contribuye a la comprensión de diferentes aspectos del metabolismo celular, el impacto de la dinámica mitocondrial (fusión y fisión) en su funcionamiento y la descripción de nuevas dianas de acción que potencialicen el control poblacional de especies de importancia en salud pública (Bajda *et al.*, 2017; Bolter & Chefurka, 1990; Colinet *et al.*, 2017; Giulivi *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2008). Considerando que la evaluación de la función mitocondrial contribuye a comprender cómo diferentes condiciones biológicas alteran su funcionamiento, en el capítulo I de esta tesis se describen los valores de función mitocondrial, así como la actividad enzimática de mitocondrias aisladas y de tejido permeabilizado de *Ae. aegypti* en diferentes fases de desarrollo (larva, pupa y adulto) mediante el suministro de diferentes sustratos oxidables (glutamato, malato, prolina + piruvato, succinato y glicerol 3-fosfato).

Considerando que la mitocondria es una organela vital para la célula y que posee características únicas como poseer su propio ADN y su propia maquinaria de transcripción-traducción (Mansour *et al.*, 2012; Moncada, 2010), vale la pena mencionar que es poco lo que se conoce sobre la expresión de su proteoma a lo largo del desarrollo del ciclo de vida del mosquito y su relación con la bioenergética de la cadena de fosforilación oxidativa. Por ello, en el capítulo II se identifica y caracteriza la expresión génica mitocondrial de diferentes fases de desarrollo de *Ae. aegypti*, buscando proteínas diferencialmente expresadas mediante ARNseq y que se encuentren implicadas en funciones metabólicas propias de cada fase.

Los resultados derivados del capítulo I pretenden servir como parámetros base del funcionamiento de la cadena respiratoria mitocondrial en *Ae. aegypti*, especialmente al compararlos con los valores obtenidos de la evaluación como insecticidas de moléculas de origen sintético o natural a lo largo de las diferentes fases de desarrollo del zancudo. En relación con los resultados del capítulo II, la identificación de proteínas específicas para el desarrollo normal en cada una de las fases de vida de *Ae. aegypti* es útil en el estudio de nuevas alternativas de control vectorial relacionadas con la alteración de la fisiología normal del zancudo. Estas nuevas alternativas se enfocan en la aplicación de técnicas de ingeniería genética, las cuales se podrían emplear para la modificación de secuencias génicas y la alteración de la expresión de proteínas específicas relacionadas con procesos metabólicos y de función mitocondrial.

Bibliografía Citada

- Achee, N. L., Grieco, J. P., Vatandoost, H., Seixas, G., Pinto, J., Ching-Ng, L., Martins, A. J., Juntarajumnong, W., Corbel, V., Gouagna, C., David, J.-P., Logan, J. G., Orsborne, J., Marois, E., Devine, G. J., & Vontas, J. (2019). Alternative strategies for mosquito-borne arbovirus control. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *13*(1), e0006822. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006822>
- Bajda, S., Dermauw, W., Panteleri, R., Sugimoto, N., Douris, V., Tirry, L., Osakabe, M., Vontas, J., & Van Leeuwen, T. (2017). A mutation in the PSST homologue of complex I (NADH : ubiquinone oxidoreductase) from *Tetranychus urticae* is associated with resistance to METI acaricides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *80*(2017), 79–90. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2016.11.010>
- Bhatt, S., Gething, P., Brady, O., Messina, J., Farlow, A., Moyes, C., Drake, J., Brownstein, J., Hoen, A., Sankoh, O., Myers, M., George, D., Jaenisch, T., Wint, W., Simmons, C., Scott, T., Farrar, J., & Hay, S. (2013). The global distribution and burden of dengue. *Nature*, *496*((7446)), 504–507. <https://doi.org/10.1038/nature12060>
- Bolter, C. J., & Chefurka, W. (1990). Extramitochondrial release of hydrogen peroxide from insect and mouse liver mitochondria using the respiratory inhibitors phosphine, myxothiazol, and antimycin and spectral analysis of inhibited cytochromes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *278*(1), 65–72. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(90\)90232-N](https://doi.org/10.1016/0003-9861(90)90232-N)
- Bruzzzone, O. A., & Utgés, M. E. (2022). Analysis of the invasion of a city by *Aedes aegypti* via mathematical models and Bayesian statistics. *Theoretical Ecology*, *15*(1), 65–80. <https://doi.org/10.1007/s12080-022-00528-y>

- Castrillón, J., Carlos, J., & Urcuqui, S. (2014). Dengue en Colombia, diez años de evolución. *Revista Chilena de Infectología*, 32((2)), 22–29. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182015000300002>
- Colinet, H., Renault, D., & Roussel, D. (2017). Cold acclimation allows *Drosophila* flies to maintain mitochondrial functioning under cold stress. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 80, 52–60. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2016.11.007>
- Gesto, J. S. M., Pinto, S. B., Dias, F. B. S., Peixoto, J., Costa, G., Kutcher, S., Montgomery, J., Green, B. R., Anders, K. L., Ryan, P. A., Simmons, C. P., O’Neill, S. L., & Moreira, L. A. (2021). Large-Scale Deployment and Establishment of *Wolbachia* Into the *Aedes aegypti* Population in Rio de Janeiro, Brazil. *Frontiers in Microbiology*, 12, 711107. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.711107>
- Giulivi, C., Ross-Inta, C., Horton, A. A., & Luckhart, S. (2008). Metabolic pathways in *Anopheles stephensi* mitochondria. *Biochemical Journal*, 415(2), 309–316. <https://doi.org/10.1042/BJ20080973>
- Hu, J., Liang, P., Shi, X., & Gao, X. (2008). Effects of insecticides on the fluidity of mitochondrial membranes of the diamondback moth, *Plutella xylostella*, resistant and susceptible to avermectin. *Journal of Insect Science*, 8, 3. <https://doi.org/10.1673/031.008.0301>
- Lubawy, J., Chowański, S., Adamski, Z., & Słocińska, M. (2022). Mitochondria as a target and central hub of energy division during cold stress in insects. *Frontiers in Zoology*, 19(1), 1. <https://doi.org/10.1186/s12983-021-00448-3>
- Mansour, E. E., Mi, F., Zhang, G., Jiugao, X., Wang, Y., & Kargbo, A. (2012). Effect of allylisothiocyanate on *Sitophilus oryzae*, *Tribolium confusum* and *Plodia interpunctella*: Toxicity and effect on insect mitochondria. *Crop Protection*, 33, 40–51.

PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Ae. aegypti*

<https://doi.org/10.1016/j.cropro.2011.11.010>

Moncada, S. (2010). Mitochondria as pharmacological targets. *British Journal of Pharmacology*, *160*(2), 217–219. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00706.x>

Perez, A. (2013). *Cadena de transporte de electrones mitocondrial, una nueva visión* (Colegio of, p. 48). Cometa, S.A. <http://www.academiadefarmaciadearagon.es/docs/Documentos/Documento52.pdf>

Rodríguez Cruz, R. (2002). Estrategias para el control del dengue y del *Aedes aegypti* en las Américas. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602002000300004

Rodríguez-Morales, A. (2015a). Aedes: un eficiente vector de viejos y nuevos arbovirus (dengue, chikungunya y zika) en las Américas. *Rev. Cuerpo Med.*, *8*(2), 50–52.

Rodriguez-Morales, A. (2015b). No era suficiente con dengue y Chikugunya: llegó también Zika. *iMedPub Journals*, *11*(2-3), 1–4. <https://doi.org/10.3823/1245>

Ruiz-López, F., González-Mazo, A., Vélez-Mira, A., Gómez, G. F., Zuleta, L., Uribe, S., & Vélez-Bernal, I. D. (2016). Presencia de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) y su infección natural con el virus dengue en alturas no registradas para Colombia. *Biomedica: Revista Del Instituto Nacional de Salud*, *36*((2)), 303–308. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v36i2.3301>

Shalan, E. A.-S., & Canyon, D. V. (2018). Mosquito oviposition deterrents. *Environmental Science and Pollution Research International*, *25*(11), 10207–10217. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0408-1>

Weaver, S., & Lecuit, M. (2015). Chikungunya Virus and the Global Spread of a Mosquito-Borne Disease. *The New England Journal of Medicine*, *372*, 1231–1239. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1406035>

1. CAPITULO I

VALORES DE FUNCIÓN MITOCONDRIAL DE *Aedes aegypti*

1.1 INTRODUCCIÓN

La mitocondria es un organelo subcelular esencial para las células eucariotas al sintetizar ATP a través de la fosforilación oxidativa, participar activamente en la señalización celular y sintetizar moléculas clave en el funcionamiento de la célula (Picard *et al.*, 2016). En cuanto a los parámetros morfológicos, el tamaño y forma de las mitocondrias no es estable, inclusive, tienen la capacidad de dividirse y fusionarse acorde a diferentes estados fisiológicos de desarrollo, requerimientos energéticos de la célula y en respuesta a estímulos externos (Giacomello *et al.*, 2020; Palmer *et al.*, 2011; Popkov *et al.*, 2016).

Una de las principales funciones de la mitocondria se relaciona con su habilidad para usar el oxígeno celular, conocida como la capacidad oxidativa mitocondrial, la cual depende del funcionamiento de la cadena respiratoria mitocondrial (Giacomello *et al.*, 2020). Esta capacidad oxidativa, conocida como respiración mitocondrial, es la base en la maquinaria bioenergética de la fosforilación oxidativa (regulando y siendo regulada por la demanda intrínseca y extrínseca de energía) y su medición brinda datos del comportamiento metabólico mitocondrial en contraste con los diferentes estados de sus componentes moleculares, así como de los niveles de enzimas y metabolitos, estados REDOX y potenciales de membrana (Nicholls *et al.*, 2012). Además de la medición de la respiración mitocondrial, es posible evaluar el efecto de la fosforilación oxidativa a nivel de cambios metabólicos, permeabilidad de membrana o actividad de enzimas individuales, para lo cual es necesaria la medición de la respiración en diferentes estados metabólicos (Giacomello *et al.*, 2020).

La medición de la respiración mitocondrial se puede realizar principalmente mediante dos métodos experimentales. El primer método consiste en el uso del electrodo tipo Clark, que detecta concentraciones de oxígeno polarográficamente en una cámara que contiene la muestra disuelta en una fase líquida o gaseosa. Sin embargo, su sensibilidad, rendimiento y flexibilidad son bajos. El segundo método se basa en la respirometría de alta resolución Oxigrafo-2K (O2k, Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria), con dos cámaras para mediciones en paralelo que permite una mayor rapidez, fidelidad y sensibilidad (Picard *et al.*, 2011).

Otro aspecto importante en la medición de la respiración mitocondrial se relaciona con el origen de las mitocondrias a ser evaluadas. Puede ser medida de manera directa en aislamientos frescos mitocondriales, o de forma indirecta a través de la actividad enzimática de los complejos de la cadena respiratoria de muestras mantenidas a -4°C (Giacomello *et al.*, 2020; Picard & McEwen, 2018). Históricamente se han aislado mitocondrias de una gran variedad de modelos animales empleando protocolos basados en la homogenización de tejidos o células posteriormente sometidos a centrifugación diferencial (Gaviraghi & Oliveira, 2019). Aunque el objetivo de un aislamiento mitocondrial es obtener organelos lo más íntegros y funcionalmente activos posible, es frecuente que aunque se emplee una gran cantidad de muestra, al finalizar el proceso se obtengan bajos porcentajes de mitocondrias, o solo se obtengan mitocondrias fragmentadas o subpoblaciones que afectan su función y dificultan la estimación de sus parámetros funcionales (Frezza *et al.*, 2007; Gaviraghi & Oliveira, 2019).

En relación al estudio de la mitocondria en insectos, esta se ha enfocado principalmente en conocer sus características físico-químicas como punto blanco de acción para diferentes compuestos, con miras a la comprensión de mecanismos de resistencia y a la descripción de la acción de nuevas moléculas (sintéticas o de origen natural) que favorezcan y potencialicen el

control poblacional (Bajda *et al.*, 2017; Bolter & Chefurka, 1990; Colinet *et al.*, 2017; Giulivi *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2008).

Para *Ae. aegypti*, principal vector de los serotipos del virus dengue (Bhatt *et al.*, 2013; Castrillón *et al.*, 2014; Rodríguez Cruz, 2002) y de los alfavirus del chikungunya y Zika (Rodríguez-Morales, 2015a, 2015b; Weaver & Lecuit, 2015), las publicaciones relacionadas con la medición respiratoria mitocondrial describen los efectos de la alimentación sanguínea sobre parámetros funcionales y estructurales de tórax de hembras, la descripción de protocolos que permitan una evaluación más efectiva de los parámetros mitocondriales (Correa *et al.*, 2015; Gaviraghi & Oliveira, 2019; Goncalves *et al.*, 2009) y estudios que buscan entender y describir el mecanismo de acción de compuestos orgánicos (aceites esenciales y extractos de plantas) que actúan directamente sobre el funcionamiento de alguno de los complejos mitocondriales (Borrero *et al.*, 2018; Borrero-Landazabal *et al.*, 2020; Castillo-Morales *et al.*, 2019).

Dado que la evaluación de la función mitocondrial contribuye a comprender el cómo diferentes condiciones biológicas o xenobióticos alteran su funcionamiento (Palmeira & Moreno 2012), en el presente capítulo se describen las posibles diferencias en la respiración mitocondrial y la actividad enzimática de *Ae. aegypti* en diferentes fases de desarrollo (larva, pupa y adulto). La descripción de estos parámetros respiratorios contribuye a comprender los mecanismos fisiológicos y bioquímicos propios de esta especie a lo largo de su ciclo de vida, y que podrían ser usados para el diseño de sustancias de origen sintético, o para mejorar la evaluación de mecanismos de acción de sustancias de origen natural en el marco de la búsqueda de nuevas moléculas para del control de insectos de interés médico.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 General

Analizar la bioenergética mitocondrial de las fases de larva, pupa y adulto de *Ae. aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae).

1.2.2 Específicos

Contrastar el uso de dos protocolos de aislamiento de mitocondrias para *Ae. aegypti* basados en centrifugación diferencial.

Comparar la medición de consumo de oxígeno en mitocondrias aisladas vs tejido permeabilizado para las fases juveniles y adulto de *Ae. aegypti*.

Determinar los valores de consumo de oxígeno mitocondrial mediante el suministro de diferentes sustratos oxidables para las fases juveniles y adulto de *Ae. aegypti*.

1.3 MATERIALES Y MÉTODOS

1.3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

1.3.1.1. Colonia *Aedes aegypti*

Todos los experimentos fueron realizados con una colonia Rockefeller de *Ae. aegypti*, mantenida en jaulas de cría (40×40×40 cm) en insectario a $25 \pm 5^\circ\text{C}$, humedad de $70 \pm 5\%$ y fotoperiodo (12:12). A los individuos de *Ae. aegypti* se les brindó permanentemente una solución azucarada de miel disuelta aproximadamente al 10% (P/v). Cada ocho días, dependiendo de la

necesidad de material biológico, se suministró a las hembras alimentación sanguínea para la obtención de huevos utilizando rata albina (*Rattus norvegicus*) de raza Wistar WI IOPS AF/Han, facilitada por el bioterio de la Universidad Industrial de Santander, cumpliendo las disposiciones de la ley 84 de 1989 del Congreso de Colombia, la aprobación del Comité de ética en investigación Científica de la Universidad Industrial de Santander (CEINCI-UIS) (Acta No. 21 del 23 de noviembre de 2018) y la Resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia. Las larvas de la colonia madre se mantuvieron en bandejas plásticas en un número constante y se alimentaron con concentrado para peces TetraMin Tropical Flakes®.

1.3.2 COMPONENTE EXPERIMENTAL

1.3.2.1. Aislamiento de mitocondrias

Con el fin de seleccionar el protocolo adecuado a emplear en todas las fases de desarrollo, inicialmente se evaluaron los protocolos de aislamiento en larvas en fase L3-L4, propuestos por (Goncalves *et al.*, 2009) y (Borrero *et al.*, 2018) con algunas modificaciones. Posteriormente, el protocolo seleccionado fue empleado para el aislamiento de mitocondrias en las demás fases de desarrollo.

De la colonia se seleccionó un buen número de ejemplares según se trató de individuos juveniles (aproximadamente 2000 larvas L3-L4 y 300 pupas) o adultos (Músculo del vuelo-180 individuos) para su posterior homogenización en un homogenizador Van Potter-Elvehjem.

- *Protocolo* Gonçalves *et al.* (2009)

La homogenización del material biológico en el Van Potter-Elvehjem se realizó en 10 mL de medio de aislamiento a 4°C (Sacarosa 250 mM, Tris-HCl 5mM, EGTA 2mM, 1 % (p/V) de

PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Ae. aegypti*

albúmina de suero bovino (BSA), pH 7,4). La preparación se mantuvo a 4°C a través de los subsiguientes lavados y centrifugaciones. El líquido fue centrifugado a 300 xg por 5 minutos. Se tomó el sobrenadante y se centrifugó a 10.000 xg por 10 minutos. El pellet fue cuidadosamente re-suspendido en aproximadamente 0,1mL de Buffer de respiración (KCl 120 mM, KH₂PO₄ 5mM, HEPES 3mM, MgCl₂ 1 mM, BSA 0,2%, pH 7,2).

-Protocolo Borrero et al. (2018)

La homogenización del material biológico en el Van Potter-Elvehjem se realizó en 10 mL de medio de aislamiento a 4°C (Sacarosa 250 mM, Hepes 10mM, EGTA 1mM, 0,1 % (P/v) de albúmina de suero bovino (BSA), pH 7,4). La preparación se mantuvo a 4°C a través de los subsiguientes lavados y centrifugaciones. El producto obtenido de la homogenización se filtró a través de lana de vidrio con el fin de eliminar restos de quitina y tejido que no pasaron por un proceso adecuado de maceración. Posteriormente se realizó un proceso de centrifugación diferencial, inicialmente a 300 xg por 5 min a 4°C. Este procedimiento se realizó dos veces para limpiar completamente las impurezas de la suspensión. Se tomó el sobrenadante y se descartó el pellet. Se realizó una segunda centrifugación a 8000 xg por 10 min a 4°C. El pellet obtenido se re-suspendió cuidadosamente empleando un pincel de punta fina, realizando movimientos suaves desde el fondo del tubo hacia arriba, o mediante un retro pipeteo suave evitando la formación de burbujas en tampón de aislamiento con BSA. Posteriormente, se centrifugó a 7000 xg por 10min a 4°C. Se conservó el pellet, el cual se re-suspendió delicadamente empleando un pincel de punta fina, realizando movimientos suaves desde el fondo del tubo hacia arriba, o mediante un retro pipeteo suave evitando la formación de burbujas en medio de aislamiento sin BSA. Por último, se centrifugó a 7000 xg por 10 min. Se re-suspendió el pellet en medio de aislamiento sin BSA.

1.3.2.2. Medición del potencial de membrana mitocondrial

Se evaluó el potencial de membrana de mitocondrias aisladas de larvas L4 empleando un citómetro de flujo Guava5 easyCyte 12HT Benchtop (Mullipoer, Bilerica, MA). Como agente fluorescente se empleó Rhodamina 123 (Rh 123) (Sigma-Aldrich) cuya emisión de fluorescencia (a 530 nm) es sensible a los cambios de potencial de membrana, posibilitando monitorear cualquier alteración en mitocondrias íntegras (Baracca *et al.*, 2003; Emaus *et al.*, 1986; O'Connor *et al.*, 1988).

En 500 μ L de medio de reacción compuesto por 250 mM de D-Manitol, 20 mM de HEPES y 1 mM de KH_2PO_4 a pH 7,4 se adicionó 0,1 mg/mL de suspensión mitocondrial y 0,5 μ M de Rh 123. Después de 15 minutos de incubación en oscuridad, la muestra se centrifugó a 7000 xg durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y las mitocondrias fueron resuspendidas en el medio de reacción mencionado anteriormente. Los cambios en el potencial mitocondrial (Fluorescencia de Rh 123) fueron evaluados en diferentes condiciones: suspensión mitocondrial, suspensión mitocondrial + Rh 123, succinato 3 mM, succinato 3 mM+ ADP 0,6 mM, ADP 0,6 mM y succinato 3 mM+ FCCP (carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona) 1 μ M. Los resultados fueron graficados con el software FCS Express Flow Cytometry (De Novo Software).

1.3.2.3. Determinación de la concentración de proteínas mitocondriales

Para una adecuada ejecución de los ensayos de función mitocondrial, se cuantificó la cantidad de proteína obtenida en los protocolos de aislamiento de mitocondrias. Este procedimiento contribuyó a garantizar la reproducibilidad de los ensayos, asegurando que se agregue siempre la misma cantidad de mitocondria al evaluar diferentes sustratos y confirmando

que el consumo de oxígeno registrado se deba al efecto del sustrato y no a la cantidad de mitocondria empleada.

La concentración de proteína en todas las muestras se llevó a cabo 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. Se preparó una curva de calibración usando albumina de suero bovino (BSA) disuelta en agua Milli-Q. Se prepararon cuatro soluciones para la cuantificación de la proteína mitocondrial: 1:100, 1:75, 1:50 y 1:25, así como un control de la reacción (Agua Milli-Q). Las medidas se llevaron a cabo en un espectrofotómetro de microplacas Multiscan GO (Thermo Scientific, Waltham, USA) a 595 nm y los datos fueron procesados con el software SkanIt (Thermo Scientific).

1.3.2.4. Respiración mitocondrial en tejido permeabilizado

Se evaluó la respiración mitocondrial en tejido permeabilizado (larvas, pupas y tórax de adulto). Para ello, se adaptó el protocolo propuesto por Gaviraghi and Oliveira 2019, y (Gaviraghi *et al.*, 2021), quienes describen y validan dos protocolos para evaluación de fisiología mitocondrial *in situ* empleando tejidos permeabilizados de tórax de *Ae. aegypti*.

-Larvas y pupas

Empleando una pipeta Pasteur, se seleccionaron larvas en fase L4 y pupas de 12 a 24 horas de eclosionadas; las cuales se transfirieron a un vaso de precipitado de 50mL y empleando una tela de tul como filtro, se realizaron tres lavados con agua tipo I (agua ultrapura) para retirar posibles restos de comida o detritus (partículas orgánicas en descomposición) provenientes de la bandeja de cría.

PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Ae. aegypti*

En cada cámara del oxígrafo se depositaron 1 y 5 larvas o pupas en 2 mL de medio de respiración o medio del oxígrafo (Hepes 10 mM (Ph 7,4), EGTA 0,1 mM, Manitol 125 mM, KCl 65 mM), con el fin de determinar el número propicio de individuos para la medición de la función respiratoria. Una vez se inició la agitación (750 rpm), se dieron 7 minutos para la homogenización de los individuos y se adicionó Digitonina (1mM). La medición de la concentración de oxígeno en el medio es cuantificada como la derivada negativa de la concentración de oxígeno en el tiempo, representada como $\text{pmol} \cdot \text{seg}^{-1} \cdot 10^{-6}$.

- *Tórax de Adultos*

Se empleó una modificación del protocolo de Gaviraghi y Oliveira (2019). Usando un aspirador bucal, se colectaron hembras de mosquito adultos de 5 a 7 días de edad, las cuales se transfirieron a un contenedor plástico. Con el fin de anestesiarse con frío los mosquitos, el contenedor plástico fue puesto en un congelador durante 6 minutos. Los mosquitos se transfirieron a una caja de Petri sobre hielo para realizar la disección empleando pinzas de punta fina en un estereoscopio. Empleando las pinzas, se eliminaron cuidadosamente las alas, seguido de la separación de la cabeza y abdomen del tórax. Una vez obtenido el número de tórax necesarios, fueron mantenidos continuamente en hielo y en 2mL de medio de respiración (Hepes 10 mM (pH 7,4), EGTA 0,1 mM, Manitol 125 mM, KCL 65 mM) hasta el inicio del experimento.

Previo a depositar los tórax (1 y 5) en la cámara del Oroboros + 2mL de medio de respiración, los escleritos de cada tórax fueron abiertos con pinzas de punta fina y de esta manera exponer el músculo del vuelo. Una vez se inició la agitación (750 rpm), se dieron 7 minutos para la homogenización de los individuos y se adicionó digitonina (1mM). La medición de la

concentración de oxígeno en el medio es cuantificada como la derivada negativa de la concentración de oxígeno en el tiempo, representada como $\text{pmol} \cdot \text{seg}^{-1} \cdot 10^{-6}$.

1.3.2.5. Determinación del consumo de oxígeno/ control respiratorio

En condiciones fisiológicas normales, el transporte de electrones a través de la cadena respiratoria mitocondrial se encuentra acoplado a la fosforilación de ATP, siendo regulado por el aporte de electrones, los niveles de ADP y Pi. El control respiratorio de una mitocondria íntegra es la regulación de la velocidad de fosforilación oxidativa por los niveles de ADP, de manera que cuando los niveles de ADP se incrementan, aumenta también la velocidad de la fosforilación oxidativa, el flujo de electrones a través de la cadena respiratoria y el consumo de oxígeno. El control respiratorio puede entonces ser evaluado en suspensiones mitocondriales o en tejidos permeabilizados cuantificando el consumo de oxígeno o su variación en la concentración del medio (Chance & Williams, 1955; González, 2004; Madrigal *et al.*, 2010).

En el presente estudio, la respiración mitocondrial de cada una de las fases de desarrollo de *Ae. aegypti* se determinó polarográficamente en un oxígrafo de alta resolución de titulación de dos canales (Oxygraph-2k, Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria). Las tasas de consumo de oxígeno se expresaron en $\text{pmol} \cdot \text{seg}^{-1} \cdot 10^{-6}$ de O_2 consumido $\times \text{mg}^{-1}$ de proteína, registrándose en tiempo real en las dos cámaras del respirómetro utilizando el software DatLab 4.0 (Oroboros Inc., Austria)

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 se depositó 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. Para los

PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Ae. aegypti*

experimentos con mitocondria aislada, siempre se empleó una concentración de 0,05 mg/mL de proteína mitocondrial, la cual fue adicionada a las cámaras del Oroboros. En el caso de los experimentos con tejido permeabilizado, primero se introdujeron los individuos/tórax y se realizó la adición de Digitonina (1mM).

Para la comparación inicial de los dos protocolos de aislamiento de mitocondrias, se evaluaron únicamente los sustratos glutamato (5mM), succinato (3mM) y prolina (10mM) + piruvato (10mM). Posterior a la selección del protocolo definitivo, se evaluaron los sustratos glutamato (5mM), malato (10 mM), prolina (10mM) + piruvato (10mM), succinato (3mM) y glicerol 3-fosfato (20mM) 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 transporte de electrones vía complejo I. Posteriormente se adicionó ADP (Larvas y pupas: 0,6mM - Adulto: 2mM) + KH₂PO₄ (1,6 mM) para promover la síntesis de ATP acoplada al consumo de oxígeno a través de la fosforilación oxidativa. Se adicionó oligomicina (3,4 mM) como inhibidor de la subunidad F₀ de la ATP sintasa, induciéndose un estado respiratorio de bajo consumo de O₂ (Estado 4 inducido). Finalmente, se adicionó carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP) (1 μ M) como agente desacoplador.

La medición de la respiración mitocondrial en tejido permeabilizado se realizó bajo las mismas condiciones, excepto por la adición de Digitonina 0,1 mg/mL posterior al tiempo de estabilización de la señal. La digitonina es un detergente no iónico que permeabiliza las membranas celulares al formar complejos de colesterol con la membrana plasmática, permitiendo el paso de los sustratos que promueven la fosforilación oxidativa (Correa *et al.*, 2012; Kuznetsov *et al.*, 2008; Vercesi *et al.*, 1991).

1.3.2.6. Coeficiente de Control respiratorio (CCR)

El Coeficiente de Control respiratorio (CCR) es un parámetro que permite comprobar la integridad de una preparación de mitocondrias. Se define como el valor que se obtiene al dividir la velocidad de consumo de oxígeno que se observa cuando hay máxima síntesis de ATP (es decir en presencia de ADP o en presencia de un translocador de protones), y entre la velocidad de consumo de oxígeno cuando no hay síntesis de ATP o en ausencia de un translocador de protones. Valores iguales o superiores a 3 son indicativo de mitocondrias acopladas, mientras que valores inferiores, son indicativo de mitocondrias en mal estado (Nicholls *et al.*, 2012). Por lo tanto:

$$CCR = \frac{\text{Respiración estado 3}}{\text{Respiración estado 4}}$$

Los parámetros obtenidos permitieron obtener el valor correspondiente al consumo de oxígeno en presencia de ADP (Estado 3), velocidad del consumo de oxígeno después del agotamiento del ADP (Estado 4) y estado 4 inducido con Oligomicina, coeficiente de control respiratorio (CCR), y respiración en presencia de FCCP.

1.3.2.7. Medición de la actividad específica de enzimas de la cadena transportadora de electrones (CTE)

Se fragmentaron mitocondrias aisladas de larvas (L4), pupas y tórax de hembras de *Ae. aegypti*, mediante un ciclo de sonicación de 15 minutos a 4°C. La medición de la actividad enzimática se realizó por respirometría empleando un oxígrafo de alta resolución (Oxygraph-2k, Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria) o por espectrofotometría (UV/Vis Multiskan GO spectrophotometer from Thermo Scientific). A continuación, se describe la metodología para cada una de las enzimas evaluadas:

PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Ae. aegypti*

a) *NADH oxidasa*

La actividad de la enzima fue determinada por el método de Singer (Singer, 1974). 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 μ M (Concentración final Cf), seguido de 0,05 mg/mL de proteína de mitocondrial. La reacción se inició con la adición de NADH 0,2 mM μ M (Cf), y la velocidad de oxidación se cuantificó con base en la velocidad de consumo de oxígeno.

b) *Succinato oxidasa*

La actividad de la enzima fue determinada por el método de Singer (Singer, 1974)). 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 μ M (Cf), seguido de 0,05 mg/mL de proteína de mitocondrial. La reacción se inició con la adición de succinato de sodio 10 mM (Cf), y la velocidad de oxidación se cuantificó con base en la velocidad de consumo de oxígeno.

c) *Citocromo c oxidasa*

La actividad de la enzima fue determinada espectrofotométricamente por el método de Mason (Mason & Schatz, 1973). En un medio de incubación compuesto por una solución tampón fosfato 50 mM (pH 7,4) y EDTA 2 mM (Cf), se adicionó 0,1 mg/mL de proteína mitocondrial y se incubó a 28 °C durante diez minutos. La reacción se inició al agregar citocromo c reducido 30 μ M (concentración final). La concentración del citocromo c oxidado se determinó mediante su coeficiente de extinción molar (ϵ redox) 19,8 mM⁻¹.cm⁻¹ a 550 nm aplicando la Ley de Beer.

PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Ae. aegypti*

d) NADH deshidrogenasa

La actividad de la enzima fue determinada espectrofotométricamente por el método de Singer (Singer 1974). A un medio de incubación compuesto por tampón fosfato 50 mM (pH 7,4) y EDTA 2 mM (Cf), 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 (Cf), 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 420nm aplicando la Ley de Beer.

e) Succinato deshidrogenasa

La actividad de la enzima fue determinada espectrofotométricamente por el método de Singer (Singer 1974). A un medio de incubación compuesto por tampón fosfato 50 mM (pH 7,4) y EDTA 2 mM (Cf), se adicionó 0,05 mg/mL de proteína mitocondrial, rotenona 1 μ M (Cf), KCN 1 mM (Cf) y succinato de sodio 20 mM (Cf). Se incubó por diez minutos a 28 °C. Posteriormente, se agregaron los receptores artificiales de electrones fenazina metosulfato (PMS) 1 mM (Cf) y 2,6-diclorofenilindofenol (DCPIP) 60 μ M (Cf) 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.

f) 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 (Cf), 0,05 mg/mL de proteína mitocondrial, KCN 1 mM (Cf) y NADH 50 μ M (Cf) incubado a 28 °C

PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Ae. aegypti*

durante diez minutos. La reacción se inició por la adición de citocromo c (oxidado) 40 μM (Cf), 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.

g) 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 (Cf), 0,05 mg de proteína mitocondrial, rotenona 1 μM (Cf), KCN 1 mM (Cf) y succinato de sodio 5 mM (Cf) incubado a 28°C durante diez minutos.

La reacción se inició por la adición de citocromo c 40 μM (Cf). 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.

h) ATPasa en mitocondrias fragmentadas

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), MgSO_4 3mM (Cf), 0,1mg de proteína mitocondrial, fosfoenolpiruvato (PEP) 2,5 mM (Cf) y 10 unidades (U) de piruvato quinasa (1 U de piruvato quinasa convierte 1 μmol de PEP a piruvato por minuto), el cual se incubó a 28°C durante 10 minutos. La reacción se inició por la adición de ATP 4mM (Cf), con un periodo de incubación a 28°C durante 10 minutos y finalmente se interrumpió al agregar ácido tricloroacético (TCA) preparado al 5%.

PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Ae. aegypti*

Al finalizar la reacción, el sistema se centrifugó a 10000xg por un minuto. Se tomó el sobrenadante y se le añadió 1 mL de reactivo acomplejante (agua tipo 1, Ácido ascórbico 10% (P/v), molibdato de amonio 2,5% (P/v), ácido sulfúrico 3M (Cf); 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. 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 cuantificó a 820 nm (Shaw, 1971).

La concentración de fosfato hidrolizado por miligramos de proteína mitocondrial se cuantificó usando una curva de calibración con patrones conocidos de KH_2PO_4 en un rango de concentración de 1 a 200 μM .

1.3.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los bioensayos correspondientes a función mitocondrial se realizaron más de tres veces en días diferentes, para cada fase metamórfica de desarrollo.

A todos los resultados obtenidos se les aplicó estadística descriptiva (Promedio, desviación estándar, error) y estadística inferencial usando Statistica V11. Los datos fueron sujetos a test de normalidad (test Kolmogorov-Smirnov y Shapiro Wilk). Cuando presentaron distribución normal, se les aplicó un ANOVA y posteriormente un test Tukey. Si la distribución no fue normal, se aplicaron pruebas no paramétricas (Kruskal-Wallis test). El nivel de significancia estadística se estableció con valores de $p \leq 0,05$. Los resultados fueron graficados en GraphPad Prisma 8.0.

1.4 RESULTADOS

1.4.1 Comparación protocolos de aislamiento

La evaluación de la actividad respiratoria de *Ae. aegypti* se basa principalmente en un protocolo adecuado de aislamiento de mitocondrias. Por ello, inicialmente se realizó una comparación de valores de consumo de oxígeno (pmol/(seg*mL)) en mitocondrias de larvas L4 de *Ae. aegypti* obtenidas mediante los protocolos de aislamiento descritos previamente por: Gonçalves *et al.* (2009) (Protocolo A) y Borrero *et al.* (2018) (Protocolo B).

El principal aspecto que diferencia estos protocolos reside en que el protocolo A emplea dos centrifugaciones (300 xg por 5 min y luego a 10.000 xg por 10 min) para la obtención de mitocondrias y ha sido empleado exclusivamente para la obtención de mitocondrias de músculos de vuelo (tórax) de *Ae. aegypti*. Por otro lado, el protocolo B emplea una serie de centrifugaciones diferenciadas (300 xg por 5 min, 8.000 xg por 10 min, 7.000 xg por 10 min y 7.000 xg por 10 min) posterior a la homogenización de larvas de mosquito (L4) para la obtención de mitocondrias. Considerando que se buscó establecer qué protocolo se emplearía para posteriores experimentos, se realizó la evaluación de consumo de oxígeno para el complejo NADH Ubiquinona-oxidoreductasa (Complejo I) y el complejo Succinato Ubiquinona oxidoreductasa (Complejo II) mediante la adición de los sustratos glutamato, prolina+piruvato y succinato.

Los valores más altos de consumo de oxígeno se obtuvieron con el sustrato succinato para los dos protocolos (Figura 1). Al comparar los valores entre los protocolos A y B, el consumo de oxígeno fue mayor con el protocolo B en todos los estados respiratorios cuantificados empleado el sustrato succinato. Adicionalmente, se encontraron diferencias estadísticamente significativas para estado 3 (Mann-Whitney U Test: H (2, N = 15) p= 0,001463), con valores de $22 \pm 0,9$ pmol/(seg*mL) con el protocolo B y $13,7 \pm 3,2$ pmol/(seg*mL) con el protocolo A. También se

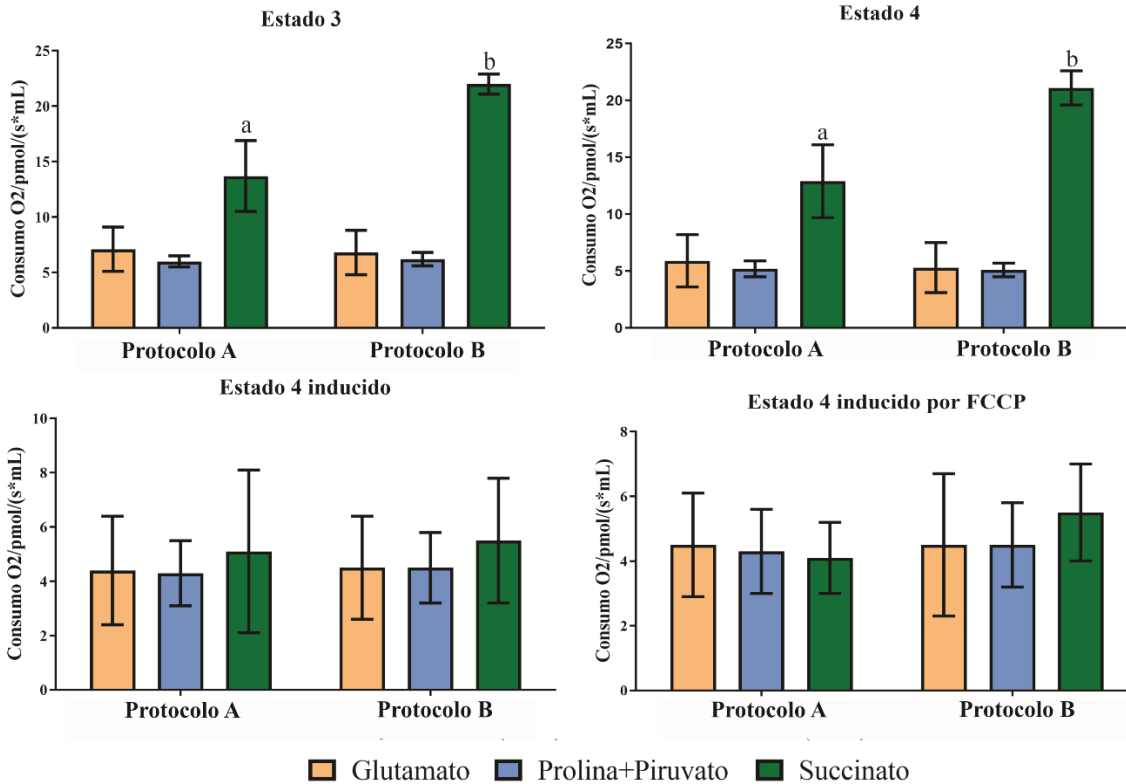
PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Ae. aegypti*

encontraron diferencias estadísticamente significativas para estado 4 (Mann-Whitney U Test: H: (2, N=15) $p=0,001463$), con valores de $21,1 \pm 1,5$ pmol/(seg*mL) con el protocolo B y $12,9 \pm 3,2$ pmol/(seg*mL) con el protocolo A (Figura 1).

Para el sustrato glutamato, no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los protocolos A y B para el estado 3 (KW test: H (2, N = 23) $p = 0,583231$), estado 4 (Tukey test $F=0,4546$, $df=1$, $p = 0,507681$), estado 4 inducido (Tukey test $F=0,0048$, $df=1$, $p = 0,945759$), y respiración en presencia de FCCP (Tukey test $F=0,000$, $df=1$, $p = 0,997297$) (Figura 1). Para el sustrato prolina+piruvato no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los protocolos A y B para cada estado respiratorio cuantificado: estado 3 (Tukey test $F=1,341$, $df=1$, $p=0,264037$), estado 4 (Tukey test $F=0,3502$, $df=1$, $p=0,562427$), estado 4 inducido (Tukey test $F=0,0428$, $df=1$, $p=0,838850$), y respiración en presencia de FCCP (Tukey test $F=0,0724$, $df=1$, $p=0,791421$) (Figura 1).

Figura 1

*Consumo de oxígeno (pmol/(seg*mL)) de mitocondrias aisladas de larvas L4 de Aedes aegypti obtenidas de dos protocolos de aislamiento Gonçalves et al. (2009) (Protocolo A) y Borrero et al. (2018) (Protocolo B), para los estados respiratorios estado 3, estado 4, estado 4 Inducido con oligomicina y respiración en presencia de FCCP. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre ^{a,b} para el estado 3 y estado 4 (Mann-Whitney U Test: H (2, N = 15) $p \leq 0,05$).*



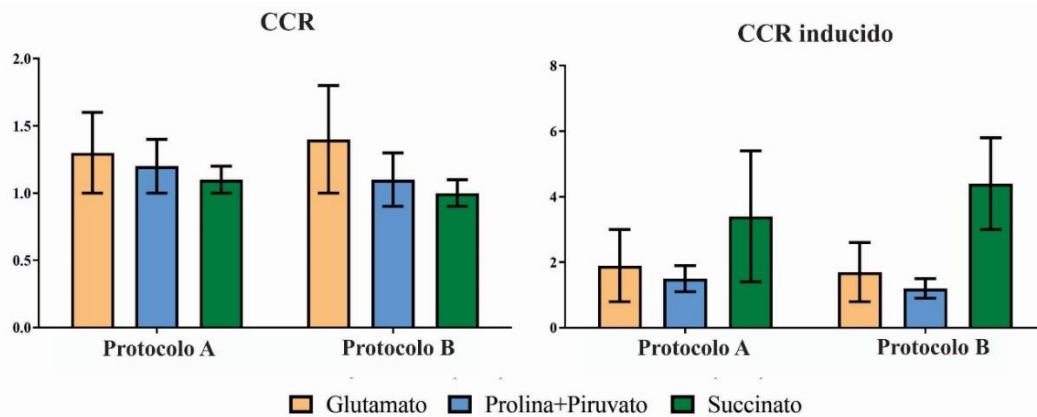
Existen tres parámetros para describir la fosforilación oxidativa: (1) la velocidad de consumo en estado 3 o respiración activa, en presencia de exceso de sustrato y ADP, con alto consumo de O₂ y producción de ATP; (2) la velocidad de consumo en estado 4 o respiración controlada, en presencia de exceso de sustrato, con velocidades de consumo de O₂ bajas, sin producción de ATP; y (3) el Coeficiente de Control Respiratorio (CCR), resultado del cociente entre el consumo de O₂ en estado 3 /estado 4. Este valor indica el papel del ADP en la regulación del consumo de O₂ mitocondrial y brinda un valor para medir el grado de acoplamiento y la integridad de las membranas (Nicholls *et al.*, 2012). Por ello, se calcularon y compararon los CCR para cada uno de los protocolos y sustratos evaluados (Figura 2).

Considerando que los estados respiratorios se definieron experimentalmente mediante el comportamiento respiratorio de mitocondrias aisladas incubadas en un medio isotónico, es decir, su respuesta se da bajo condiciones artificiales, se compararon los valores obtenidos para

cada sustrato oxidable. Se encontró el valor más alto de CCR con el sustrato glutamato, con valores de $1,3 \pm 0,3$ para el protocolo A y $1,4 \pm 0,4$ para el protocolo B, sin encontrarse diferencias estadísticamente significativas (Mann-Whitney U Test: H (2, N = 15) $p= 0,219348$) entre ellos (Figura 2). Los valores de CCR para los sustratos prolina+piruvato (Protocolo A: $1,2 \pm 0,2$; Protocolo B: $1,1 \pm 0,2$) y succinato (Protocolo A: $1,1 \pm 0,1$; Protocolo B: $1,0 \pm 0,1$) fueron muy similares, sin presentar diferencias estadísticamente significativas entre ellos (Prolina+piruvato: Mann-Whitney U Test: H (2, N = 15) $p= 0,562970$; succinato: Mann-Whitney U Test: H (2, N = 15) $p= 0,813664$ (Figura 2). Valores cercanos a 1 indican que no existe una clara diferenciación entre el consumo de oxígeno en el estado 3 y el estado 4, lo que sugiere alteraciones a nivel de membrana mitocondrial externa o alteraciones en el potencial de membrana debido a la presencia de proteínas desacopladoras (Slocinska *et al.*, 2016).

Figura 2

Coefficiente de Control Respiratorio (CCR: Respiración estado 3 / Respiración estado 4) y CCR inducido (Respiración estado 3 / Respiración estado 4 inducida con Oligomicina) de mitocondrias aisladas de larvas L4 de Aedes aegypti obtenidas de dos protocolos de aislamiento: Gonçalves et al. (2009) (Protocolo A) y Borrero et al. (2018) (Protocolo B). Se emplearon los sustratos oxidables glutamato, prolina+piruvato y succinato.



Con el fin de conocer si existe alguna variación en los valores de CCR al ser calculados en un estado 4 inducido, se empleó Oligomicina como reactivo inhibidor de la ATPsintasa. La Oligomicina es un antibiótico que actúa al unirse al canal de protones en el componente Fo de la ATPsintasa, bloqueando la síntesis de ATP mitocondrial y la translocación de protones (Hearne *et al.*, 2020). Cuando se calculó el CCR entre la respiración en el estado 3 y el estado 4 inducido (CCR inducido), se obtuvo un aumento en los valores obtenidos para todos los sustratos y para los dos protocolos. Sin embargo, el sustrato succinato (protocolo A: $3,4 \pm 2$; protocolo B: $4,4 \pm 1,4$) fue el único sustrato con el cual se obtuvieron valores de CCR superiores a 3, es decir, sería un indicativo de mitocondrias integras. Al comparar estadísticamente estos valores, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los protocolos evaluados (Mann-Whitney U Test: $H(2, N = 15) p = 0,157300$) (Figura 2).

Vale la pena mencionar que el aumento en el valor del CCR inducido para el sustrato glutamato fue más notorio con el protocolo B ($1,7 \pm 0,1$), aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre protocolos (Glutamato: Mann-Whitney U Test: $H(2, N = 15) p = 0,771289$). Usando el sustrato prolina+piruvato, se obtuvo un mayor aumento en el valor CCR inducido con el protocolo A ($1,5 \pm 0,4$), sin encontrarse diferencias estadísticamente significativas entre protocolos (Mann-Whitney U Test: $H(2, N = 15) p = 0,229610$) (Figura 2).

Comparando los resultados obtenidos, la velocidad de consumo de oxígeno de las mitocondrias aisladas con los dos protocolos es mayor con el sustrato succinato, principalmente con el protocolo B. Sin embargo, al calcular el CCR, no se obtuvieron mitocondrias integras con ninguno de los protocolos y de acuerdo con los valores reportados en la bibliografía, excepto al analizar el CCR inducido y usando succinato como sustrato oxidable. Debe considerarse que los valores de CCR descritos en la bibliografía suelen estar basados en la cuantificación del consumo

de oxígeno en tejidos de mamíferos o cultivos celulares, donde los valores de consumo de oxígenos son más altos, mientras que los estudios que describen el cálculo del CCR en insectos emplean el estado 4 inducido o incluso el estado 2 como cocientes para calcular este valor (Gonçalves *et al.* 2009, Gaviraghi & Oliveira, 2019).

Considerando lo anteriormente expuesto, y que los valores de cada uno de los estados respiratorios evaluados fueron más altos con el protocolo descrito por Borrero *et al.* (2018) (Protocolo B), este protocolo fue seleccionado para la medición de parámetros respiratorios en mitocondrias aisladas.

1.4.2 Medición de parámetros respiratorios en mitocondrias aisladas

Una vez seleccionado el protocolo de aislamiento de mitocondrias, se evaluaron las velocidades de consumo de oxígeno (pmol/(seg*mL)) para cada estado de desarrollo de *Ae. aegypti* (larvas L4, pupas y tórax de adulto hembra). Para ello, se adicionaron los sustratos oxidables glutamato, malato, prolina+piruvato, succinato y glicerol 3-fosfato (G3P); y se cuantificó cada estado respiratorio: estado 3, estado 4, estado 4 Inducido con Oligomicina y respiración en presencia de FCCP (mitocondrias desacopladas).

Mediante la evaluación de diferentes sustratos oxidables se buscó determinar el aporte de electrones a través de diferentes complejos mitocondriales. En el complejo I (NADH deshidrogenasa o NADH ubiquinona oxidorreductasa) se produce la oxidación del NADH a NAD⁺ proveniente de la oxidación de ácidos grasos y ciclo del ácido cítrico. Para este complejo se evaluaron los sustratos glutamato y malato. El Glutamato sufre una desaminación oxidativa por parte de la enzima glutamato deshidrogenasa, la cual utiliza como aceptores los equivalentes de reducción NAD⁺ y NADP⁺ (Smith *et al.* 2019). El malato sufre una oxidación a oxalacetato,

PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Ae. aegypti*

catalizada por la malato deshidrogenasa 2, en una reacción en que el NAD^+ se reduce a $\text{NADH} + \text{H}^+$. De cada uno de estos sustratos se transfieren dos electrones y dos protones desde el NADH a la flavina mononucleótido (FMN), y de allí a una secuencia de nueve centros de hierro-azufre hasta llegar a la ubiquinona (Q), la cual se reduce a ubiquinol (QH_2), desplazándose hasta el complejo III (Cecchini, 2003).

El complejo II (Succinato deshidrogenasa o succinato coenzima Q reductasa) representa el punto de conexión entre el ciclo del ácido cítrico y la cadena transportadora de electrones (Cecchini 2003). Para este complejo se evaluó el sustrato succinato, el cual se oxida a fumarato por la acción de la enzima succinato deshidrogenasa. Los electrones son transferidos del succinato a la ubiquinona (Q) a través del cofactor flavina adenina dinucleótido (FAD) y de allí a tres centros hierro-azufre. El FAD reducido a FADH_2 transfiere un par de electrones a la ubiquinona (Q), donde al igual que el complejo I, se reduce a ubiquinol (QH_2) y se desplaza hasta el complejo III (Cecchini, 2003; Grimm, 2013; Sun *et al.*, 2005).

La evaluación de la combinación de sustratos prolina+piruvato permite conocer el ingreso de electrones obtenidos vía ciclo de Krebs. El piruvato es descarboxilado en la matriz mitocondrial generando NADH y acetyl-CoA, que es degradado generando CO_2 y NADH vía ciclo del ácido cítrico. La prolina es metabolizada para generar glutamato, quien a su vez sufre desaminación para generar alfa cetoglutarato, un intermediario del ciclo del ácido cítrico. La oxidación de estos sustratos mediante la acción de la prolina deshidrogenasa (ProDH) y la piruvato deshidrogenasa (PyrDH), genera NADH , empleado en el complejo I (J. Correa *et al.*, 2015; Scaraffia & Wells, 2003).

Con el G3P se evaluó el ingreso de electrones directamente vía ubiquinona (Q) a través de la lanzadera glicerol fosfato (GP) (Presente en el citosol), la cual involucra la acción de tres

fosfatos deshidrogenasas (2 citosólicas y una mitocondrial) con el proceso de glucólisis al regenerar NAD⁺ a partir de NADH. Con el fin de evitar este reflujo de electrones, se adicionó el inhibidor rotenona. La oxidación de G3P a dihidroxiacetona fosfato (DHAP) se da por la acción de la enzima glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH), la cual transfiere directamente un par de electrones a la ubiquinona (Q), reduciéndola a ubiquinol (QH₂) (Gaviraghi & Oliveira, 2019).

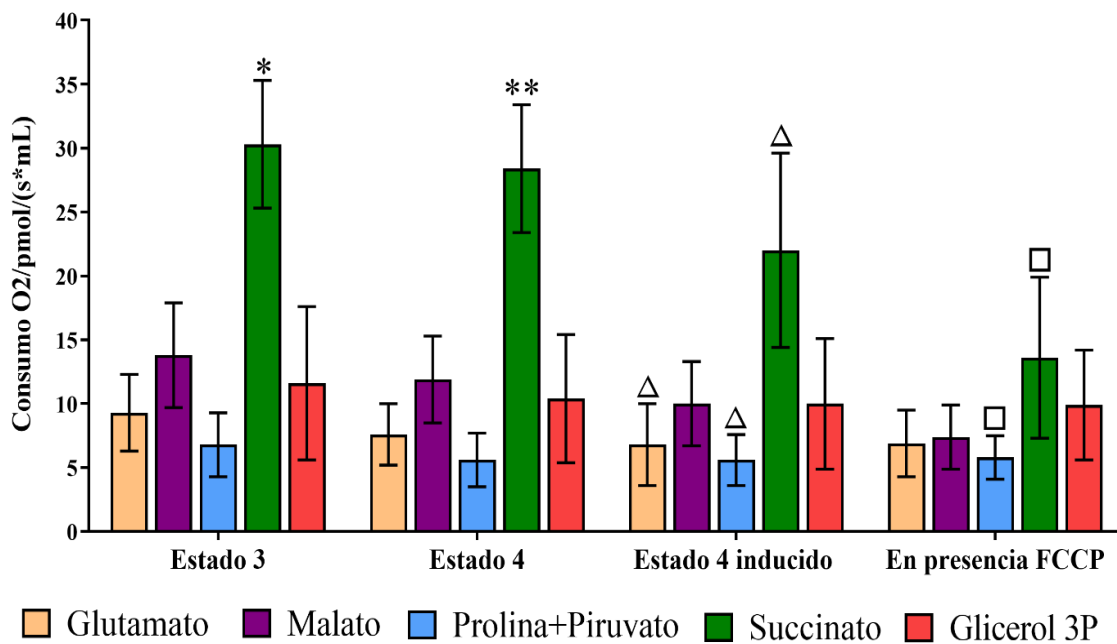
1.4.2.1. Mitocondrias de larvas L4

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 3 de 30,3±5 pmol/(s*mL), estado 4 de 28,4±5 pmol/(s*mL), estado 4 inducido de 22±7,6 pmol/(s*mL) y respiración en presencia de FCCP de 13,62±6,3 pmol/(s*mL) (Figura 3).

Al comparar los valores de oxígeno de mitocondrias de larvas L4 entre sustratos oxidables para cada estado respiratorio, se encontraron diferencias estadísticas significativas entre el sustrato succinato y los demás sustratos evaluados: glutamato, malato, prolina+piruvato y G3P para el estado 3 (KW test H: (4, N=72) =54,766580 p=0,003167) y el estado 4 (KW test H: (4, N=72) =56,11636 p=0,005921). Para el estado 4 inducido se encontraron diferencias estadísticas significativas entre succinato-glutamato (KW test H: (4, N=72) =44,54037 p=0,000003) y entre succinato - prolina+piruvato (KW test H: (4, N=72) =44,54037 p=0,00000). Para la respiración en presencia de FCCP se encontraron diferencias estadísticas significativas únicamente entre succinato - prolina+piruvato (KW test H: (4, N=56) =16,15322 p=0,003789) (Figura 3).

Figura 3

Consumo de oxígeno (pmol/(seg*mL)) de mitocondrias aisladas de larvas L4 de *Aedes aegypti* para los estados respiratorios estado 3, estado 4, estado 4 Inducido con oligomicina y respiración en presencia de FCCP (mitocondrias desacopladas). Se emplearon los sustratos oxidables glutamato, malato, prolina+piruvato, succinato y G3P. Símbolos diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre * Sustratos oxidables para estado 3 (KW test H: (4, N=72) =54,766580 $p \leq 0,05$). **Sustratos oxidables para estado 4 (KW test H: (4, N=72) =56,11636 $p \leq 0,05$). Δ Sustratos oxidables para estado 4 inducido (KW test H: (4, N=72) =44,54037 $p \leq 0,05$). \square Sustratos oxidables en presencia de FCCP (KW test H: (4, N=72) =16,15322 $p \leq 0,05$).



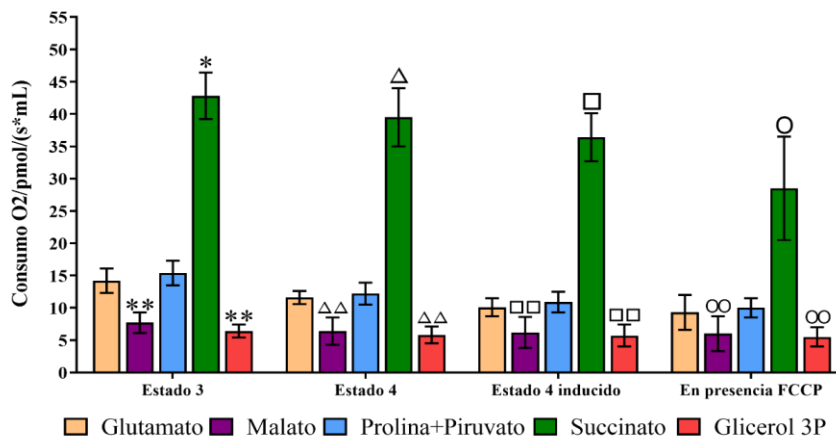
1.4.2.2. Mitocondrias de pupas

En mitocondrias aisladas de pupas, se observó un mayor consumo de oxígeno con el sustrato succinato en todos los estados respiratorios: estado 3 de $42,8 \pm 3,6$ pmol/(s*mL), estado 4 de $39,5 \pm 4,5$ pmol/(s*mL), estado 4 inducido de $36,4 \pm 3,7$ pmol/(s*mL) y respiración en presencia de FCCP de $28,5 \pm 8,0$ pmol/(s*mL) (Figura 4).

Al comparar los valores de oxígeno de mitocondrias de pupas entre sustratos oxidables para cada estado respiratorio, se encontraron diferencias estadísticas significativas entre el sustrato succinato y los demás sustratos evaluados: glutamato, malato, prolina+piruvato y G3P para el estado 3 (KW test H: (4, N=39) =32,76122 p=0,00255) y el estado 4 (KW test H: (4, N=39) =31,85306 p=0,000106). El mismo comportamiento se observó para el estado 4 inducido (KW test H: (4, N=39) =27,6700 p=0,000184) y respiración en presencia de FCCP (KW test H: (4, N=39) =24,77551 p=0,000253) (Figura 4).

Figura 4

*Consumo de oxígeno (pmol/(seg*mL)) de mitocondrias aisladas de pupas de Aedes aegypti para los estados respiratorios estado 3, estado 4, estado 4 Inducido con oligomicina y respiración en presencia de FCCP (mitocondrias desacopladas). Se emplearon los sustratos oxidables glutamato, malato, prolina+piruvato, succinato y G3P. Símbolos diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre *, ** Sustratos oxidables para estado 3 (KW test H: (4, N=39) =32,76122 p≤0,05). Δ, ΔΔ Sustratos oxidables para estado 4 (KW test H: (4, N=39) =31,85306 p≤0,05). □, □□ Sustratos oxidables para estado 4 inducido (KW test H: (4, N=39) = 27,6700 p≤0,05). ○, ○○ Sustratos oxidables para estado en presencia de FCCP (KW test H: (4, N=39) = 24,77551 p≤0,05).*



1.4.2.3. Mitocondrias de tórax de hembras

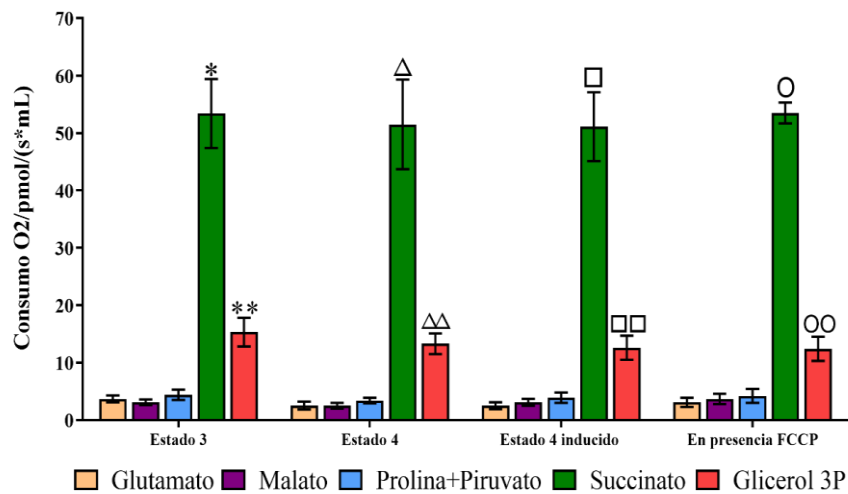
Para mitocondrias aisladas de tórax de hembras adultas, se obtuvo un mayor consumo de oxígeno en todos los estados respiratorios usando succinato como sustrato oxidable, con valores de oxígeno consumido para el estado 3 de $53,4 \pm 6,0$ pmol/(s*mL), estado 4 de $51,5 \pm 7,8$ pmol/(s*mL), estado 4 inducido de $51,1 \pm 6,0$ pmol/(s*mL) y respiración en presencia de FCCP de $53,5 \pm 1,8$ pmol/(s*mL) (Figura 5).

Al comparar los valores de oxígeno de mitocondrias de tórax entre sustratos oxidables para cada estado respiratorio, se encontraron diferencias estadísticas significativas entre el sustrato succinato y los demás sustratos evaluados: glutamato, malato, prolina+piruvato y G3P para el estado 3 (KW test H: (4, N=44) =37,65303 p=0,000287), estado 4 (KW test H: (4, N=44) =36,27515 p=0,046388), estado 4 inducido (KW test H: (4, N=44) =35,52607 p=0,019768) y respiración en presencia de FCCP (KW test H: (4, N=38) =25,89530 p=0,016646) (Figura 5).

Adicionalmente, para el sustrato G3P se encontraron diferencias estadísticas en el estado 3 entre G3P-glutamato (KW test H: (4, N=44) =37,65303 p=0,005860), G3P-malato (KW test H: (4, N=44) =37,65303 p=0,000093); para el estado 4 entre G3P-glutamato (KW test H: (4, N=44) =36,27515 p=0,001036) y G3P-malato (KW test H: (4, N=44) =36,27515 p=0,000866); para estado 4 inducido entre G3P-glutamato (KW test H: (4, N=44) = 35,52607 p=0,000135) y G3P-malato (KW test H: (4, N=44) = 35,52607 p=0,018350) y para la respiración en presencia de FCCP entre G3P-glutamato (KW test H: (4, N=38) =25,89530 p=0,000409), G3P-malato (KW test H: (4, N=38) =25,89530 p=0,006097) y entre G3P- prolina+piruvato (KW test H: (4, N=38) =25,89530 p=0,027710) (Figura 5).

Figura 5

Consumo de oxígeno ($\text{pmol}/(\text{seg} \cdot \text{mL})$) de mitocondrias aisladas de tórax de hembras de *Aedes aegypti* para los estados respiratorios estado 3, estado 4, estado 4 Inducido con oligomicina y respiración en presencia de FCCP (mitocondrias desacopladas). Se emplearon los sustratos oxidables glutamato, malato, prolina+piruvato, succinato y G3P. Símbolos diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre *, ** Sustratos oxidables para estado 3 (KW test H: (4, N=44) = 37,65303 $p \leq 0,05$). Δ , $\Delta\Delta$ Sustratos oxidables para estado 4 (KW test H: (4, N=39) = 36,27515 $p \leq 0,05$). \square , $\square\square$ Sustratos oxidables para estado 4 inducido (KW test H: (4, N=39) = 35,52607 $p \leq 0,05$). \circ , $\circ\circ$ Sustratos oxidables en presencia de FCCP (KW test H: (4, N=39) = 25,89530 $p \leq 0,05$).



1.4.2.4. Comparación entre fases de desarrollo

Finalmente, al comparar los valores respiratorios en estado 3 para cada sustrato oxidable y cada fase de desarrollo, notamos que los valores más altos se registraron con el sustrato succinato (Figura 6). A medida que el ciclo de vida del mosquito avanza, se observa un aumento progresivo en el consumo de oxígeno con este sustrato, iniciando con larva ($30,3 \pm 5,0 \text{ pmol}/(\text{s} \cdot \text{mL})$) y alcanzando un máximo valor en adulto ($53,4 \pm 6,0 \text{ pmol}/(\text{s} \cdot \text{mL})$). Se encontraron diferencias

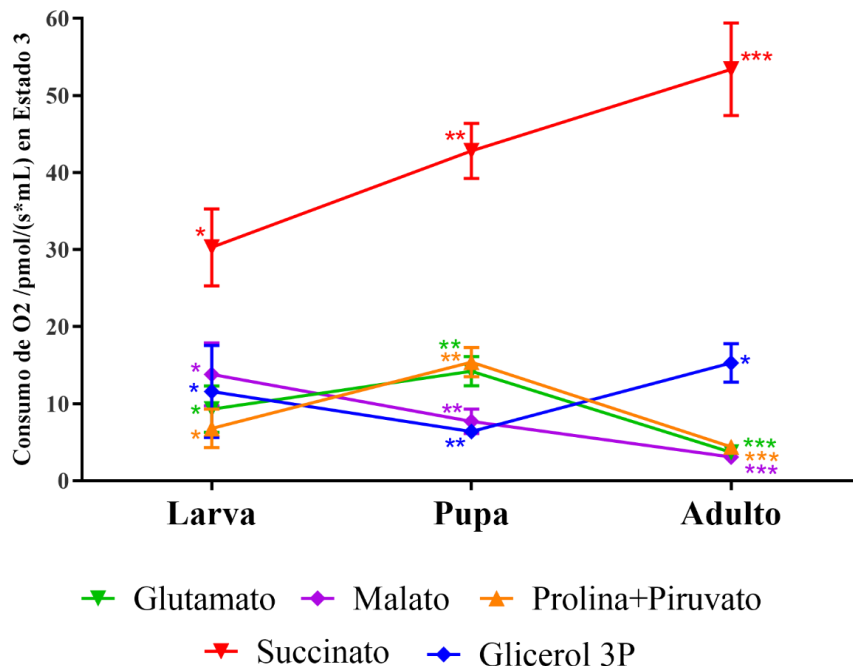
PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Ae. aegypti*

estadísticamente significativas entre cada una de las fases evaluadas: larva L4 vs Pupa (Tukey test $F=61,629$, $df=2$, $p= 0,000126$); larva L4 vs adulto (Tukey test $F=61,629$, $df=2$, $p= 0,000125$); pupa vs adulto (Tukey test $F=61,629$, $df=2$, $p= 0,002573$) (Figura 6).

Con los demás sustratos se observó un consumo de oxígeno mucho menor, con un comportamiento similar para los sustratos glutamato y prolina+piruvato, donde las pupas presentan mayores valores respiratorios (Glutamato: $14,2 \pm 1,9$ pmol/(s*mL); prolina+piruvato: $15,4 \pm 1,9$ pmol/(s*mL)) en comparación con las fases de larva (Glutamato: $9,3 \pm 3,0$ pmol/(s*mL); prolina+piruvato: $6,8 \pm 2,5$ pmol/(s*mL)) y adulto (Glutamato: $3,7 \pm 0,6$ pmol/(s*mL); prolina+piruvato: $4,4 \pm 0,9$ pmol/(s*mL)). Con el sustrato glutamato se encontraron diferencias estadísticas significativas entre larva L4 vs pupa (Tukey test $F=49,1980$, $df=2$, $p= 0,000199$); larva L4 vs adulto (Tukey test $F=49,1980$, $df=2$, $p= 0,00012$); pupa vs adulto (Tukey test $F=49,1980$, $df=2$, $p= 0,000121$). Con el sustrato prolina+piruvato se encontraron diferencias estadísticas significativas entre larva L4 vs pupa (Tukey test $F=58,5959$, $df=2$, $p= 0,000127$); larva L4 vs adulto (Tukey test $F=58,5959$, $df=2$, $p= 0,025646$) y pupa vs adulto (Tukey test $F=58,5959$, $df=2$, $p= 0,000127$) (Figura 6).

Figura 6

*Consumo de oxígeno (pmol/(seg*mL)) en estado 3 de mitocondrias aisladas de larvas, pupas y tórax de hembras de Aedes aegypti para los sustratos oxidables glutamato, malato, prolina+piruvato, succinato y G3P. *, **, *** Diferencias estadísticas significativas entre larvas, pupas y adultos para cada sustrato oxidable evaluado: glutamato (Tukey test $F=49,1980$, $df=2$, $p \leq 0,005$); malato (Tukey test $F=40,7381$, $df=2$, $p \leq 0,005$); prolina+piruvato (Tukey test $F=58,5959$, $df=2$, $p \leq 0,05$); succinato (Tukey test $F=61,629$, $df=2$, $p \leq 0,05$) y G3P (Tukey test $F=14,2520$, $df=2$, $p \leq 0,05$).*



Con respecto al sustrato malato, se observa un mayor consumo de oxígeno en fase de larva ($13,8 \pm 4,1$ pmol/(s*mL)), el cual disminuye progresivamente hasta su menor valor en la fase de adulto ($3,1 \pm 0,5$ pmol/(s*mL)), con diferencias estadísticamente significativas entre larva L4 vs Pupa (Tukey test $F=40,7381$, $df=2$, $p=0,000178$); larva L4 vs adulto (Tukey test $F=40,7381$, $df=2$, $p=0,000129$); pupa vs adulto (Tukey test $F=40,7381$, $df=2$, $p=0,000657$). Por último, el sustrato G3P presenta valores altos en larva ($11,6 \pm 6,0$ pmol/(s*mL)) y adulto ($15,3 \pm 2,5$ pmol/(s*mL)), pero bajos en fase de pupa ($6,4 \pm 1,0$ pmol/(s*mL)), con diferencias estadísticas significativas entre larva vs pupa (Tukey test $F=14,2520$, $df=2$, $p=0,003814$) y pupa vs adulto (Tukey test $F=14,2520$, $df=2$, $p=0,000175$) (Figura 6).

Vale la pena resaltar que los valores más altos de consumo de oxígeno en larvas y adultos de *Ae. aegypti* se obtuvieron con los sustratos succinato y G3P. La oxidación de estos dos sustratos, aunque en diferentes complejos, son puntos de conexión directa con el ciclo del ácido cítrico y con la glucólisis. Al evitar el paso de electrones por el complejo I, el ingreso de electrones debido a la

oxidación de estos sustratos constituye una fuente “rápida” para la producción de ATP. El ingreso de electrones con el sustrato succinato (proveniente del ácido cítrico) se da desde su oxidación a fumarato. Por su parte, el G3P (presente en el citosol) ingresa a la matriz mitocondrial mediante la lanzadera de G3P, donde se oxida a DHAP (Pérez, 2013; Sun *et al.*, 2013). En ambos casos, los electrones son transportados por la ubiquinona (UQ), que los transfiere al complejo III. Adicionalmente, considerando que el sustrato succinato no aporta protones a la matriz mitocondrial (Grimm, 2013), disminuye la posible formación de especies reactivas de oxígeno en fases de desarrollo sometidas a altos niveles de estrés oxidativo, como Larvas L4 y adultos.

Para la fase de pupa se observó un mayor consumo de oxígeno con los sustratos succinato, glutamato y prolina+piruvato, los cuales aportan electrones vía ciclo del ácido cítrico a los complejos I y II. Como se mencionó anteriormente, el uso de succinato disminuye el aporte de protones adicionales a los que se generan durante la oxidación de glutamato y prolina vía complejo I, importantes para mantener la fuerza protón motriz de la cadena respiratoria mitocondrial.

1.4.3 Verificación de la Integridad mitocondrial

1.4.3.1. Medición del potencial de membrana mitocondrial

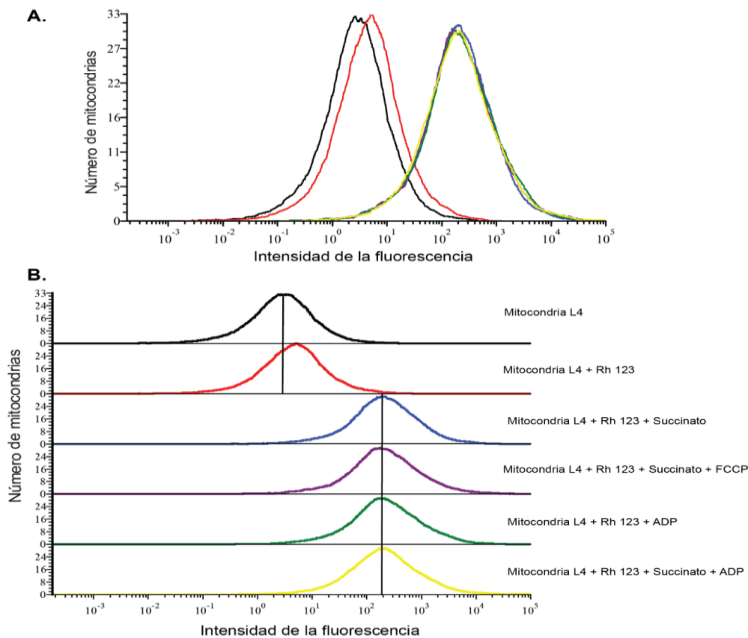
Con el fin de analizar la integralidad de las membranas mitocondriales, se evaluó la formación de potencial de membrana mitocondrial mediante la cuantificación del potencial eléctrico mitocondrial ($\Delta\Psi$), empleando la técnica de citometría de flujo con el fluorocromo Rhodamina 123 (Rh 123).

La Rh 123 cuantifica la diferencia de potencial eléctrico a través de la membrana interna mitocondrial. La pérdida de potencial se representa en una pérdida del colorante a través de la membrana (al exterior de la mitocondria), y así mismo, en un aumento en la intensidad de la fluorescencia (Baracca *et al.*, 2003; Emaus *et al.*, 1986; O'Connor *et al.*, 1988).

Mitocondrias aisladas de larvas L4 fueron incubadas con 0,5 μ M de Rh 123 y se graficó la intensidad de la fluorescencia en presencia de moduladores de $\Delta\Psi$. Teniendo en cuenta que se observó un mayor valor de consumo de oxígeno con el sustrato succinato, este sustrato fue empleado en los experimentos.

Figura 7

Histogramas de intensidad de fluorescencia emitida por el colorante Rhodamina 123 en mitocondrias aisladas de larvas L4 de Aedes aegypti empleando el protocolo de Castillo-Morales et al. (2019), en presencia de diferentes moduladores del potencial eléctrico mitocondrial. A. Histograma consolidado de las fluorescencias obtenidas en las suspensiones mitocondriales control (mitocondrias aisladas – línea negra- y mitocondrias incubadas con Rh 123-línea roja-) vs. las suspensiones tratamiento (Curvas color azul, violeta, verde y amarilla). B. Histogramas individuales de cada suspensión mitocondrial evaluada.



Inicialmente, a manera de control, se adicionó únicamente la suspensión mitocondrial, cuya intensidad de fluorescencia es baja (Figura 7, curva color negro). Esta intensidad aumentó

levemente al adicionar Rh 123, reflejando el paso del fluorocromo a través de la membrana mitocondrial (Figura 7, Curva color rojo). La adición del sustrato respiratorio succinato estimuló el consumo de oxígeno y por ende la modificación del potencial transmembrana, reflejándose en un aumento de la intensidad de la fluorescencia, relacionada con un leve aumento de la concentración de protones en el espacio intermembrana (Figura 7, curva color azul). Al adicionar ADP a mitocondrias energizadas con succinato, no se observó cambio significativo en la intensidad de fluorescencia (Figura 7, curva color amarillo). Con el fin de corroborar el efecto del ADP en la suspensión mitocondrial, se adicionó ADP sin sustrato respiratorio. El aumento de la fluorescencia observada indica la modificación del potencial transmembrana, aun sin la adición de sustrato (Figura 7, curva color verde). Por último, a la suspensión mitocondrial se le adicionó succinato+ADP y el protonóforo FCCP, donde se esperaba una mayor disminución en la intensidad de la fluorescencia. El comportamiento de esta curva fue similar a la curva obtenida al adicionar ADP sin sustrato (Figura 7, curva color violeta).

Los resultados obtenidos evidencian la formación de potencial de membrana, sin embargo, al no observar disminución de la intensidad de fluorescencia tras la adición de ADP o FCCP no es posible concluir que la membrana externa este íntegra debido posiblemente a la presencia de proteínas desacopladoras o pérdida parcial de integridad de membrana.

1.4.3.2. Cálculo del Coeficiente de Control Respiratorio (CCR)

El Coeficiente de Control Respiratorio (CCR) fue calculado para todas las fases de desarrollo (Larvas L4, pupas y tórax de hembras) y para cada sustrato evaluado de la siguiente manera: Respiración estado 3 / Respiración estado 4 inducido con oligomicina. Oligomicina es un reactivo que se une al canal de protones F_0 de la ATP sintasa, bloqueando la translocación de protones, la síntesis de ATP e inhibiendo la captación de O_2 (Hearne *et al.* 2020). La cuantificación

PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Ae. aegypti*

de la velocidad de consumo de oxígeno bajo condiciones de no fosforilación (con oligomicina) permite analizar el comportamiento de las mitocondrias en ausencia máxima de consumo de O₂, lo que permite conocer la capacidad bioenergética de la mitocondria y su eficiencia en condiciones similares a un estado Leak (estado 2) o de no fosforilación oxidativa (Correa *et al.*, 2015).

Los valores obtenidos de CCR inducido con oligomicina para todos los aislamientos mitocondriales mostraron valores que oscilaron entre 1 y 1,6 (Tabla 1). Para mitocondrias de larvas L4, los valores más altos de CCR inducido se observaron con los sustratos glutamato ($1,6 \pm 0,7$) y succinato ($1,6 \pm 0,9$). Al comparar los valores entre los sustratos evaluados, no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre ellos (KW test H: (4, N=72) = 5,167793 p=0,2705). Para mitocondrias de pupas, los valores más altos de CCR inducido se encontraron para los sustratos glutamato ($1,4 \pm 0,3$) y prolina+piruvato ($1,4 \pm 0,1$), con diferencias estadísticas significativas entre ellos (KW test H: (4, N=39) = 10,21238 p=0,0370). Finalmente, para mitocondrias de tórax, el valor más alto se obtuvo con el sustrato glutamato ($1,6 \pm 0,5$), y se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los sustratos glutamato y malato (KW test H: (4, N=44) = 16,43407 p=0,0001325) (Tabla 1).

Tabla 1

Coeficiente de Control Respiratorio (CCR: Respiración estado 3 / Respiración estado 4 inducido con Oligomicina) de mitocondrias aisladas de larvas L4, pupas y tórax de hembras de Aedes aegypti. Se emplearon los sustratos oxidables glutamato, malato, prolina+piruvato, succinato y G3P. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre los sustratos ^{a,b} glutamato y prolina+piruvato para mitocondrias aisladas de pupas ((KW test H: (4, N=39) = 10,21238 p=0,0370), ^{c,d} glutamato y malato para mitocondrias aisladas de tórax (KW test H: (4, N=44) = 16,43407 p=0,0001325).

Fase de desarrollo	Valor CCR inducido \pm Desviación				
	Glutamato	Malato	Prolina+Piruvato	Succinato	G3P
Larvas	1,6 \pm 0,9	1,4 \pm 0,3	1,3 \pm 0,3	1,6 \pm 0,7	1,2 \pm 0,1
Pupas	1,4 \pm 0,3 ^a	1,3 \pm 0,3	1,4 \pm 0,1 ^b	1,2 \pm 0,1	1,2 \pm 0,2
Tórax	1,6 \pm 0,5 ^c	1,0 \pm 0,2 ^d	1,2 \pm 0,1	1,1 \pm 0,2	1,2 \pm 0,2

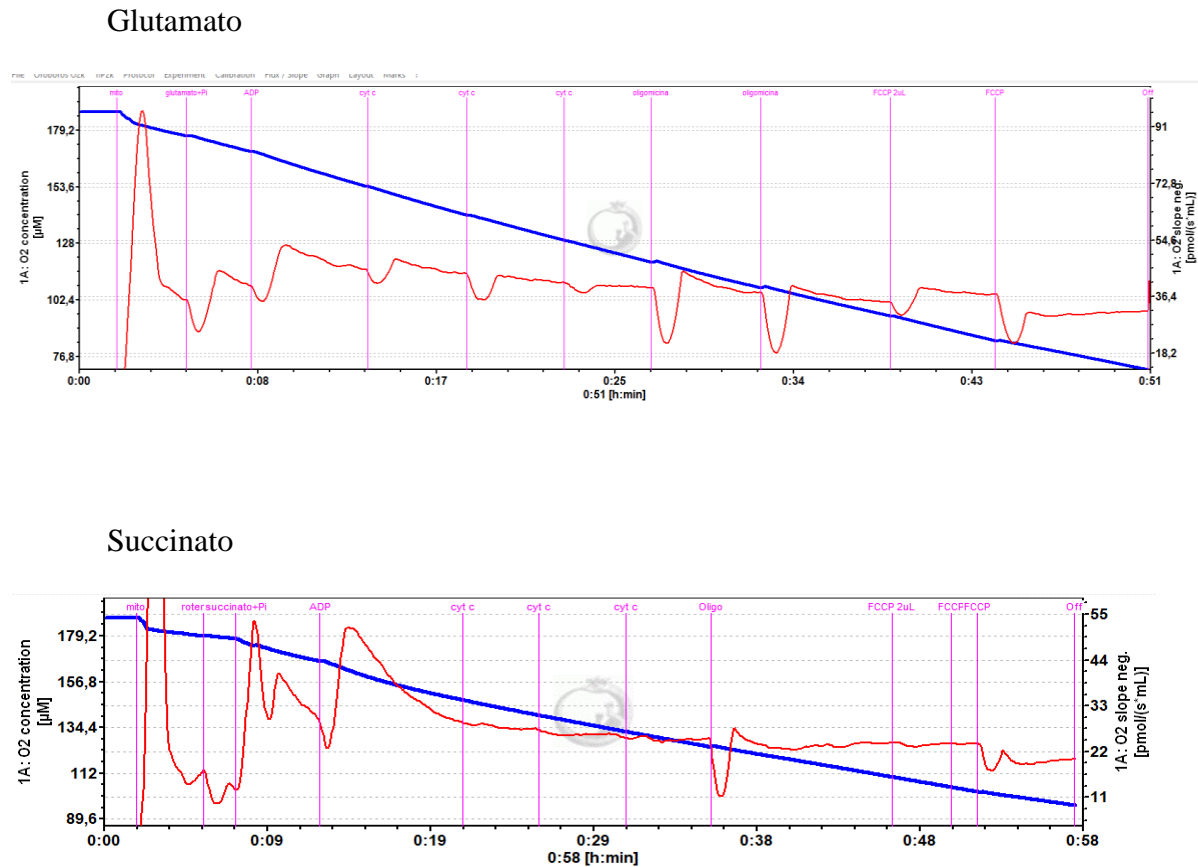
1.4.3.3. Ensayos de evaluación de integridad mitocondrial

El citocromo c es una proteína de bajo peso molecular (12 kDa) localizada en el espacio intermembrana, involucrada en el consumo de oxígeno y transporte de electrones desde el complejo III al complejo IV. Cuando la membrana mitocondrial sufre algún tipo de daño, se libera el citocromo c y el consumo de oxígeno se reduce (Djafarzadeh & Jakob, 2017; Dröse & Brandt, 2012). De esta manera, cuando se adiciona citocromo c exógeno, cualquier aumento en el consumo de oxígeno mitocondrial es indicativo de una membrana alterada (Djafarzadeh & Jakob, 2017). Por ello, para confirmar o refutar la integridad mitocondrial de las mitocondrias aisladas, se adicionó Citocromo c (10 μ M) a cada cámara del Oxígrafo.

Los ensayos se realizaron para mitocondrias de larvas L4, empleando los sustratos glutamato y succinato. Los niveles de consumo de oxígeno aumentaron al adicionar ADP, especialmente con el sustrato succinato. Al adicionar el Citocromo c, se observó el comportamiento esperado para mitocondrias integras, es decir, no se evidenció un aumento el consumo de oxígeno y la curva se mantuvo estable (Figura 8). De esta manera, los resultados obtenidos podrían probar la integridad de la membrana mitocondrial externa de los aislamientos, aun cuando los valores de CCR son menores a 3.

Figura 8

Consumo de oxígeno en mitocondrias aisladas de larvas L4 de *Ae. aegypti* empleando glutamato y succinato como sustrato con adición de Citocromo c (10 μ M). La línea azul representa la concentración de oxígeno en el medio. La línea roja representa el flujo de oxígeno en $\text{pmol}/(\text{seg} \cdot \text{mL})$.



1.4.4 Medición de respiración sobre larvas, pupas y tórax de hembras permeabilizados

La técnica de permeabilización de tejidos permite la evaluación de la fisiología mitocondrial *in vivo* sin emplear procedimientos mecánicos o químicos para el aislamiento de mitocondrias que pueden ocasionar potenciales alteraciones estructurales y funcionales (Beenackers, Van der Horst, *et al.*, 1984; Saks *et al.*, 1998). Debido a que el músculo esquelético cumple funciones similares de locomoción y movimiento en diferentes especies animales, este

tejido ha sido el más empleado en las técnicas de permeabilización, especialmente en invertebrados (Barron & Tahmisian, 1948).

Los primeros estudios que describen la fisiología mitocondrial en tejido permeabilizado de insectos fueron realizados en cucarachas (Barron & Tahmisian, 1948), moscas (*Musca domestica*, *Glossina morsitans*, *Sarophaga nodosa*) (Bursell, 1975; Sacktor, 1953) y saltamontes (Candy, 1970). Con respecto a estudios enfocados en especies de importancia médica, Gaviraghi y Oliveira (2019) describen un protocolo para evaluar la fisiología mitocondrial de *Ae. aegypti* empleando músculo del vuelo mecánicamente permeabilizado, permitiendo la obtención de resultados con el uso de un único individuo adulto.

De esta manera, con el fin de conocer si el proceso de aislamiento de mitocondrias tiene alguna influencia en la calidad e integridad de las mitocondrias aisladas para cada fase de desarrollo, se empleó tejido íntegro permeabilizado, disminuyendo al máximo su manipulación y procurando mantener la integridad de las mitocondrias evaluadas. Para ello, se tomaron larvas, pupas y tórax disectados de hembras, los cuales se usaron para la medición directa de consumo de oxígeno en idénticas condiciones a las evaluadas para mitocondrias aisladas.

1.4.4.1. Valores respiratorios en larvas permeabilizadas

Inicialmente, se evaluó una única larva L4 de *Ae. aegypti* en cada cámara de respiración. Los valores de consumo de oxígeno más altos se observaron con el sustrato glutamato en todos los estados respiratorios, con valores de oxígeno consumido para el estado 3 de $8,8 \pm 1,9$ pmol/(s*mL), estado 4 de $6,9 \pm 1,3$ pmol/(s*mL), estado 4 inducido de $6,1 \pm 0,9$ pmol/(s*mL) y respiración en presencia de FCCP de $6,1 \pm 1,1$ pmol/(s*mL). El segundo sustrato con mayor registro de consumo de oxígeno fue succinato, con valores para el estado 3 de $8,0 \pm 1,7$ pmol/(s*mL), estado 4 de $6,5$

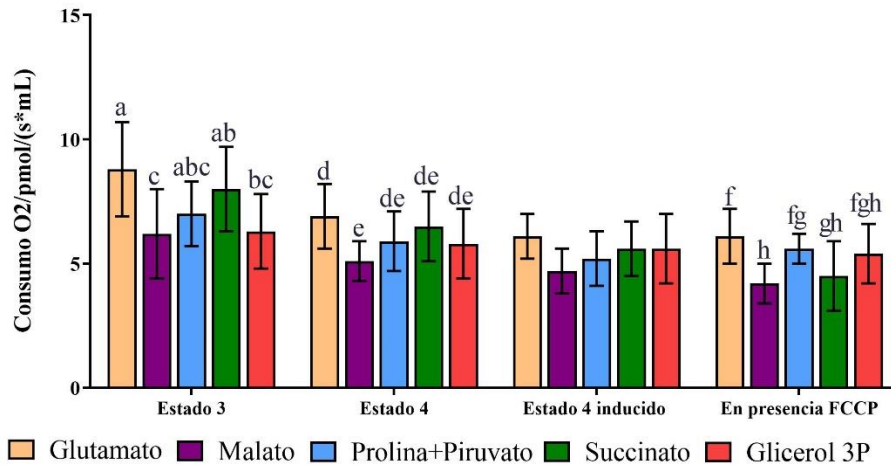
PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Ae. aegypti*

$\pm 1,4$ pmol/(s*mL), estado 4 inducido de $5,6 \pm 1,1$ pmol/(s*mL) y en presencia de FCCP de $4,5 \pm 1,4$ pmol/(s*mL) (Figura 9).

Al comparar los sustratos empleados en cada estado respiratorio con una larva L4, para el estado 3 se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los sustratos glutamato-malato (ANOVA: $F= 5,508$, $df=4$, $p= 0,003377$), glutamato-G3P (ANOVA: $F= 5,508$, $df=4$, $p= 0,007624$) y malato-succinato (ANOVA: $F= 5,508$, $df=4$, $p= 0,042760$). Para el estado 4 se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre glutamato-malato (ANOVA: $F= 2,776$, $df=4$, $p= 0,040737$). Para el estado 4 inducido no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre sustratos (ANOVA: $F= 1,991$, $df=4$, $p \geq 0,05$). Para el estado en presencia de FCCP se encontraron diferencias estadísticas significativas entre glutamato-succinato (ANOVA: $F= 5,823$, $df=4$, $p= 0,029338$), glutamato-malato (ANOVA: $F= 5,823$, $df=4$, $p= 0,001433$) y malato- prolina+piruvato (ANOVA: $F= 5,823$, $df=4$, $p= 0,013452$) (Figura 9).

Figura 9

*Consumo de oxígeno (pmol/(seg*mL)) de 1 larva permeabilizada en fase L4 de Aedes aegypti para los estados respiratorios estado 3, estado 4, estado 4 Inducido con oligomicina y respiración en presencia de FCCP (mitocondrias desacopladas). Se emplearon los sustratos oxidables glutamato, malato, prolina+piruvato, succinato y G3P. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre ^{a,b,c} Sustratos oxidables para estado 3 (Tukey test $F= 5,508$, $df=4$, $p \leq 0,05$). ^{d,e} Sustratos oxidables para estado 4 (ANOVA: $F= 2,776$, $df=4$, $p \leq 0,05$). ^{f,g,h} Sustratos oxidables para respiración en presencia de FCCP (ANOVA: $F= 5,823$, $df=4$, $p \leq 0,05$)*



Considerando los valores de consumo de oxígeno obtenidos con una larva, se verificó si estos valores son proporcionales al número de individuos permeabilizados empleados. Para ello, también se evaluó el consumo de oxígeno al emplear 5 larvas L4 de *Ae. aegypti* permeabilizadas en cada cámara de respiración. Los valores más altos de consumo de oxígeno se observaron con el sustrato succinato en todos los estados respiratorios, con valores de oxígeno consumido para el estado 3 de $48,8 \pm 1,8$ pmol/(s*mL), estado 4 de $45,1 \pm 1,7$ pmol/(s*mL), estado 4 inducido de $44,7 \pm 2,3$ pmol/(s*mL) y respiración en presencia de FCCP de $40,9 \pm 2,1$ pmol/(s*mL) (Figura 10).

Al comparar los sustratos empleados en cada estado respiratorio con 5 larvas L4, para el estado 3 se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los sustratos glutamato-succinato (ANOVA: $F= 59,41$, $df=4$, $p= 0,000133$), glutamato-malato (ANOVA: $F= 59,41$, $df=4$, $p= 0,000134$), glutamato-G3P (ANOVA: $F= 59,41$, $df=4$, $p= 0,000133$), malato-succinato (ANOVA: $F= 59,41$, $df=4$, $p= 0,000150$), malato- prolina+piruvato (ANOVA: $F= 59,41$, $df=4$, $p= 0,000151$), succinato- prolina+piruvato (ANOVA: $F= 59,41$, $df=4$, $p= 0,000133$), G3P- prolina+piruvato (ANOVA: $F= 59,41$, $df=4$, $p= 0,000133$), succinato-malato (ANOVA: $F= 59,41$, $df=4$, $p= 0,000150$), succinato-G3P (ANOVA: $F= 59,41$, $df=4$, $p= 0,001850$). Para el estado 4 se

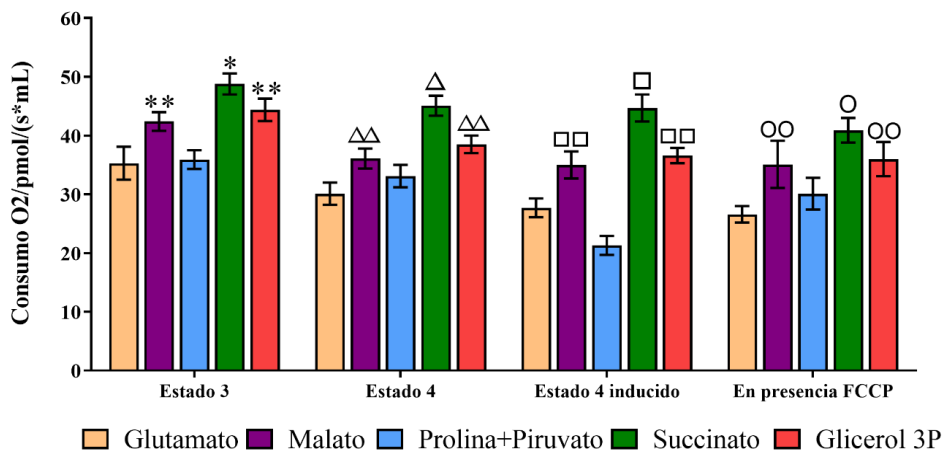
PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Ae. aegypti*

encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los sustratos glutamato-succinato (ANOVA: $F= 79,77$, $df=4$, $p= 0,000133$), glutamato-malato (ANOVA: $F= 79,77$, $df=4$, $p= 0,000135$), glutamato- prolina+piruvato (ANOVA: $F= 79,77$, $df=4$, $p= 0,017198$), glutamato-G3P (ANOVA: $F= 79,77$, $df=4$, $p= 0,000133$), malato-succinato (ANOVA: $F= 79,77$, $df=4$, $p= 0,000133$), malato- prolina+piruvato (ANOVA: $F= 79,77$, $df=4$, $p= 0,031288$), succinato- prolina+piruvato (ANOVA: $F= 79,77$, $df=4$, $p= 0,000133$), succinato+G3P (ANOVA: $F= 79,77$, $df=4$, $p= 0,000133$), prolina+piruvato -G3P (ANOVA: $F= 79,77$, $df=4$, $p= 0,000141$), G3P-succinato (ANOVA: $F= 59,41$, $df=4$, $p= 0,001850$) (Figura 10).

Para el estado 4 inducido se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los sustratos glutamato-succinato (ANOVA: $F= 90,93$, $df=4$, $p= 0,000133$), glutamato-malato (ANOVA: $F= 90,93$, $df=4$, $p= 0,000133$), glutamato- prolina+piruvato (ANOVA: $F= 90,93$, $df=4$, $p= 0,004883$), glutamato-G3P (ANOVA: $F= 90,93$, $df=4$, $p= 0,000133$), malato-succinato (ANOVA: $F= 90,93$, $df=4$, $p= 0,000133$), malato- prolina+piruvato (ANOVA: $F= 90,93$, $df=4$, $p= 0,009019$), succinato- prolina+piruvato (ANOVA: $F= 90,93$, $df=4$, $p= 0,000133$), succinato+G3P (ANOVA: $F= 90,93$, $df=4$, $p= 0,000133$), prolina+piruvato -G3P (ANOVA: $F= 90,93$, $df=4$, $p= 0,000161$). Para la respiración en presencia de FCCP se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los sustratos glutamato-succinato (ANOVA: $F= 31,328$, $df=4$, $p= 0,000133$), glutamato-malato (ANOVA: $F= 31,328$, $df=4$, $p= 0,00147$), glutamato- G3P (ANOVA: $F= 31,328$, $df=4$, $p= 0,000147$), malato-succinato (ANOVA: $F= 31,328$, $df=4$, $p= 0,004190$), malato- prolina+piruvato (ANOVA: $F= 31,328$, $df=4$, $p= 0,016976$), succinato- prolina+piruvato (ANOVA: $F= 31,328$, $df=4$, $p= 0,000133$), succinato+G3P (ANOVA: $F= 90,93$, $df=4$, $p= 0,004190$), prolina+piruvato -G3P (ANOVA: $F= 31,328$, $df=4$, $p= 0,001771$) (Figura 10).

Figura 10

Consumo de oxígeno ($\text{pmol}/(\text{seg} \cdot \text{mL})$) de 5 larvas permeabilizada en fase L4 de *Aedes aegypti* para los estados respiratorios estado 3, estado 4, estado 4 Inducido con oligomicina y respiración en presencia de FCCP (mitocondrias desacopladas). Se emplearon los sustratos oxidables glutamato, malato, prolina+piruvato, succinato y G3P. Símbolos diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre *, ** Sustratos oxidables para estado 3 (ANOVA: $F= 59,41$, $df=4$, $p \leq 0,05$). Δ , $\Delta\Delta$ Sustratos oxidables para estado 4 (ANOVA: $F= 79,77$, $df=4$, $p \leq 0,05$). \square , $\square\square$ Sustratos oxidables para estado 4 inducido (ANOVA: $F= 9,93$, $df=4$, $p \leq 0,05$). $^{\circ}$, $^{\circ\circ}$ Sustratos oxidables para la respiración en presencia de FCCP (ANOVA: $F= 31,328$, $df=4$, $p \leq 0,05$).



-Comparación entre número de larvas permeabilizadas

Se compararon los valores de consumo de oxígeno entre 1 y 5 larvas para los valores más altos entre sustratos, es decir, entre glutamato (para 1 larva) y succinato (para 5 larvas). Los valores respiratorios mitocondriales fueron más altos al emplear 5 larvas permeabilizadas, con valores por encima de $30 \text{ pmol}/(\text{seg} \cdot \text{mL})$ (Figura 11).

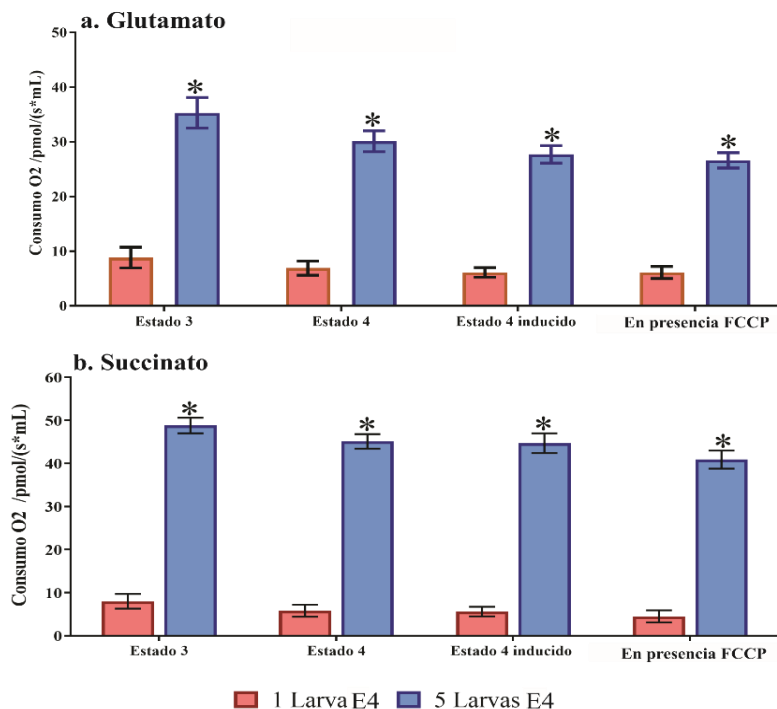
Para el sustrato glutamato se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre 1 y 5 larvas en todos los estados respiratorios evaluados: estado 3 (Mann-Whitney U Test

PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Ae. aegypti*

p=0,001194), estado 4 (Mann-Whitney U Test p=0,001194), estado 4 inducido (Mann-Whitney U Test p=0,001194), respiración en presencia de FCCP (Mann-Whitney U Test p=0,000778) (Figura 11). Para el sustrato succinato, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre 1 y 5 larvas en todos los estados respiratorios evaluados: estado 3 (Mann-Whitney U Test p=0,000636), estado 4 (Mann-Whitney U Test p=0,000636), estado 4 inducido (Mann-Whitney U Test p=0,000636), respiración en presencia de FCCP (Mann-Whitney U Test p=0,001194) (Figura 11). Aun cuando se compararon los sustratos con mayores valores de consumo de oxígeno, los valores obtenidos al emplear 5 larvas permeabilizadas podrían indicar que este número de individuos es apto en este tipo de ensayos, permitiendo una adecuada sensibilidad para el registro de la información.

Figura 11

*Comparación del consumo de oxígeno (pmol/(seg*mL)) de larvas permeabilizadas en fase L4 de Aedes aegypti para los estados respiratorios estado 3, estado 4, estado 4 Inducido con Oligomicina y respiración en presencia de FCCP (mitocondrias desacopladas), usando succinato y glutamato como sustratos oxidables. * Diferencias estadísticas significativas entre 1 y 5 larvas con el sustrato glutamato y succinato para cada estado respiratorio evaluado (Mann-Whitney U Test $p \leq 0,05$).*



1.4.4.2. Valores respiratorios en pupas permeabilizadas

De igual forma que con 1 y 5 larvas, se registraron los valores de consumo de oxígeno para 1 y 5 pupas permeabilizadas. Para una única pupa permeabilizada, los valores más altos de consumo de oxígeno se observaron con la combinación de sustratos prolina+piruvato en todos los estados respiratorios, con valores de oxígeno consumido para el estado 3 de $9,7 \pm 0,9$ pmol/(s*mL), estado 4 de $8,3 \pm 0,7$ pmol/(s*mL), estado 4 inducido de $7,2 \pm 0,8$ pmol/(s*mL) y respiración en presencia de FCCP de $8,5 \pm 1,5$ pmol/(s*mL). El segundo sustrato con mayor registro de consumo de oxígeno fue succinato, con valores para el estado 3 de $9,3 \pm 0,8$ pmol/(s*mL), estado 4 de $8,1 \pm 0,3$ pmol/(s*mL), estado 4 inducido de $7,9 \pm 0,7$ pmol/(s*mL) y en presencia de FCCP de $6,2 \pm 1,0$ pmol/(s*mL) (Figura 12).

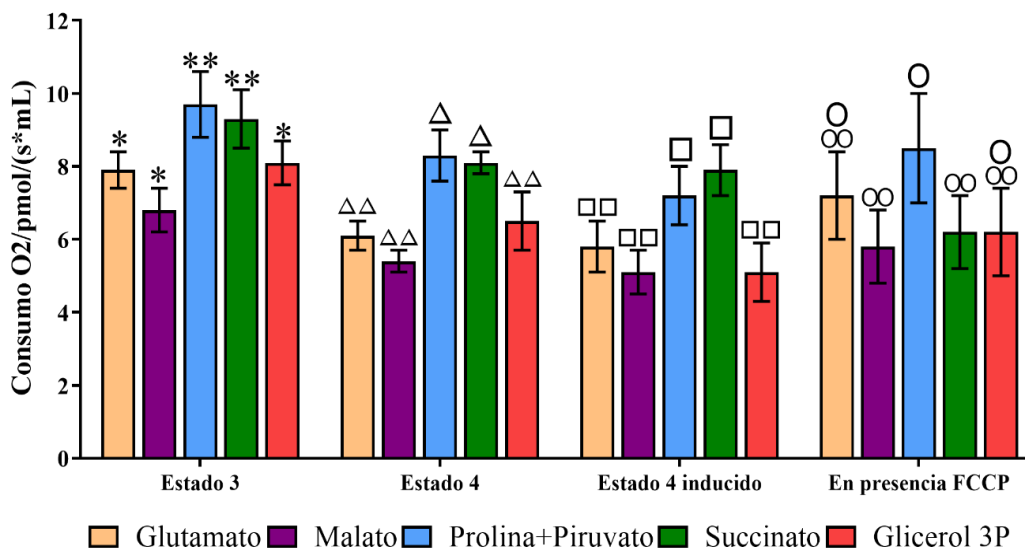
Al comparar los sustratos empleados en cada estado respiratorio con una única pupa permeabilizada, para el estado 3 se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los sustratos glutamato- prolina+piruvato (KW test: H (4, N = 48) p = 0,008274), glutamato-succinato

PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Ae. aegypti*

(KW test: H (4, N = 48) $p = 0,014627$), malato- prolina+piruvato (KW test: H (4, N = 48) $p = 0,000016$), malato-succinato (KW test: H (4, N = 48) $p = 0,000012$) (Figura 12). Para el estado 4 se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre glutamato- prolina+piruvato (KW test: H (4, N = 48) $p = 0,003396$), glutamato-succinato (KW test: H (4, N = 48) $p = 0,003589$), malato- prolina+piruvato (KW test: H (4, N = 48) $p = 0,000017$), malato-succinato (KW test: H (4, N = 48) $p = 0,00008$). Para el estado 4 inducido se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los sustratos glutamato-succinato (KW test: H (4, N = 48) $p = 0,004899$), malato-prolina+piruvato (KW test: H (4, N = 48) $p = 0,009968$), malato-succinato (KW test: H (4, N = 48) $p = 0,000022$), prolina+piruvato – G3P (KW test: H (4, N = 48) $p = 0,039440$) y succinato-G3P (KW test: H (4, N = 48) $p = 0,000362$). Para respiración en presencia de FCCP se encontraron diferencias estadísticas significativas entre succinato- prolina+piruvato (KW test: H (4, N = 45) $p = 0,049368$), malato-prolina+piruvato (KW test: H (4, N = 45) $p = 0,014853$) (Figura 12).

Figura 12

*Consumo de oxígeno (pmol/(seg*mL)) de 1 pupa permeabilizada de Aedes aegypti para los estados respiratorios estado 3, estado 4, estado 4 Inducido con oligomicina y respiración en presencia de FCCP (mitocondrias desacopladas). Se emplearon los sustratos oxidables glutamato, malato, prolina+piruvato, succinato y G3P. Símbolos diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre *, ** Sustratos oxidables para estado 3 (KW test: H (4, N = 48) $p \leq 0,05$). Δ , $\Delta\Delta$ Sustratos oxidables para estado 4 (KW test: H (4, N = 48) $p \leq 0,05$). \square , $\square\square$ Sustratos oxidables para estado 4 inducido (KW test: H (4, N = 48) $p \leq 0,05$). $^{\circ}$, $^{\circ\circ}$ Sustratos oxidables para respiración en presencia de FCCP (KW test: H (4, N = 48) $p \leq 0,05$).*



De manera análoga a los experimentos realizados con larvas permeabilizadas, se verificó si estos valores de consumo de oxígeno son proporcionales al número de individuos permeabilizados empleados. Para ello, se evaluó el consumo de oxígeno al emplear 5 pupas de *Ae. aegypti* permeabilizadas en cada cámara de respiración. Los valores más altos de consumo de oxígeno se observaron con el sustrato succinato en todos los estados respiratorios, con valores de oxígeno consumido para el estado 3 de $47,4 \pm 2,2$ pmol/(s*mL), estado 4 de $44,1 \pm 2,8$ pmol/(s*mL), estado 4 inducido de $43,5 \pm 2,5$ pmol/(s*mL) y respiración en presencia de FCCP de $27,1 \pm 4,1$ pmol/(s*mL) (Figura 13).

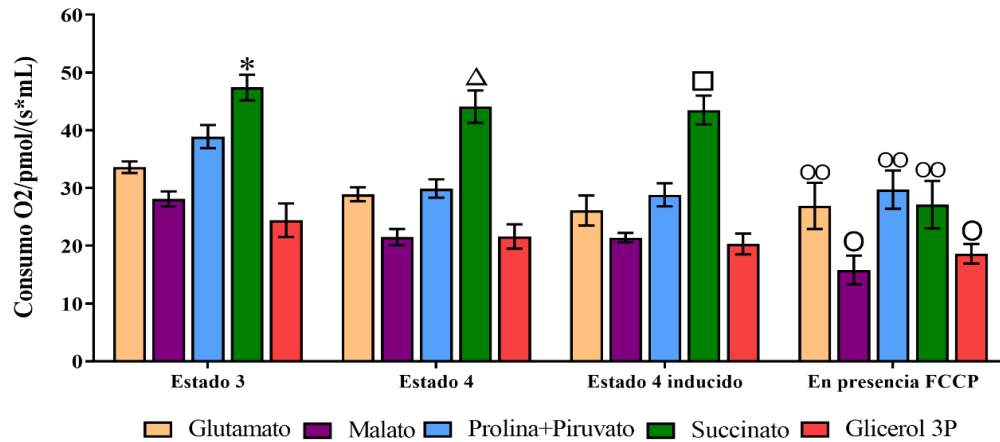
Al comparar los sustratos empleados en cada estado respiratorio con cinco pupas permeabilizadas, para el estado 3 se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los sustratos glutamato-G3P (KW test: H (4, N = 32) $p = 0,003593$), malato- succinato (KW test: H (4, N = 32) $p = 0,010209$), prolina+piruvato-succinato (KW test: H (4, N = 32) $p = 0,010209$), succinato-glutamato (KW test: H (4, N = 32) $p = 0,01029$), succinato-G3P (KW test: H (4, N = 32) $p = 0,00043$). Para el estado 4 se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre malato-succinato (KW test: H (4, N = 32) $p = 0,001585$), prolina+piruvato-succinato (KW test: H

PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Ae. aegypti*

(4, N = 32) $p = 0,001585$), succinato– G3P (KW test: H (4, N = 32) $p = 0,008771$), succinato– glutamato (KW test: H (4, N = 32) $p = 0,001585$). Para el estado 4 inducido se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los sustratos glutamato-G3P (KW test: H (4, N = 32) $p = 0,028293$), malato-succinato (KW test: H (4, N = 32) $p = 0,004589$), prolina+piruvato-succinato (KW test: H (4, N = 32) $p = 0,004589$), succinato– glutamato (KW test: H (4, N = 32) $p = 0,004589$), succinato– G3P (KW test: H (4, N = 32) $p = 0,000554$). Para respiración en presencia de FCCP se encontraron diferencias estadísticas significativas entre glutamato-malato (KW test: H (4, N = 31) $p = 0,009940$), malato-succinato (KW test: H (4, N = 31) $p = 0,021824$), prolina+piruvato-G3P (KW test: H (4, N = 31) $p = 0,043491$), malato-prolina+piruvato (KW test: H (4, N = 31) $p = 0,001157$) (Figura 13).

Figura 13

*Consumo de oxígeno (pmol/(seg*mL)) de 5 pupas permeabilizadas de Aedes aegypti para los estados respiratorios estado 3, estado 4, estado 4 Inducido con oligomicina y respiración en presencia de FCCP (mitocondrias desacopladas). Se emplearon los sustratos oxidables glutamato, malato, prolina+piruvato, succinato y G3P. Símbolos diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre * Sustratos oxidables para estado 3 (KW test: H (4, N = 32) $p \leq 0,05$). Δ Sustratos oxidables para estado 4 (KW test: H (4, N = 32) $p \leq 0,05$). \square Sustratos oxidables para estado 4 inducido (KW test: H (4, N = 31) $p \leq 0,05$). $^{\circ}$, $^{\circ\circ}$ Sustratos oxidables en presencia de FCCP (KW test: H (4, N = 31) $p \leq 0,05$).*



-Comparación entre número de pupas permeabilizadas

Se compararon los valores de consumo de oxígeno entre 1 y 5 pupas permeabilizadas para los valores más altos entre sustratos, es decir, entre prolina+piruvato (para 1 pupa) y succinato (para 5 pupas). Los valores respiratorios mitocondriales fueron más altos al emplear 5 pupas permeabilizadas, con valores por encima de 30 pmol/(seg*mL) (Figura 14).

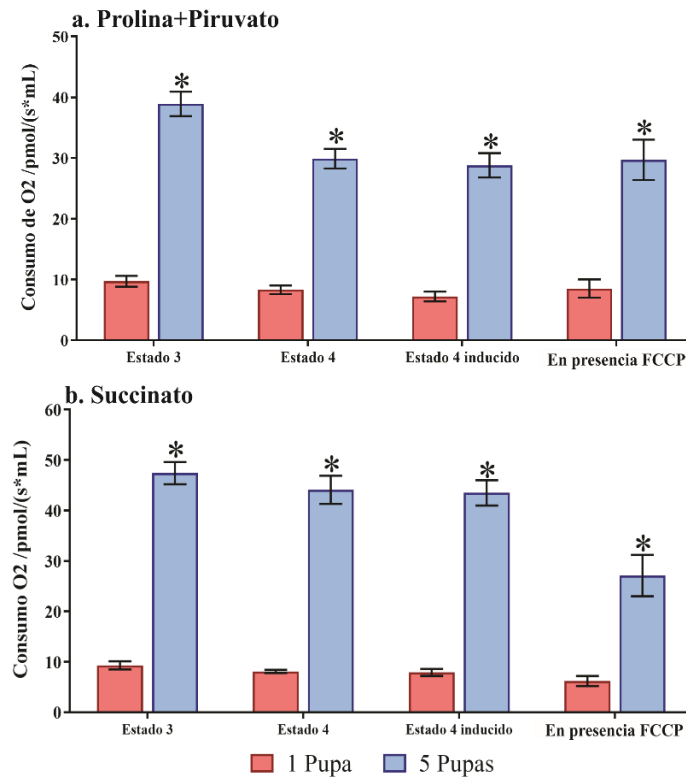
Para el sustrato prolina+piruvato se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre 1 y 5 pupas en todos los estados respiratorios evaluados: estado 3 (Mann-Whitney U Test $p=0,001745$), estado 4 (Mann-Whitney U Test $p=0,001745$), estado 4 inducido (Mann-Whitney U Test $p=0,000855$), respiración en presencia de FCCP (Mann-Whitney U Test $p=0,002700$) (Figura 14). Para el sustrato succinato, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre 1 y 5 pupas en todos los estados respiratorios evaluados: estado 3 (Mann-Whitney U Test $p=0,000625$), estado 4 (Mann-Whitney U Test $p=0,000625$), estado 4 inducido (Mann-Whitney U Test $p=0,000625$), respiración en presencia de FCCP (Mann-Whitney U Test $p=0,000747$) (Figura 14).

Para 1 pupa permeabilizada se observaron mayores valores de consumo de oxígeno con el sustrato prolina+piruvato, mientras que con 5 pupas se observaron mayores valores con el sustrato

succinato. Este cambio puede deberse a una mayor masa mitocondrial, la cual permite una cuantificación de consumo de oxígeno en un mejor contexto fisiológico, o a la presencia de diferentes niveles de sustratos endógenos (datos no corroborados). Finalmente, los valores respiratorios obtenidos al emplear 5 pupas permeabilizadas podrían indicar que al igual que con 5 larvas permeabilizadas, este número de individuos es apto en este tipo de ensayos.

Figura 14

*Comparación del consumo de oxígeno (pmol/(seg*mL)) de pupas permeabilizadas de Aedes aegypti para los estados respiratorios estado 3, estado 4, estado 4 Inducido con oligomicina y respiración en presencia de FCCP (mitocondrias desacopladas), usando prolina+piruvato y succinato como sustratos oxidables. *Diferencias estadísticas significativas entre 1 y 5 larvas con el sustrato prolina+piruvato y succinato para cada estado respiratorio evaluado (Mann-Whitney U Test $p \leq 0,05$).*



1.4.4.3. Valores respiratorios en tórax de hembras permeabilizados

De igual forma que con las fases de larva y pupa, se registraron los valores de consumo de oxígeno para 1 y 5 tórax permeabilizados. Para un único tórax permeabilizado, se obtuvieron los valores más altos de consumo de oxígeno con el sustrato succinato en todos los estados respiratorios, con valores de oxígeno consumido para el estado 3 de $12,6 \pm 1,1$ pmol/(s*mL), estado 4 de $11,1 \pm 0,2$ pmol/(s*mL), estado 4 inducido de $10,7 \pm 0,8$ pmol/(s*mL) y respiración en presencia de FCCP de $10 \pm 0,9$ pmol/(s*mL) (Figura 15).

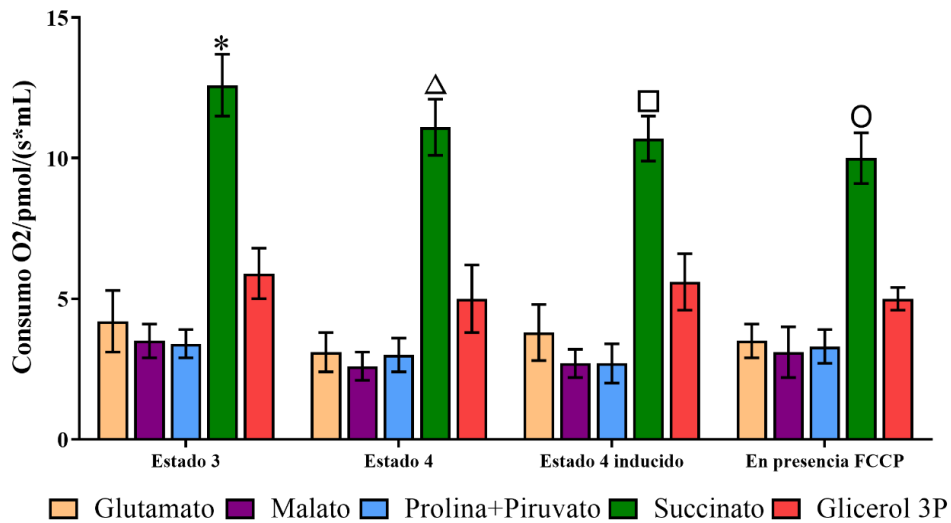
Al comparar los sustratos empleados en cada estado respiratorio con un tórax permeabilizado, para el estado 3 se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los sustratos glutamato-succinato (KW test: H (4, N = 45) p = 0,022729), malato-succinato (KW test: H (4, N = 45) p = 0,000442), malato-G3P (KW test: H (4, N = 45) p = 0,018029), succinato-G3P (KW test: H (4, N = 45) p = 0,022729), prolina+piruvato – succinato (KW test: H (4, N = 45) p = 0,000151), prolina+piruvato – G3P (KW test: H (4, N = 45) p = 0,008123) (Figura 15).

Para el estado 4 se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre glutamato-succinato (KW test: H (4, N = 45) p = 0,005305), malato-succinato (KW test: H (4, N = 45) p = 0,000141), malato-G3P (KW test: H (4, N = 45) p = 0,008840), prolina+piruvato – succinato (KW test: H (4, N = 45) p = 0,002058), succinato-G3P (KW test: H (4, N = 45) p = 0,005305). Para el estado 4 inducido se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los sustratos malato-succinato (KW test: H (4, N = 45) p = 0,000104), malato-G3P (KW test: H (4, N = 45) p = 0,005844), prolina+piruvato – succinato (KW test: H (4, N = 45) p = 0,000059), prolina+piruvato – G3P (KW test: H (4, N = 45) p = 0,004014), succinato-G3P (KW test: H (4, N = 45) p = 0,000104). Para la respiración en presencia de FCCP se encontraron diferencias estadísticas significativas entre glutamato- succinato (KW test: H (4, N = 43) p = 0,005205), malato-succinato

(KW test: H (4, N = 43) p = 0,000467), malato-G3P (KW test: H (4, N = 43) p = 0,023399), prolina+piruvato – succinato (KW test: H (4, N = 43) p = 0,001437), succinato-G3P (KW test: H (4, N = 43) p = 0,023399) (Figura 15).

Figura 15

*Consumo de oxígeno (pmol/(seg*mL)) de 1 tórax permeabilizado de Aedes aegypti para los estados respiratorios estado 3, estado 4, estado 4 Inducido con oligomicina y respiración en presencia de FCCP (mitocondrias desacopladas). Se emplearon los sustratos oxidables glutamato, malato, prolina+piruvato, succinato y G3P. Símbolos diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre * Sustratos oxidables para estado 3 (KW test: H (4, N = 45) p≤0,05). Δ Sustratos oxidables para estado 4 (KW test: H (4, N = 45) p≤0,05). □ Sustratos oxidables para estado 4 inducido (KW test: H (4, N = 45) p≤0,05). ° Sustratos oxidables para respiración en presencia de FCCP (KW test: H (4, N = 43) p≤0,05).*



Para cinco tórax permeabilizados, se obtuvieron los valores más altos de consumo de oxígeno con el sustrato succinato en todos los estados respiratorios, con valores de oxígeno consumido para el estado 3 de 27,4±2,4 pmol/(s*mL), estado 4 de 25,4±2,1 pmol/(s*mL), estado

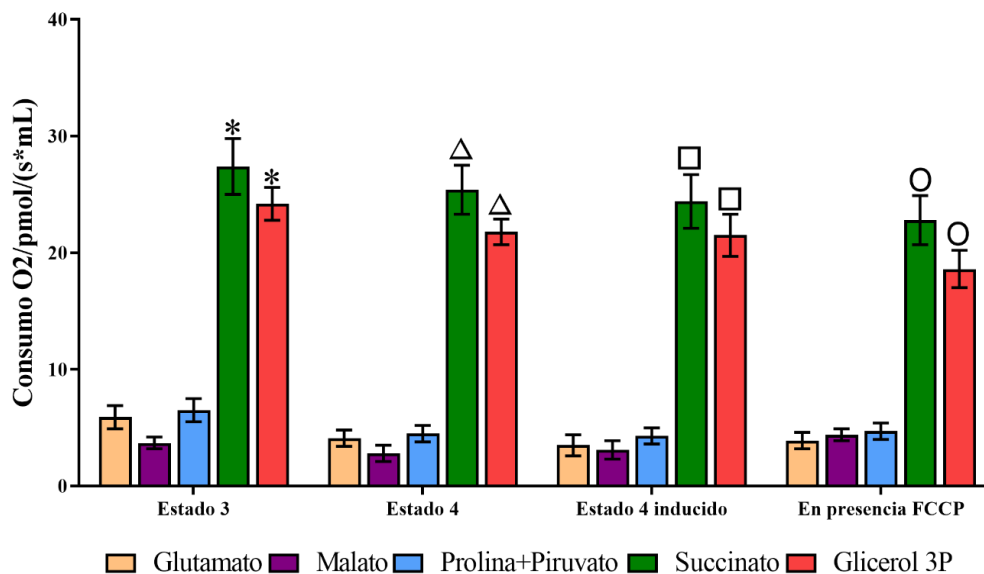
PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Ae. aegypti*

4 inducido de $24,4 \pm 2,3$ pmol/(s*mL) y respiración en presencia de FCCP de $22,8 \pm 2,1$ pmol/(s*mL). Vale la pena mencionar que el segundo sustrato con mayor registro de consumo de oxígeno fue G3P, con valores para el estado 3 de $24,2 \pm 1,4$ pmol/(s*mL), estado 4 de $21,8 \pm 1,1$ pmol/(s*mL), estado 4 inducido de $21,5 \pm 1,8$ pmol/(s*mL) y respiración en presencia de FCCP de $18,6 \pm 1,6$ pmol/(s*mL) (Figura 16).

Al comparar los sustratos empleados en cada estado respiratorio con cinco tórax permeabilizados, para el estado 3 se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los sustratos glutamato-succinato (KW test: H (4, N = 38) p = 0,033003), malato-succinato (KW test: H (4, N = 38) p = 0,000004), malato-G3P (KW test: H (4, N = 38) p = 0,000177). Para el estado 4 se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre glutamato- succinato (KW test: H (4, N = 38) p = 0,015278), malato-succinato (KW test: H (4, N = 38) p = 0,000008), malato-G3P (KW test: H (4, N = 38) p = 0,000598). Para el estado 4 inducido se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los sustratos glutamato-succinato (KW test: H (4, N = 38) p = 0,003625), glutamato-G3P (KW test: H (4, N = 38) p = 0,029495), malato-succinato (KW test: H (4, N = 38) p = 0,000129), malato-G3P (KW test: H (4, N = 38) p = 0,001967). Para la respiración en presencia de FCCP se encontraron diferencias estadísticas significativas entre glutamato-succinato (KW test: H (4, N = 37) p = 0,000354), glutamato- G3P (KW test: H (4, N = 37) p = 0,007777), malato-succinato (KW test: H (4, N = 37) p = 0,001804), malato-G3P (KW test: H (4, N = 37) p = 0,036128), prolina+piruvato – succinato (KW test: H (4, N = 37) p = 0,033570) (Figura 16).

Figura 16

Consumo de oxígeno (pmol/(seg*mL)) de 5 tórax permeabilizados de *Aedes aegypti* para los estados respiratorios estado 3, estado 4, estado 4 Inducido con oligomicina y respiración en presencia de FCCP (mitocondrias desacopladas). Se emplearon los sustratos oxidables glutamato, malato, prolina+piruvato, succinato y G3P. Símbolos diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre * Sustratos oxidables para estado 3 (KW test: $H(4, N = 38) p \leq 0,05$). Δ Sustratos oxidables para estado 4 (KW test: $H(4, N = 38) p \leq 0,05$). \square Sustratos oxidables para estado 4 inducido (KW test: $H(4, N = 38) p \leq 0,05$). \circ Sustratos oxidables para respiración en presencia de FCCP (KW test: $H(4, N = 37) p \leq 0,05$).



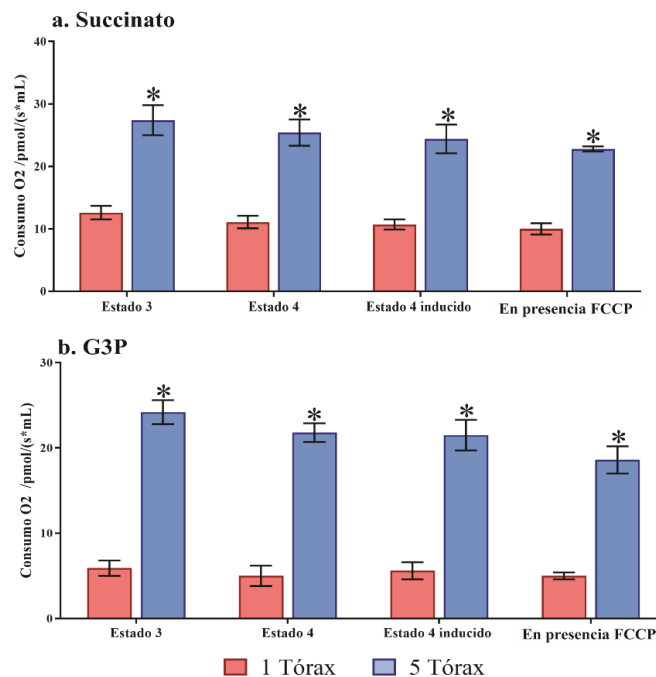
-Comparación entre número de tórax permeabilizados

Se compararon los valores de consumo de oxígeno entre 1 y 5 tórax permeabilizados para los valores más altos entre sustratos, es decir, entre succinato (para 1 tórax) y G3P (para 5 tórax). Los valores respiratorios mitocondriales fueron más altos al emplear 5 tórax permeabilizados, con valores por encima de 20 pmol/(seg*mL) (Figura 17).

Para el sustrato succinato se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre 1 y 5 tórax en todos los estados respiratorios evaluados: estado 3 (Mann-Whitney U Test $p=0,003948$), estado 4 (Mann-Whitney U Test $p=0,003948$), estado 4 inducido (Mann-Whitney U Test $p=0,003948$), respiración en presencia de FCCP (Mann-Whitney U Test $p=0,003948$) (Figura 17). Para el sustrato G3P se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre 1 y 5 tórax en todos los estados respiratorios evaluados: estado 3 (Mann-Whitney U Test $p=0,002700$), estado 4 (Mann-Whitney U Test $p=0,002700$), estado 4 inducido (Mann-Whitney U Test $p=0,002700$), respiración en presencia de FCCP (Mann-Whitney U Test $p=0,003948$) (Figura 17).

Figura 17

*Comparación del consumo de oxígeno ($\text{pmol}/(\text{seg} \cdot \text{mL})$) de tórax permeabilizados de *Aedes aegypti* para los estados respiratorios estado 3, estado 4, estado 4 inducido con oligomicina y respiración en presencia de FCCP (mitocondrias desacopladas), usando succinato y G3P como sustratos oxidables. * Diferencias estadísticas significativas entre 1 y 5 larvas con el sustrato succinato y G3P para cada estado respiratorio evaluado (Mann-Whitney U Test $p \leq 0,05$).*



1.4.4.4. Comparación de valores respiratorios entre individuos permeabilizados en las todas las fases de desarrollo

Una vez obtenidos los valores respiratorios en individuos permeabilizados, se procedió a la comparación respectiva entre fases. Para ello, se compararon los valores respiratorios en estado 3 para cada sustrato oxidable y cada fase de desarrollo, denotando una gran diferencia entre los valores obtenidos para 1 y 5 individuos permeabilizados. Con 1 individuo, los valores más altos de consumo de oxígeno para larvas se registraron con el sustrato glutamato ($8,8 \pm 1,9$ pmol/(s*mL)) y succinato ($8,0 \pm 1,7$ pmol/(s*mL)); para pupas fue el sustrato prolina+piruvato ($9,7 \pm 0,9$ pmol/(s*mL)) y succinato ($9,3 \pm 0,8$ pmol/(s*mL)); y para tórax de adulto fue el sustrato succinato ($12,6 \pm 1,1$ pmol/(s*mL)). Adicionalmente, no se observa ninguna línea de tendencia en el consumo de oxígeno en las fases de desarrollo. Al realizar la comparación estadística entre fases por cada sustrato empleado, se encontraron diferencias estadísticas significativas para el sustrato glutamato entre Larva L4 vs adulto (KW test H: (2, N=29) =19,11232 p=0,000757) y pupa vs adulto (KW test H: (2, N=29) =19,11232 p=0,000369); para malato entre Larva L4 vs adulto (Tukey test F=56,022, df=2, p= 0,000125) y pupa vs adulto (Tukey test F=56,022, df=2, p= 0,000125); para prolina+piruvato entre Larva L4 vs adulto (KW test H: (2, N=28) =22,91690 p=0,008463) y pupa vs adulto (KW test H: (2, N=28) =22,91690 p=0,000012); para succinato entre Larva L4 vs adulto (ANOVA: F=27,266, df=2, p= 0,000129) y entre pupa vs adulto (ANOVA: F=27,266, df=2, p= 0,000145); y para G3P entre Larva L4 vs pupa (ANOVA: F=8,2923, df=2, p= 0,010274) y entre pupa vs adulto (ANOVA: F=8,2923, df=2, p= 0,003254) (Figura 18a).

Por el contrario, con 5 individuos, el mayor consumo de oxígeno en todas las fases evaluadas se presentó con el sustrato succinato, permaneciendo casi estable en larva ($48,8 \pm 1,8$

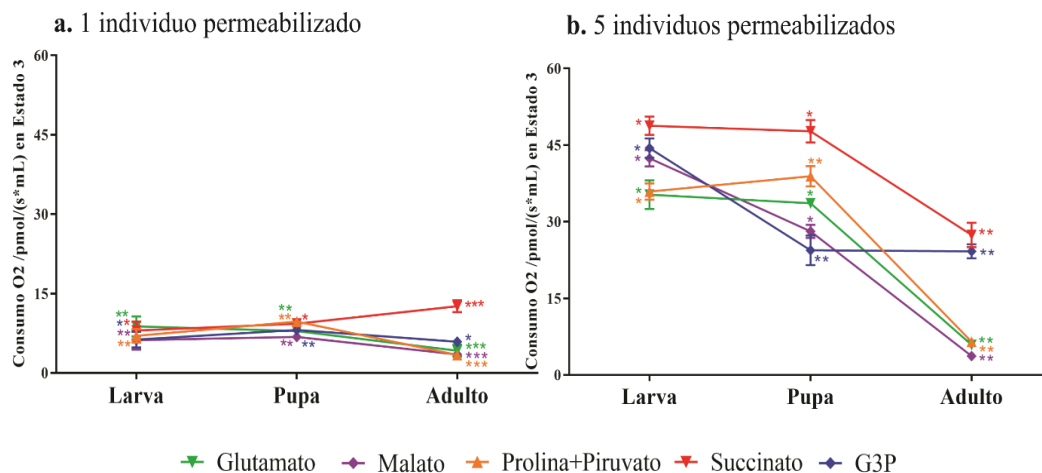
PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Ae. aegypti*

pmol/(s*mL)) y pupa ($47,4 \pm 2,2$ pmol/(s*mL)), pero disminuyendo drásticamente en adulto ($27,4 \pm 2,4$ pmol/(s*mL)). Para este sustrato se encontraron diferencias estadísticas significativas entre Larva L4 vs adulto (KW test H: (2, N=19) =12,32556 p=0,002026) y entre pupa vs adulto (KW test H: (2, N=19) =12,32556 p=0,035847) (Figura 18b). El consumo de oxígeno con los sustratos glutamato y prolina+piruvato presentó una tendencia similar en los dos sustratos, con un ligero aumento de larva a pupa, y luego una disminución drástica en la fase de adulto. Para el sustrato glutamato se encontraron diferencias estadísticas significativas entre Larva L4 vs adulto (KW test H: (2, N=22) =14,76920 p=0,000517) y entre pupa vs adulto (KW test H: (2, N=22) =14,76920 p=0,025309); para el sustrato prolina+piruvato entre Larva L4 vs adulto (KW test H: (2, N=23) =19,47826 p=0,000034) (Figura 18 b).

Figura 18

*Comparación del consumo de oxígeno (pmol/(seg*mL)) en estado 3 de individuos permeabilizados de larvas, pupas y tórax de hembras de Aedes aegypti para los sustratos oxidables glutamato, malato, prolina+piruvato, succinato y G3P. a. Un individuo permeabilizado. *Diferencias estadísticas significativas entre larvas, pupas y adultos para cada sustrato oxidable evaluado: glutamato (KW test H: (2, N=29) =19,11232 $p \leq 0,005$); malato (ANOVA: $F=56,022$, $df=2$, $p \leq 0,005$); prolina+piruvato (KW test H: (2, N=28) =22,91690 $p \leq 0,05$); succinato (ANOVA: $F=27,266$, $df=2$, $p \leq 0,05$) y G3P (ANOVA: $F=8,2923$, $df=2$, $p \leq 0,05$). b. Cinco individuos permeabilizados. *Diferencias estadísticas significativas entre larvas, pupas y adultos para cada sustrato oxidable evaluado: glutamato (KW test H: (2, N=22) =14,76920 $p \leq 0,005$); malato (KW test H: (2, N=23) =19,21739 $p \leq 0,005$); prolina+piruvato (KW test H: (2, N=23) =19,47826 $p \leq 0,05$); succinato (ANOVA: $F=27,266$, $df=2$, $p \leq 0,05$) y G3P (KW test H: (2, N=19) =12,32556 $p \leq 0,05$).*

PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Ae. aegypti*



Con el sustrato malato se obtuvo un alto consumo de oxígeno en fase de larva ($42,4 \pm 1,6$ pmol/(s*mL)), el cual disminuyó drásticamente en pupa ($28,1 \pm 1,3$ pmol/(s*mL)) y en adulto ($3,7 \pm 0,5$ pmol/(s*mL)), con diferencias estadísticas significativas entre Larva L4 vs adulto (KW test H: (2, N=23) =19,21739 p=0,000056) y entre pupa vs adulto (KW test H: (2, N=23) =19,21739 p=0,032962). Para el sustrato G3P también se presentaron altos valores de consumo de oxígeno en larvas ($4,4 \pm 1,9$ pmol/(s*mL)), seguido de una disminución drástica en pupa ($24,4 \pm 2,9$ pmol/(s*mL)), logrando permanecer estable en adulto ($24,2 \pm 1,4$ pmol/(s*mL)). Se encontraron diferencias estadísticas significativas entre Larva L4 vs pupa (KW test H: (2, N=19) =13,24632 p=0,013679) y Larva L4 vs adulto (KW test H: (2, N=19) =13,24632 p=0,003641) (Figura 18 b).

El uso del sustrato succinato fue el predominante en todas las fases de desarrollo, indicando un mayor ingreso de electrones vía Complejo II. Sin embargo, en fases juveniles (larva y pupa) fue notorio el uso de sustratos como glutamato, malato y prolina+piruvato, indicando tres vías de ingreso de electrones: vía Complejo I y II para larvas, y vía Complejo II y deshidrogenasas (Ubiquinona) para pupas. Para adultos se observa una marcada preferencia por un ingreso de electrones vía Complejo II y deshidrogenasas (Ubiquinona), en comparación con los valores observados con los demás sustratos evaluados.

Por último, vale la pena resaltar que los resultados obtenidos con 5 individuos permeabilizados fueron similares a los resultados obtenidos con mitocondrias aisladas. Adicionalmente, las diferencias entre los valores obtenidos para cada sustrato son claramente observables con 5 individuos, facilitando la comparación y análisis de los resultados. Considerando este hecho, los resultados sugieren que la evaluación de valores respiratorios se debe realizar preferiblemente con 5 individuos permeabilizados.

1.4.4.5. Cálculo del Coeficiente de Control Respiratorio (CCR) inducido en tejido permeabilizado

De igual manera a como se ejecutó para las mitocondrias aisladas, se calcularon los valores correspondientes al Coeficiente de Control Respiratorio (CCR) inducido para todas las fases de desarrollo (Larvas L4, pupas y tórax de hembras) y para cada sustrato evaluado.

Para larvas permeabilizadas, los valores más altos de CCR inducido se obtuvieron con 1 larva permeabilizada, especialmente con los sustratos glutamato ($1,5 \pm 0,4$) y succinato ($1,5 \pm 0,3$). Al comparar los valores entre los sustratos evaluados, se encontraron diferencias estadísticas significativas entre glutamato y G3P (ANOVA: $F= 3,043$, $df=4$, $p=0,031737$), y entre succinato y G3P (ANOVA: $F= 3,043$, $df=4$, $p=0,040495$). Para 5 larvas permeabilizadas, el valor más alto de CCR inducido se observó para el sustrato glutamato ($1,3 \pm 0,1$), con diferencias estadísticamente significativas entre los sustratos glutamato-succinato (KW test $H: (4, N=36) = 20,24180$ $p=0,001453$), malato-succinato (KW test $H: (4, N=36) = 20,24180$ $p=0,043508$), succinato-G3P (KW test $H: (4, N=36) = 20,24180$ $p=0,001453$) (Tabla 2).

Para pupas permeabilizadas, los valores más altos de CCR inducido se obtuvieron para 1 pupa permeabilizada con el sustrato G3P ($1,6 \pm 0,2$), con diferencias estadísticas significativas entre los sustratos glutamato-succinato (ANOVA: $F= 10,381$, $df=4$, $p=0,010017$), glutamato-G3P

PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Ae. aegypti*

(ANOVA: $F=10,381$, $df=4$, $p=0,013736$), malato-G3P (ANOVA: $F= 10,381$, $df=4$, $p=0,005105$), prolina+piruvato-G3P (ANOVA: $F= 10,381$, $df=4$, $p=0,015043$), succinato-G3P (ANOVA: $F= 10,381$, $df=4$, $p=0,000132$). Para 5 pupas permeabilizadas, el valor más alto de CCR inducido se encontró para el sustrato prolina+piruvato ($1,4 \pm 0,1$), encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre los sustratos glutamato-succinato (ANOVA: $F= 8,308$, $df=4$, $p=0,001496$), malato-succinato (ANOVA: $F= 10,381$, $df=4$, $p=0,0000625$), prolina+piruvato -succinato (ANOVA: $F= 10,381$, $df=4$, $p=0,0000625$) (Tabla 2).

Finalmente, para tórax permeabilizados, los valores más altos de CCR inducido se observaron para 5 tórax permeabilizados. Para 1 tórax permeabilizado, el valor más alto fue calculado para los sustratos malato ($1,3 \pm 0,3$) y prolina+piruvato ($1,3 \pm 0,3$), sin encontrarse diferencias estadísticas significativas entre sustratos (ANOVA: $F= 1,9131$, $df=4$, $p \geq 0,005$). Para 5 tórax permeabilizados, el valor más alto de CCR inducido calculado se encontró con el sustrato glutamato ($1,8 \pm 0,6$), y se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los sustratos glutamato-succinato (KW test H: (4, N=38) = 17,59287 $p=0,011532$) y glutamato-G3P (KW test H: (4, N=38) = 17,59287 $p=0,031399$) (Tabla 2).

Los valores obtenidos de CCR inducido para todos los individuos permeabilizados sugieren que las mitocondrias no se encontraban integras, pues los valores obtenidos se encuentran entre 1 y 1,8.

Tabla 2

Coefficiente de Control Respiratorio (CCR: Respiración estado 3 / Respiración estado 4 inducido con Oligomicina) de individuos permeabilizados de larvas L4, pupas y tórax de hembras de Aedes aegypti. Se emplearon los sustratos oxidables glutamato, malato, prolina+piruvato, succinato y G3P. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas para: ^{a,b} 1 larva entre

PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Ae. aegypti*

sustratos (Tukey test $F= 3,043$, $df=4$, $p\leq 0,05$); 5 larvas entre sustratos ^{a,b} (KW test H: (4, N=36) = 20,24180 $p\leq 0,05$; ^{c,d} 5 larvas entre sustratos (KW test H: (4, N=36) = 20,24180 $p\leq 0,05$); ^{e,f,g} 1 pupa entre sustratos (ANOVA: $F=10,381$, $df=4$, $p\leq 0,05$); ^{h,i} 5 pupas entre sustratos (ANOVA: $F= 8,308$, $df=4$, $p\leq 0,05$); ^{j,k} 5 tórax entre sustratos (KW test H: (4, N=38) = 17,59287 $p\leq 0,05$).

Fase de desarrollo	Valor CCR inducido \pm Desviación				
	Glutamato	Malato	Prolina+Piruvato	Succinato	G3P
LARVA					
1 larva	1,5 \pm 0,4 ^a	1,3 \pm 0,2 ^a	1,4 \pm 0,1 ^a	1,5 \pm 0,3 ^a	1,1 \pm 0,1 ^b
5 larvas	1,3 \pm 0,1 ^c	1,2 \pm 0,1 ^c	1,1 \pm 0,0 ^{cd}	1,1 \pm 0,0 ^d	1,2 \pm 0,1 ^c
PUPA					
1 pupa	1,4 \pm 0,2 ^e	1,3 \pm 0,1 ^{ef}	1,4 \pm 0,1 ^{ef}	1,2 \pm 0,1 ^f	1,6 \pm 0,2 ^g
5 pupas	1,3 \pm 0,1 ^h	1,3 \pm 0,1 ^h	1,4 \pm 0,1 ^h	1,1 \pm 0,1 ⁱ	1,2 \pm 0,1 ^{hi}
ADULTO					
1 tórax	1,1 \pm 0,3	1,3 \pm 0,3	1,3 \pm 0,3	1,2 \pm 0,1	1,1 \pm 0,1
5 tórax	1,8 \pm 0,6 ^j	1,2 \pm 0,2 ^{jk}	1,6 \pm 0,4 ^{jk}	1,0 \pm 0,1 ^k	1,1 \pm 0,1 ^k

1.4.4.6. Ensayos de medición de integridad mitocondrial en tejido

permeabilizado

De igual manera que con mitocondrias aisladas, se procedió a realizar las pruebas de integridad mitocondrial mediante la adición de Citocromo c (10 μ M) en presencia de ADP. Considerando que Correa *et al.* (2015) previamente publicó la medición de integridad mitocondrial en tórax de hembras y machos, realizamos la misma medición en 5 tórax permeabilizados de hembras. Se usó el sustrato succinato como sustrato oxidable teniendo en cuenta que, de acuerdo

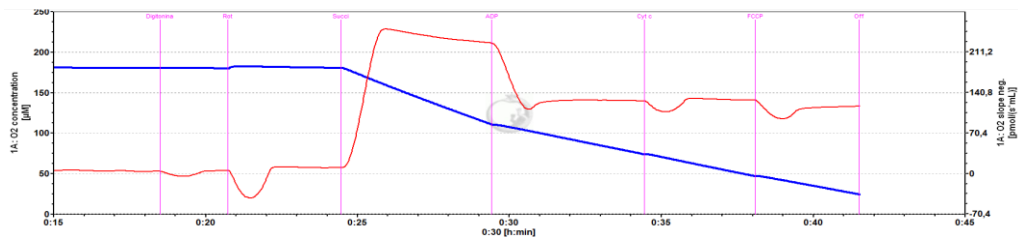
PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Ae. aegypti*

con nuestros resultados, con este sustrato se observan mayores valores respiratorios en la fase adulta.

De manera similar a lo encontrado en mitocondrias de larvas, los niveles de consumo de oxígeno al adicionar ADP no aumentaron de manera significativa. Al adicionar el Citocromo c, no se observó un aumento en los valores de consumo de oxígeno, indicativo de mitocondrias íntegras (Figura 19). Este resultado puede estar indicando que, aunque las mitocondrias se encuentren íntegras, la presencia de posibles proteínas desacopladoras incide en los valores de CCR obtenidos en cada fase de desarrollo evaluada.

Figura 19

*Grafica de consumo de oxígeno en 5 tórax permeabilizados de adultos de Ae. aegypti empleando succinato como sustrato. La línea azul representa la concentración de oxígeno en el medio. La línea roja representa el flujo de oxígeno en pmol/(seg*mL).*



1.4.5 Comparación de parámetros respiratorios de mitocondrias aisladas vs tejido permeabilizado

La comparación de los parámetros respiratorios entre mitocondrias aisladas e individuos permeabilizados se realizó únicamente para los sustratos con los cuales se obtuvieron los mayores valores de consumo de oxígeno para cada fase de desarrollo.

1.4.5.1. Comparación en Larvas L4

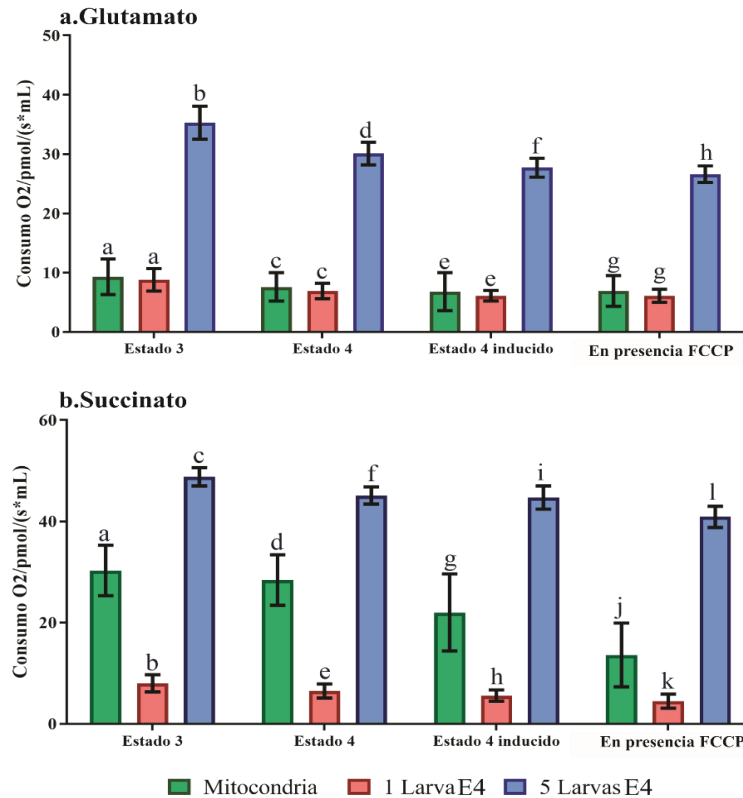
Para la fase larval, el sustrato glutamato fue el más representativo para 1 individuo permeabilizado, mientras que el sustrato succinato lo fue para mitocondrias aisladas y 5 individuos permeabilizados.

Con el sustrato glutamato, los valores más altos se observaron para 5 larvas permeabilizadas, con valores superiores a 30 pmol/(seg*mL) de oxígeno consumido. Al realizar la comparación del tipo de muestra empleado (mitocondrias aisladas, 1 ó 5 individuos permeabilizados) para cada estado respiratorio, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre mitocondrias aisladas y 5 larvas permeabilizadas para estado 3 (Mann-Whitney U Test $p=0,000108$), estado 4 (Mann-Whitney U Test $p=0,000108$), estado 4 inducido (Mann-Whitney U Test $p=0,000108$), respiración en presencia de FCCP (Mann-Whitney U Test $p=0,000108$) (Figura 20a).

Figura 20

*Comparación de consumo de oxígeno (pmol/(seg*mL)) para mitocondrias aisladas de larvas L4 y 1 – 5 larvas permeabilizadas de Aedes aegypti para los estados respiratorios estado 3, estado 4, estado 4 Inducido con oligomicina y respiración en presencia de FCCP (mitocondrias desacopladas), usando glutamato y succinato como sustratos oxidables. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre mitocondrias aisladas e individuos permeabilizados (1 y 5) para a. Sustrato glutamato ^{a,b} estado 3 (MW-U test: $p\leq 0,05$). ^{c,d} estado 4 (MW-U test: $p\leq 0,05$), ^{e,f} estado 4 inducido (MW-U test: $p\leq 0,05$) ^{g,h} respiración en presencia de FCCP (MW-U test: $p\leq 0,05$). b. Sustrato succinato ^{a,b,c} estado 3 (MW-U test: $p\leq 0,05$), ^{d,e,f} estado 4 (MW-U test:*

$p \leq 0,05$), g,h,i estado 4 inducido (MW-U test: $p \leq 0,05$), j,k,l respiración en presencia de FCCP (MW-U test: $p \leq 0,05$).



Con el sustrato succinato, los valores más altos se observaron para 5 larvas permeabilizadas, con valores superiores a 40 pmol/(seg*mL) de oxígeno consumido, seguido de mitocondrias aisladas con valores entre 13 y 30 pmol/(seg*mL). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre cada tipo de muestra empleado (mitocondrias aisladas, 1 o 5 individuos permeabilizados) para cada estado respiratorio: estado 3 (Mann-Whitney U Test $p=0,000066$), estado 4 (Mann-Whitney U Test $p=0,000006$), estado 4 inducido (Mann-Whitney U Test $p=0,000006$), respiración en presencia de FCCP (Mann-Whitney U Test $p=0,000778$) (Figura 20b).

Para la fase de larva, se observaron mayores valores de consumo de oxígeno empleando 5 individuos permeabilizados. Aunque estos valores podrían ser atribuidos al aumento en el número de individuos, los resultados obtenidos evidencian que el tipo de sustrato y la vía de ingreso de los

electrones a la mitocondria son los factores que inciden directamente en las velocidades de respiración. Prueba de ello se observa en el sustrato succinato (ingreso de electrones vía Complejo II), donde se observan diferencias estadísticas significativas entre el consumo de oxígeno de mitocondrias aisladas, 1 larva y 5 larvas permeabilizadas.

1.4.5.2. Comparación en pupas

Para la fase de pupa, el sustrato con mayores valores de consumo de oxígeno fue prolina+piruvato con 1 individuo permeabilizado, mientras que para mitocondrias aisladas y 5 individuos permeabilizados el sustrato succinato evidenció mayores tasas de respiración.

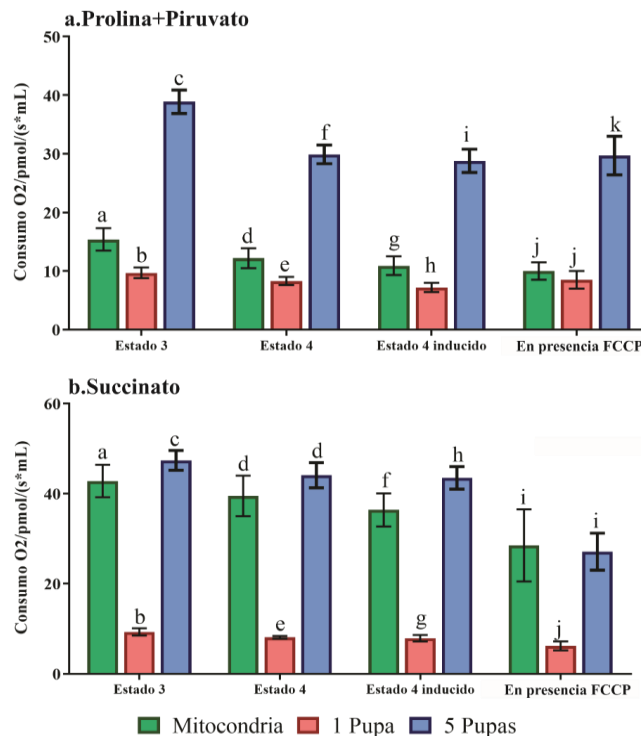
Con el sustrato prolina+piruvato, los valores más altos se observaron para 5 pupas permeabilizadas, con valores superiores a 30 pmol/(seg*mL) de oxígeno consumido. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre cada tipo de muestra empleado (mitocondrias aisladas, 1 o 5 individuos permeabilizados) para cada estado respiratorio: estado 3 (Mann-Whitney U Test $p=0,002700$), estado 4 (Mann-Whitney U Test $p=0,002700$) y estado 4 inducido (Mann-Whitney U Test $p=0,002700$). Para la respiración en presencia de FCCP únicamente se encontraron diferencias estadísticas significativas entre mitocondrias aisladas y 5 pupas permeabilizadas (Mann-Whitney U Test $p=0,003948$) (Figura 21a).

Con el sustrato succinato, los valores más altos de consumo de oxígeno se obtuvieron para 5 pupas permeabilizadas, con valores superiores a 30 pmol/(seg*mL), seguido de mitocondrias aisladas con valores entre 28 y 42 pmol/(seg*mL). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre cada tipo de muestra empleado (mitocondrias aisladas, 1 o 5 individuos permeabilizados) para el estado 3 (Mann-Whitney U Test $p=0,000625$) y estado 4 inducido (Mann-Whitney U Test $p=0,000625$). Para el estado 4 y respiración en presencia de FCCP solo se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre mitocondrias aisladas y 1 pupa

permeabilizada (Estado 4: Mann-Whitney U Test $p=0,000625$; en presencia de FCCP: Mann-Whitney U Test $p=0,000747$) (Figura 21b).

Figura 21

*Comparación de la velocidad de consumo de oxígeno (pmol/(seg*mL)) para mitocondrias aisladas de pupas y 1 – 5 pupas permeabilizadas de Aedes aegypti para los estados respiratorios estado 3, estado 4, estado 4 Inducido con oligomicina y respiración en presencia de FCCP (mitocondrias desacopladas) usando prolina+piruvato y succinato como sustratos oxidables. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre mitocondrias aisladas e individuos permeabilizados (1 y 5) para a. Sustrato prolina+piruvato ^{a,b,c} estado 3 (MW-U test: $p\leq 0,05$). ^{d,e,f} estado 4 (MW-U test: $p\leq 0,05$), ^{g,h,i} estado 4 inducido (MW-U test: $p\leq 0,05$), ^{j,k} respiración en presencia de FCCP (MW-U test: $p\leq 0,05$). b. Sustrato succinato ^{a,b,c} estado 3 (MW-U test: $p\leq 0,05$), ^{d,e} estado 4 (MW-U test: $p\leq 0,05$), ^{f,g,h} estado 4 inducido (MW-U test: $p\leq 0,05$), ^{i,j} respiración en presencia de FCCP (MW-U test: $p\leq 0,05$).*



Se observaron mayores valores de consumo de oxígeno empleando 5 individuos permeabilizados para el sustrato prolina+piruvato (ingreso de electrones vía complejo I y II) y succinato (Complejo II). Cabe mencionar que los valores de consumo de oxígeno con succinato fueron similares para mitocondrias aisladas y 5 individuos permeabilizados, corroborando que este sustrato es el más empleado para el ingreso de electrones a la cadena respiratoria en fase de pupa. Adicionalmente, se valida el uso de 5 individuos permeabilizados para la medición de la respiración mitocondrial.

1.4.5.3. Comparación en tórax de hembras adultas

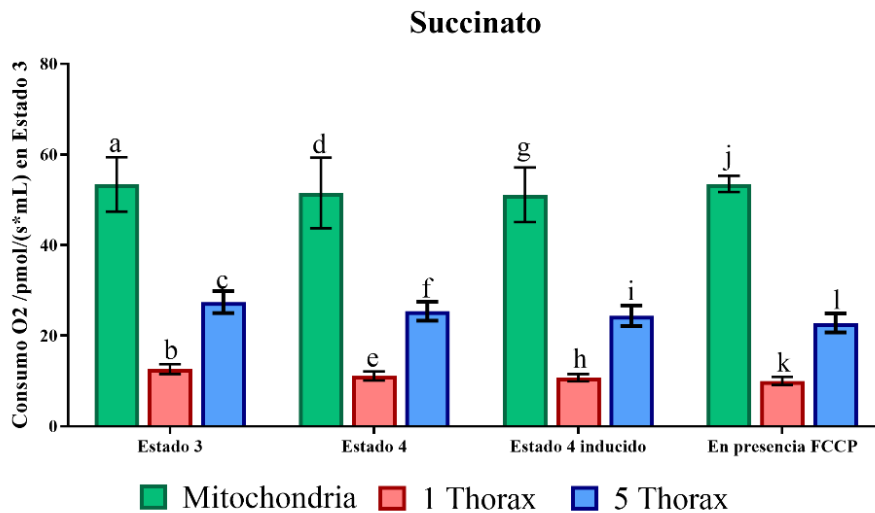
Para adultos, tanto para mitocondrias aisladas de tórax de hembras, como para tórax permeabilizados, los valores más altos de consumo de oxígeno se presentaron con el sustrato succinato. Se observaron valores más altos con mitocondrias aisladas, con valores superiores a 50 pmol/(seg*mL), mientras que los valores con tórax permeabilizados se encontraron entre 10 y 27 pmol/(seg*mL) de oxígeno consumido.

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre cada tipo de muestra empleado (mitocondrias aisladas, 1 o 5 individuos permeabilizados) para el estado 3 (Mann-Whitney U Test $p=0,003948$), estado 4 (Mann-Whitney U Test $p=0,003948$), estado 4 inducido (Mann-Whitney U Test $p=0,003948$), respiración en presencia de FCCP (Mann-Whitney U Test $p=0,045501$) (Figura 22).

Figura 22

*Comparación de la velocidad de consumo de oxígeno (pmol/(seg*mL)) para mitocondrias aisladas de tórax y 1 – 5 tórax permeabilizados de Aedes aegypti para los estados respiratorios estado 3, estado 4, estado 4 Inducido con oligomicina y respiración en presencia de FCCP (mitocondrias desacopladas) usando el sustrato succinato como sustrato oxidable. Letras*

diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre mitocondrias aisladas y tórax permeabilizados (1 y 5) para ^{a,b,c} estado 3 (MW-U test: $p \leq 0,05$). ^{d,e,f} estado 4 (MW-U test: $p \leq 0,05$), ^{g,h,i} estado 4 inducido (MW-U test: $p \leq 0,05$) ^{j,k,l} respiración en presencia de FCCP (MW-U test: $p \leq 0,05$).



Contrario a lo observado en las fases de larva y pupa, donde se observaron valores más altos de consumo de oxígeno con 5 individuos, para adultos los valores más altos de consumo de oxígeno se obtuvieron con mitocondrias aisladas. Sin embargo, el sustrato que presentó mayores velocidades de consumo de oxígeno fue succinato (Complejo II) en todas las condiciones evaluadas. Considerando que la permeabilización de tejidos proporciona un mejor contexto fisiológico mitocondrial, tal como se observó en los resultados obtenidos para las fases de larvas y pupas, el uso de 5 individuos permeabilizados constituye una metodología válida para la medición de consumo de oxígeno relacionado a la mitocondria.

1.4.5.4. Comparación entre fases de desarrollo

Considerando que los mayores valores de consumo de oxígeno fueron obtenidos con 5 individuos permeabilizados, se procedió a comparar el consumo de oxígeno en el estado 3 para

PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Ae. aegypti*

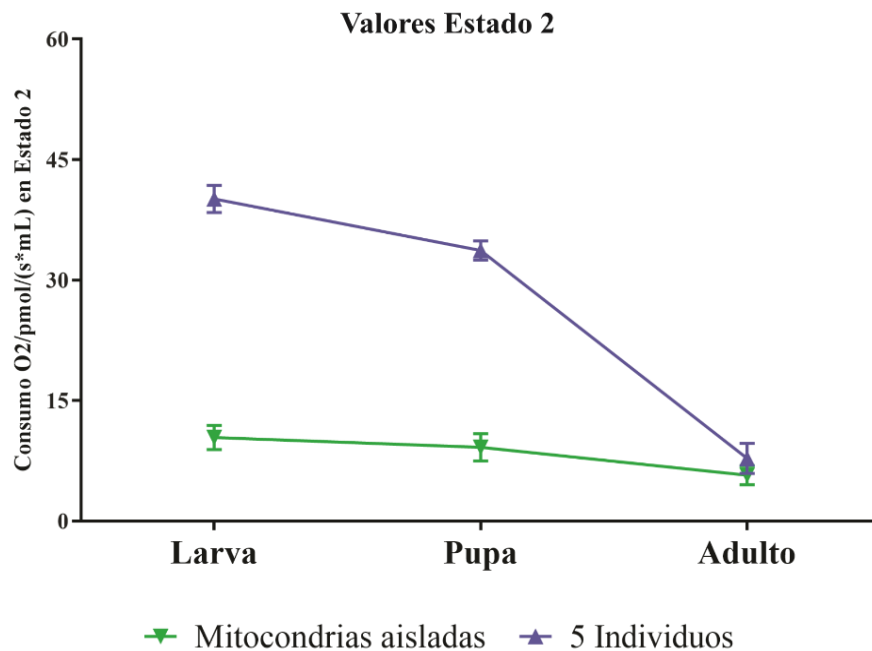
cada sustrato oxidable a lo largo de las fases de desarrollo evaluados, contrastando las mitocondrias con los individuos permeabilizados. Adicionalmente, los valores del estado 3 se compararon con los valores de respiración basal (estado 2) registrados en cada fase de desarrollo (Figura 23).

Considerando que los valores obtenidos en estado 2 son independientes del sustrato empleado, se debe tener en cuenta que se observó una mayor tasa respiratoria inicial en larvas L4, la cual fue disminuyendo progresivamente hasta decaer a valores menores de 8 pmol/(seg*mL) en la fase de adulto tanto en mitocondrias aisladas, como en tejido permeabilizado (Figura 23).

La medición del consumo de oxígeno en estado 2 permite la cuantificación de la presencia de posibles sustratos endógenos que aportan electrones a la cadena respiratoria mitocondrial. La presencia de este tipo de sustratos fue mayor en individuos permeabilizados, especialmente en las fases juveniles (larva y pupa).

Figura 23

*Consumo de oxígeno (pmol/(seg*mL)) en estado 2 para mitocondrias aisladas e individuos permeabilizados (5) de Larvas (L4), pupas y hembras adultas (tórax) de Aedes aegypti.*

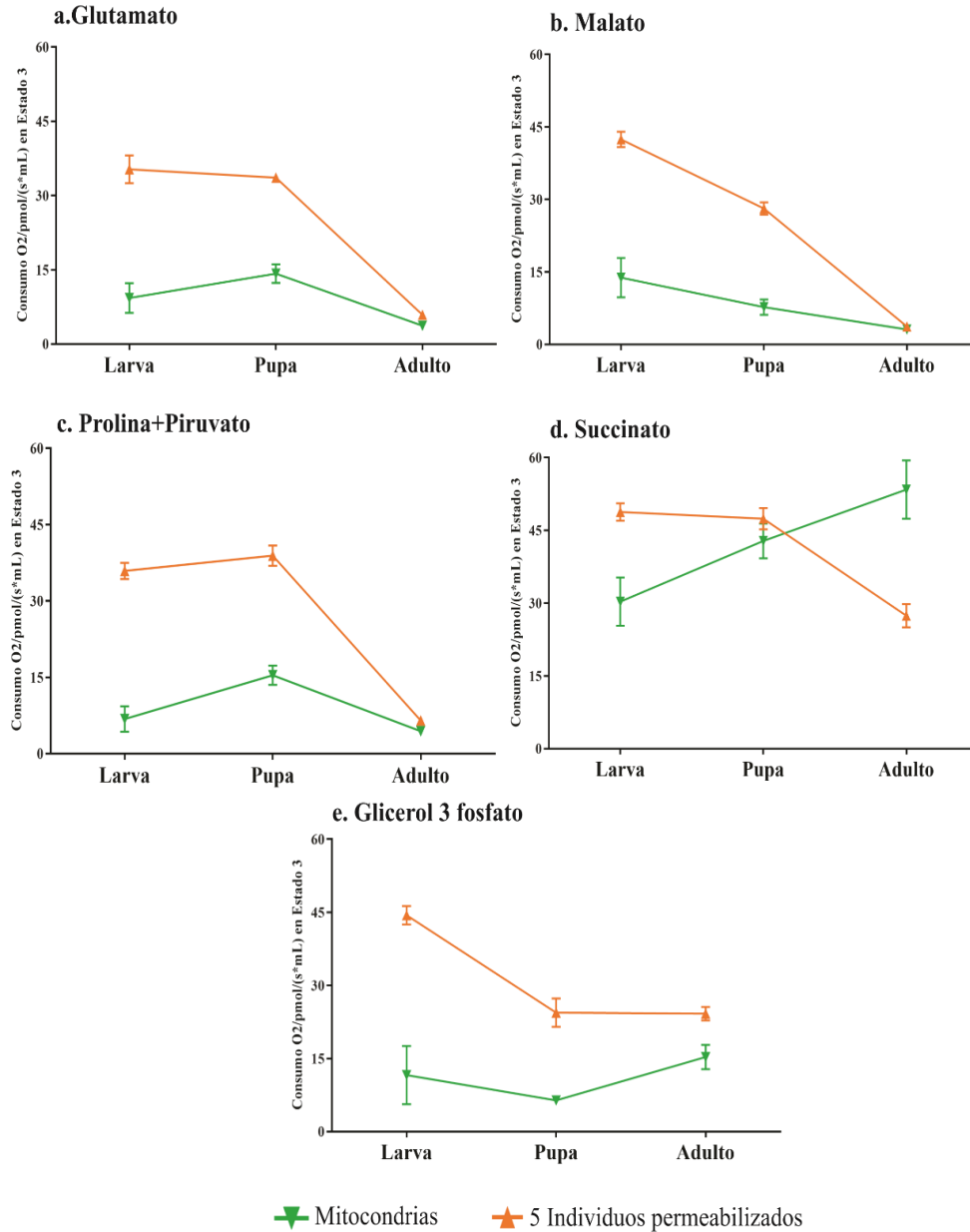


Al comparar el consumo de oxígeno en estado 3 para mitocondrias aisladas y 5 individuos permeabilizados, con el sustrato glutamato y malato se obtuvo un mayor consumo de oxígeno por parte de larvas L4, el cual disminuyó levemente en pupas y rápidamente en el adulto. Con prolina + piruvato, los valores registrados en larva L4 aumentaron levemente en pupa para reducirse en el adulto. Para succinato, con mitocondrias aisladas se observa un aumento progresivo en los valores registrados de larva L4 a adulto. Sin embargo, este comportamiento no se observa con 5 individuos permeabilizados, donde los valores disminuyen casi a la mitad de los registrados para larva y pupa. Para G3P, se obtuvo un alto consumo de oxígeno en larvas L4, el cual disminuyó para pupas. Con los adultos se observaron dos tendencias diferentes, para mitocondrias aisladas aumentó el consumo de oxígeno, pero para 5 tórax permeabilizados, los valores fueron similares a los registrados en pupas (Figura 24).

Figura 24

*Consumo de oxígeno (pmol/(seg*mL)) en estado 3 para mitocondrias aisladas e individuos permeabilizados (5) de Larvas (L4), pupas y hembras adultas (tórax) de Aedes aegypti con cada uno de los sustratos oxidables evaluados: glutamato, malato, prolina+piruvato, succinato y G3P.*

PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Ae. aegypti*



Adicionalmente, se calculó la capacidad bioenergética para mitocondrias aisladas y para tejido permeabilizado (5 individuos) (Tabla 3). La capacidad bioenergética o capacidad de fosforilación oxidativa (OXPHOS, del inglés *Oxidative Phosphorylation System*), se basa en los valores obtenidos durante el mayor consumo de oxígeno, es decir, en presencia de ADP (estado 3), a los cuales se les resta los valores obtenidos durante el estado “leak”, es decir, previo a la presencia de sustratos y ADP (estado 2) (J. Correa *et al.*, 2015).

Tabla 3

Capacidad bioenergética (OXPHOS) de mitocondrias aisladas y 5 individuos permeabilizados de larvas L4, pupas y tórax de hembras de Aedes aegypti con los sustratos oxidables glutamato, malato, prolina+piruvato, succinato y G3P.

Fase	Tipo medición	Glutamato	Malato	Prolina+piruvato	Succinato	G3P
Larva	Mito	-1,1	3,4	-3,6	19,9	1,2
	5	7,1	2,3	-4,2	8,7	4,3
Pupa	Mito	5	-1,5	6,2	33,6	-2,8
	5	-0,1	-5,6	5,2	13,7	-9,3
Adulto	Mito	-2	-2,6	-1,3	47,7	9,6
	5	-1,9	-4,1	-1,3	16,6	16,4

La capacidad bioenergética es diferente para cada sustrato y fase de desarrollo. Para larvas L4, se obtuvo una mayor fosforilación oxidativa con el sustrato succinato. Para pupa, se observó una mayor actividad OXPHOS con el sustrato succinato y prolina+piruvato. Para adultos, se obtuvo una mayor capacidad bioenergética con los sustratos succinato y G3P (Tabla 3).

1.4.6 Actividad enzimática

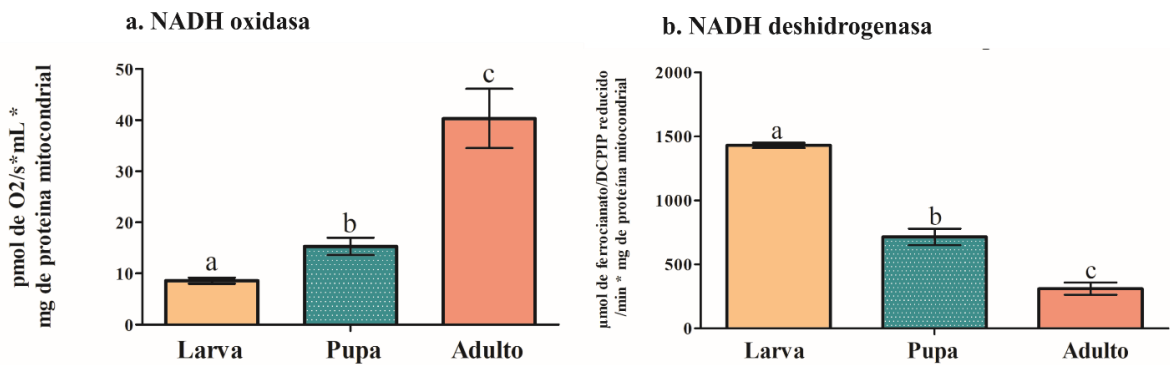
Con el fin de conocer el funcionamiento de la cadena respiratoria mitocondrial en cada una de las fases de desarrollo de *Ae. aegypti*, se evaluó el comportamiento de ocho enzimas asociadas al funcionamiento de los cuatro complejos respiratorios y la ATPasa.

1.4.6.1. Complejo I

Se evaluó el Complejo I mediante la cuantificación de las enzimas NADH oxidasa y NADH deshidrogenasa. La evaluación de la NADH oxidasa permite cuantificar el paso de los electrones provenientes del NADH a través del complejo I, los cuales pasan por los complejos III y IV. Acorde con la actividad presentada por esta enzima, se encontró un mayor paso de electrones para mitocondrias aisladas de tórax de hembras adultas con $40,3 \pm 5,8$ pmol de O_2 / seg*mL*mg de proteína, seguido por la actividad registrada para pupas $15,3 \pm 1,7$ pmol de O_2 / seg*mL*mg de proteína y larvas $8,6 \pm 0,6$ pmol de O_2 / seg*mL*mg de proteína, con diferencias estadísticamente significativas entre ellos (ANOVA: $F= 433,089$, $df=2$, $p=0,000124$) (Figura 25a).

Figura 25

*NADH Ubiquinona reductasa. Actividad de la NADH oxidasa (pmol de O_2 /(seg*mL)*mg de proteína mitocondrial) y de la NADH deshidrogenasa (μ mol de ferrocianato reducido/min*mg de proteína mitocondrial) para mitocondrias aisladas de Larvas L4, pupas y tórax de hembras de *Aedes aegypti*. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre la actividad de las enzimas para cada fase de desarrollo. a. NADH oxidasa ^{a,b,c} (ANOVA: $F= 433,089$, $df=2$, $p=0,00124$); b. NADH deshidrogenasa ^{a,b,c} (ANOVA: $F= 1954,67$, $df=2$, $p=0,000125$).*



La evaluación de la NADH deshidrogenasa cuantifica el paso de los electrones provenientes del NADH a través del complejo I vía flavin mononucleótido (FMN) hacia los centros Fe-S y de ahí hacia el receptor electrónico ferricianuro, el cual se reduce a ferrocianato. La fase de larva presentó la mayor actividad con $1430,5 \pm 21$ μmol de ferrocianato reducido/min*mg de proteína mitocondrial, indicando una mayor transferencia de electrones a través de este complejo. El segundo mayor valor observado fue para la fase de pupa con $715 \pm 64,3$ μmol de ferrocianato reducido/min* mg de proteína mitocondrial, y la menor actividad se observó en adultos con $310,2 \pm 47,2$ μmol de ferrocianato reducido/min*mg de proteína mitocondrial. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las fases evaluadas (Tukey test $F=1954,67$, $df=2$, $p=0,000125$) (Figura 25b).

Se observó una alta actividad de la NADH oxidasa para adultos, relacionada con la oxidación de sustratos vía complejo I. La actividad de esta enzima disminuyó progresivamente hasta la fase de larva, con valores de actividad más bajos. Para la NADH deshidrogenasa se observó una mayor actividad para las larvas, denotando posiblemente un mayor ingreso de electrones con el sustrato glutamato, y también con el sustrato prolina+piruvato. Si bien las pupas no presentan una actividad marcada para cada enzima, sus valores de actividad denotan el ingreso y paso eficiente de electrones a partir de NADH.

1.4.6.2. Complejo II

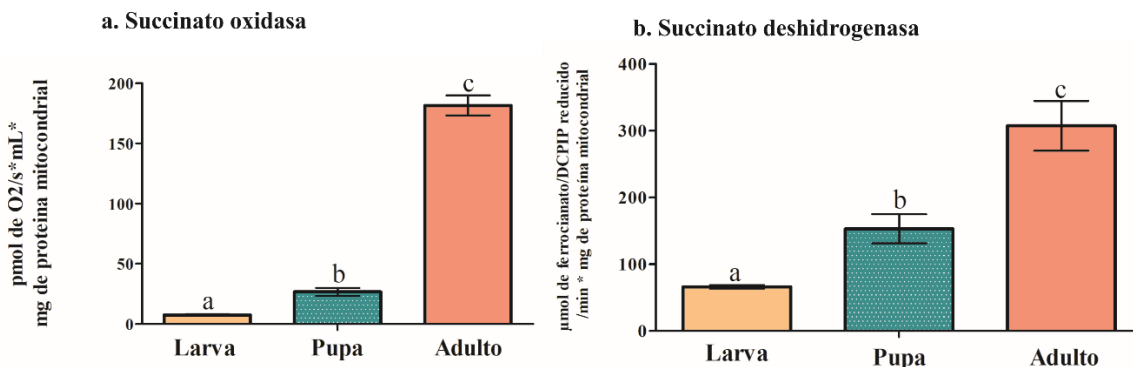
El Complejo II se evaluó mediante la cuantificación de las enzimas Succinato oxidasa y Succinato deshidrogenasa. La evaluación de la Succinato oxidasa permite cuantificar el paso de los electrones provenientes del succinato que pasan a través del Complejo II hacia los complejos III y IV. Se observó un mayor ingreso de electrones para mitocondrias aisladas de tórax de hembras adultas con $181,5 \pm 8,3$ pmol de O_2 / seg*mL*mg de proteína, seguido de la actividad registrada

PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Ae. aegypti*

para pupas $26,7 \pm 3,2$ pmol de O_2 / seg*mL*mg de proteína y, por último, la actividad de larvas L4 $7,5 \pm 0,6$ pmol de O_2 / seg*mL*mg de proteína, con diferencias estadísticamente significativas entre ellos (ANOVA: $F= 8233,60$, $df=2$, $p=0,00120$) (Figura 26a).

Figura 26

*Succinato Ubiquinona oxidorreductasa. Actividad de la succinato oxidasa (pmol de O_2 /(seg*mL) *mg de proteína mitocondrial) y de la Succinato deshidrogenasa (μ mol de DCPIP reducido/min*mg de proteína mitocondrial) para mitocondrias aisladas de Larvas L4, pupas y tórax de hembras de *Aedes aegypti*. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre la actividad de las enzimas para cada fase de desarrollo. a. Succinato oxidasa ^{a,b,c} (ANOVA: $F= 8233,60$, $df=2$, $p=0,00120$); b. Succinato deshidrogenasa ^{a,b,c} (ANOVA: $F= 245,140$, $df=2$, $p=0,000127$).*



La evaluación de la Succinato deshidrogenasa cuantifica el paso de electrones desde el succinato hacia el complejo II vía FAD, pasando por los centros Fe-S y de ahí hacia el receptor electrónico DCPIP. Acorde con un mayor ingreso de electrones vía Succinato, la fase de adulto presentó una mayor actividad con $307,4 \pm 37,2$ μ mol de DCPIP reducido/min*mg de proteína mitocondrial; seguido de la fase de pupa con $152,9 \pm 22$ μ mol de DCPIP reducido/min*mg de proteína mitocondrial y una menor actividad en la fase larval con $66 \pm 2,7$ μ mol de DCPIP

reducido/min*mg de proteína mitocondrial, con diferencias estadísticas entre ellos (ANOVA: F= 245,140, df=2, p=0,000127) (Figura 26b).

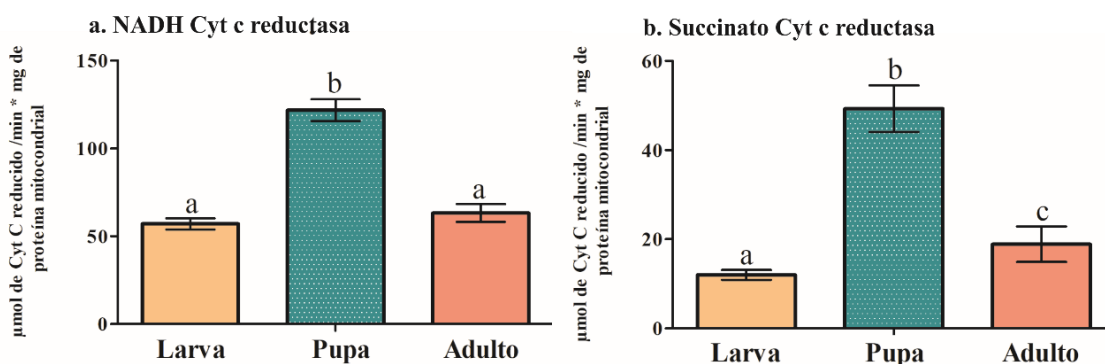
Para las dos enzimas evaluadas, el adulto presentó los valores de actividad más altos, demostrando un paso efectivo de electrones desde el complejo II a los complejos III y IV. Cabe mencionar que, para larvas y pupas, la actividad de la Succinato oxidasa fue muy baja, indicando que posiblemente el ingreso de electrones a la cadena respiratoria no se realiza principalmente vía complejo II.

1.4.6.3. Complejo III

El Complejo III se evaluó mediante la cuantificación de las enzimas NADH Cyt c reductasa y Succinato Cyt c reductasa. La NADH Cyt c reductasa evalúa el paso de electrones provenientes del NADH a través del Complejo I, hasta el Citocromo c (Cyt c), pasando por el Complejo III. Se monitorea la reducción del Cyt c bloqueando el complejo IV con cianuro. La fase de pupa presentó la mayor actividad con $121,6 \pm 6,2$ μmol de Cyt c reducido/min*mg de proteína mitocondrial, seguido de adulto ($63,2 \pm 5,1$ μmol de Cyt c reducido/min*mg de proteína mitocondrial) y larva ($57 \pm 3,2$ μmol de Cyt c reducido/min*mg de proteína mitocondrial). Se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los valores de las fases de pupa y los de larva-adulto (ANOVA: F= 329,244, df=2, p=0,00168) (Figura 27a).

Figura 27

*Ubiquinona citocromo c oxidorreductasa. Actividad de la NADH Cyt c reductasa y Succinato Cyt c reductasa ($\mu\text{mol de Cyt c reducido}/\text{min} \cdot \text{mg de proteína mitocondrial}$) para mitocondrias aisladas de Larvas L4, pupas y tórax de hembras de *Aedes aegypti*. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre la actividad de las enzimas para cada fase de desarrollo. a. NADH Cyt c reductasa ^{a,b} (ANOVA: $F= 329,244$, $df=2$, $p=0,00168$); b. Succinato Cyt c reductasa ^{a,b,c} (ANOVA: $F= 59,8782$, $df=2$, $p=0,000244$).*



La evaluación de la Succinato Cyt c reductasa cuantifica el paso de electrones provenientes del succinato a través del Complejo II hasta el Cyt c, pasando por el Complejo III. La fase de pupa presentó la mayor actividad con $49,3 \pm 5,2 \mu\text{mol de Cyt c reducido}/\text{min} \cdot \text{mg de proteína mitocondrial}$, seguido de adulto ($18,9 \pm 4 \mu\text{mol de Cyt c reducido}/\text{min} \cdot \text{mg de proteína mitocondrial}$) y larva ($12 \pm 1,1 \mu\text{mol de Cyt c reducido}/\text{min} \cdot \text{mg de proteína mitocondrial}$), con diferencias estadísticamente significativas entre las fases evaluadas (ANOVA: $F= 59,8782$, $df=2$, $p=0,000244$) (Figura 27b).

La marcada actividad de la NADH y Succinato Cyt c reductasa para la fase de pupa es un hallazgo nuevo, probablemente relacionado a que, durante esta fase de desarrollo, el individuo no se alimenta y debe recurrir a las reservas glucógeno y tejido graso con el fin de mantener su

actividad metabólica. Es decir, la pupa debe recurrir a productos de la glucólisis y del ciclo de Krebs, como el succinato, para el suministro de electrones a la cadena respiratoria mitocondrial. Es aquí donde la coenzima Q, transfiere los electrones provenientes de la oxidación de NADH y FADH al complejo III y ayuda a prevenir la peroxidación de lípidos, actuando como un sistema antioxidante (Deshwal *et al.*, 2023)

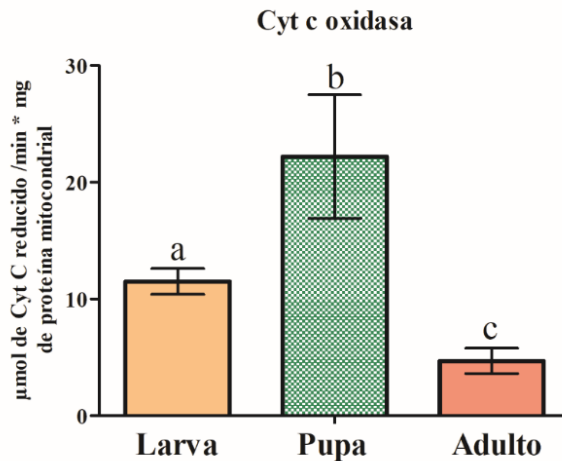
1.4.6.4. Complejo IV

El Complejo IV se evaluó mediante el monitoreo de la oxidación del Cyt c. La fase de pupa presentó la mayor actividad con $22,2 \pm 5,3$ μmol de Cyt c reducido/min*mg de proteína mitocondrial, seguido de la fase larval $11,5 \pm 1,1$ μmol de Cyt c reducido/min*mg de proteína mitocondrial, y, por último, la fase de adulto $4,7 \pm 1,1$ μmol de Cyt c reducido/min*mg de proteína mitocondrial; con diferencias estadísticamente significativas entre las fases evaluadas (ANOVA: $F= 52,1293$, $df=2$, $p=0,000212$) (Figura 28).

La mayor oxidación del Cyt c en fase de pupas se relaciona directamente con la actividad registrada para las citocromo c reductasas (Complejo III), es decir, con el paso y uso eficiente de electrones provenientes de la oxidación de sustratos vía complejos I y II y directamente relacionado con lo descrito en la sección anterior. Vale la pena resaltar que los valores de actividad de los individuos adultos no fueron tan notorios, indicando un posible menor paso de electrones o algún mecanismo de control de generación de potencial de membrana. Teniendo en cuenta los resultados de los complejos enzimáticos descritos anteriormente, se evidencia que la actividad de las oxidasas en adultos está directamente relacionada con la actividad de los complejos II y III de la cadena respiratoria.

Figura 28

*Citocromo oxidasa. Actividad de la Cyt c oxidasa ($\mu\text{mol de Cyt c reducido}/\text{min} \cdot \text{mg de prote\u00edna mitocondrial}$) para mitocondrias aisladas de Larvas L4, pupas y t\u00f3rax de hembras de *Aedes aegypti*. Letras diferentes indican diferencias estad\u00edsticas significativas entre la actividad de las enzimas para cada fase de desarrollo. ^{a,b,c} (ANOVA: $F= 52,1293$, $df=2$, $p=0,000212$).*



1.4.6.5. Complejo V

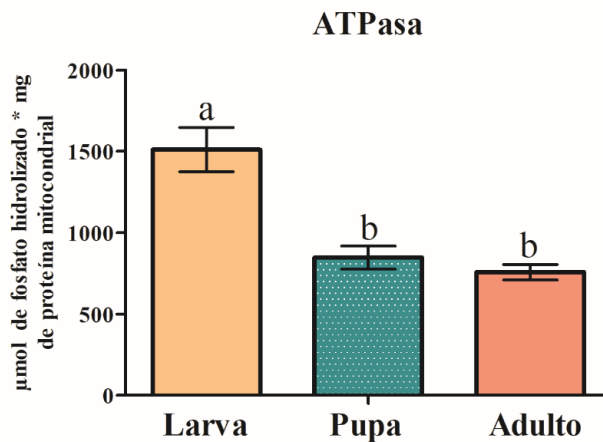
Se evalu\u00f3 la actividad de la ATPasa, encontrando una mayor actividad con mitocondrias aisladas de larvas L4 con valores de $1510,9 \pm 135,8 \mu\text{mol de fosfato hidrolizado} \cdot \text{mg de prote\u00edna mitocondrial}$, seguido de la fase pupal $846,8 \pm 71 \mu\text{mol de fosfato hidrolizado} \cdot \text{mg de prote\u00edna mitocondrial}$, y finalmente, la fase de adulto $757,5 \pm 47,1 \mu\text{mol de fosfato hidrolizado} \cdot \text{mg de prote\u00edna mitocondrial}$. Al comparar los valores obtenidos en cada fase de desarrollo evaluado, se encontraron diferencias estad\u00edsticamente significativas entre los valores de larva y los de pupa-adulto (ANOVA: $F= 148,872$, $df=2$, $p=0,000144$) (Figura 29).

Se obtuvo una mayor actividad para larvas, el cual disminuye en las siguientes fases de desarrollo. La disminuci\u00f3n en la actividad de esta enzima a lo largo del desarrollo del mosquito

puede estar relacionada directamente con procesos metabólicos y fisiológicos propios de cada fase, los cuales influyen directamente en el requerimiento energético mitocondrial.

Figura 29

*ATPasa. Actividad de la ATPasa ($\mu\text{mol de fosfato hidrolizado} \cdot \text{mg de proteína mitocondrial}$) para mitocondrias aisladas de Larvas L4, pupas y tórax de hembras de *Aedes aegypti*. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre la actividad de las enzimas para cada fase de desarrollo. ^{a,b} (ANOVA: $F= 148,872$, $df=2$, $p=0,000144$).*



1.4.6.6. Comparación actividad enzimática entre fases

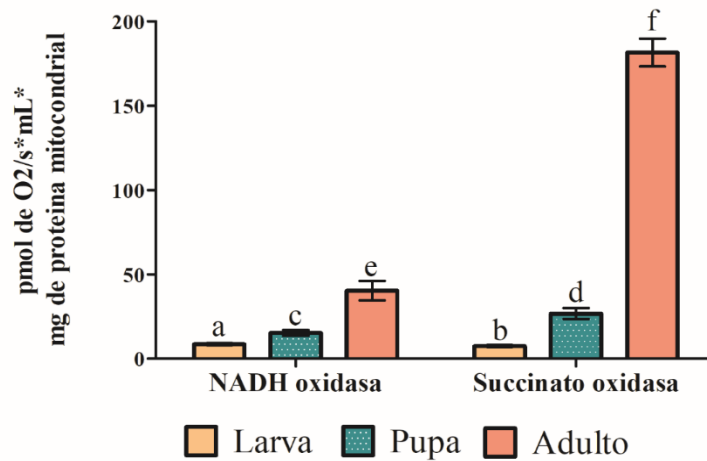
Con el fin de conocer y analizar la actividad específica de los complejos I y II, se compararon los valores de actividad de las enzimas oxidasas para las tres fases de desarrollo evaluadas. Se observó una mayor actividad para la fase de adulto, con un mayor ingreso de electrones vía Complejo II. Las pupas presentan una menor actividad, con ingreso de electrones vía Complejo II. Aunque las larvas presentan una actividad muy reducida de las enzimas oxidasas en comparación con las otras fases de desarrollo, efectivamente ocurre un ingreso de electrones vía Complejos I y II (Figura 30).

Al realizar una comparación entre la NADH y la Succinato oxidasa para cada fase de desarrollo, se encontraron diferencias estadísticas significativas para larvas (ANOVA: $F= 40,257$,

df=1, p=0,000112), pupas (Mann-Whitney U Test p=0,000911), y para adultos (Mann-Whitney U Test p=0,008151) (Figura 30). Estos resultados evidencian mayores requerimientos energéticos en el adulto, teniendo en cuenta que al transportar más electrones y reducir más oxígeno, están manteniendo un potencial de membrana que probablemente está siendo usado por la ATPsintasa. Teniendo en cuenta que durante el aislamiento mitocondrial se evidenció que las mitocondrias obtenidas estaban altamente desacopladas y que aparentemente no se debe a un proceso de fragmentación mecánica de la membrana externa, surge la hipótesis de que las mitocondrias de mosquitos presentan proteínas desacopladoras. Ubicadas en la membrana interna mitocondrial, estas proteínas hacen parte de la superfamilia de transportadores de aniones, contribuyendo a regular el gradiente electroquímico de protones generado durante el transporte de electrones a través de la cadena respiratoria mitocondrial. Al regular el paso de H⁺, la acción de estas proteínas puede desacoplar la cadena transportadora de electrones, disminuyendo la eficiencia de la fosforilación oxidativa y del potencial de membrana mitocondrial (Slocinska *et al.*, 2016). Considerando que la estructura y función de las proteínas desacopladoras en invertebrados ha sido poco estudiada, esta hipótesis será confirmada en trabajos posteriores en el grupo de investigación.

Figura 30

Comparación de la actividad de la NADH y Succinato oxidasas ($\text{pmol de O}_2/(\text{seg} \cdot \text{mL}) \cdot \text{mg de proteína mitocondrial}$) para mitocondrias aisladas de Larvas L4, pupas y tórax de hembras de *Aedes aegypti*. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre la actividad de las enzimas para cada fase de desarrollo: ^{a,b} entre larvas (ANOVA: $F= 40,257$, $df=1$, $p=0,000112$), ^{c,d} pupas (Mann-Whitney U Test $p=0,000911$), y ^{e,f} adultos (Mann-Whitney U Test $p=0,008151$).



1.5 DISCUSIÓN

1.5.1 Protocolos de aislamiento de mitocondrias

Desde que Bensley & Hoerr (1934) realizaron los primeros procedimientos para el aislamiento de mitocondrias provenientes de hígado de cerdo, gran parte de los protocolos empleados hoy en día incluyen la extracción de este organelo celular, seguido de homogenización mecánica y su purificación mediante centrifugación diferencial. Aunque actualmente se conservan algunos de los principios básicos de los protocolos iniciales, se han adicionado algunas modificaciones condicionadas por el organismo a estudiar, el tipo de tejido empleado y el uso final de las mitocondrias.

La mayoría de los protocolos de aislamiento de mitocondrias encontrados en la literatura emplean diferentes tipos de tejidos de mamíferos como hígado, corazón y músculo esquelético (Dunham-Snary *et al.*, 2014; Liao *et al.*, 2020; Nicholls *et al.*, 2012). Sin embargo, son escasos los estudios en los que se describe el aislamiento de mitocondrias de insectos y aún más escasos los estudios que se enfocan en especies de importancia médica como el mosquito *Ae. aegypti*. Aunque existe una baja estabilidad de las mitocondrias de insectos en comparación con otros organismos (Van den Bergh, 1967), el estudio de la respiración mitocondrial en este tipo de mitocondrias proporciona valiosa información sobre su fisiología en diferentes condiciones. Por ello, se requiere de la aplicación de una serie de procedimientos precisos y delicados para su aislamiento, con el fin de preservar su estructura y función (Nicholls *et al.*, 2012).

Aunque los objetivos de los protocolos evaluados son diferentes al propósito del presente estudio (Borrero *et al.*, 2018; Goncalves *et al.*, 2009), fueron seleccionados debido a que han sido previamente publicados y empleados para la medición de parámetros bioenergéticos en diferentes condiciones fisiológicas del mosquito *Ae. aegypti*. El principal aspecto en común entre los dos protocolos evaluados es el uso de agentes osmóticos como Manitol y Sacarosa en los buffers de extracción. Estos componentes contribuyen a evitar el choque hipotónico de las mitocondrias (Gualberto *et al.*, 1995) y la Sacarosa facilita la sedimentación de las fracciones celulares, especialmente cuando se emplea centrifugación diferencial posterior al fraccionamiento (Ernster & Schatz, 1981).

El uso de centrifugaciones diferenciales durante el proceso de aislamiento fue introducido y descrito inicialmente por Claude (1946), quien realizó una descripción de los posibles componentes celulares de suspensiones obtenidas de hígados de rata. Posteriormente, Hogeboom *et al.* (1948) desarrollaron un protocolo para el aislamiento de mitocondrias basado en la

centrifugación diferencial, contribuyendo a una mejor separación de los componentes celulares previamente liberados en la fragmentación mecánica. En relación con los protocolos evaluados, la mayor diferencia entre ellos reside precisamente en el número de centrifugaciones empleadas. En el protocolo descrito por Goncalves *et al.* (2009) emplean dos centrifugaciones (300 xg 5 min y luego a 10.000 xg 10 min), mientras que en el protocolo de Borrero *et al.* (2018) se emplea una serie de centrifugaciones diferenciales (300 xg 5 min, 8.000xg 10 min, 7.000xg 10 min y 7.000xg 10 min).

Esta diferencia en el número de centrifugaciones se basa en el protocolo citado como base metodológica por cada uno de ellos. Es así como el protocolo de Gonçalves *et al.* (2009) emplea como referencia los protocolos publicados por Van den Bergh (1967) y Miwa *et al.* (2003), quienes aíslan mitocondrias de moscas comunes (*Musca domestica*) y moscas de la fruta (*Drosophila melanogaster*) respectivamente. En ambos casos emplean tórax del insecto para el aislamiento, macerándolos cuidadosamente con un mortero. Aun cuando el exoesqueleto del tórax constituye un tipo de tejido difícil de macerar, el tejido muscular anclado a estas estructuras es más fino, requiriendo un proceso de homogenización mecánica delicada, contribuyendo a la posible conservación de la estructura mitocondrial. En contraste, el protocolo de Borrero *et al.* (2018) tiene como referencia los protocolos descritos por Vesga *et al.* (2014) y Voss *et al.* (1961), quienes aíslan mitocondrias de cerebro e hígado de ratas. Por tratarse de un tejido más robusto, el proceso de homogenización mecánica requiere de un fraccionamiento previo y el uso de un homogeneizador Van Potter Elvehjen, junto con un mayor número de centrifugaciones con el fin de obtener la mayor cantidad de mitocondrias íntegras posible.

Es necesario considerar que, aunque las bases metodológicas de los protocolos evaluados sean diferentes, el método descrito para la homogenización del tejido en ambos casos fue mediante

el uso de un homogeneizador Van Potter Elvehjen. En el protocolo de Gonçalves *et al.* (2009) usaron tórax de adultos (machos y hembras) de *Ae. aegypti* y en el de Borrero *et al.* (2018) larvas en fase L4 de *Ae. aegypti*.

La principal ventaja de realizar el aislamiento de mitocondrias es la obtención de organelos íntegros. Sin embargo, los valores calculados de Coeficiente de Control Respiratorio (CCR) para los dos protocolos evaluados, indican la presencia de mitocondrias dañadas o desacopladas, donde los procesos de oxidación y de fosforilación no se encuentran articulados. La obtención de valores de CCR cercanos a 1 indican que no existe una clara diferencia entre el consumo de oxígeno en Estado 3 y Estado 4, lo que sugiere alteraciones a nivel de la membrana mitocondrial externa o la posible presencia de proteínas desacopladoras. Al respecto, Slocinska *et al.* (2016) mencionan que en invertebrados existen principalmente dos tipos de proteínas desacopladoras: UCP4 y UPC5. La UCP4 se ha encontrado en larvas de *Drosophila*, desacoplando la respiración mitocondrial como un mecanismo de adaptación para favorecer el desarrollo de larva en adulto y atenuar la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS).

Adicionalmente, la presencia de este tipo de mitocondrias puede deberse a múltiples factores, todos ellos asociados al protocolo de extracción empleado. Entre las principales acciones que pueden ocasionar la presencia de organelos desacoplados, se encuentra el tiempo empleado durante la extracción, el tiempo entre la obtención de mitocondrias y la medición correspondiente, una baja concentración del tejido inicial empleado, la manipulación excesiva de la muestra y el no llevar a cabo el procedimiento a una temperatura cercana a 0°C (Van Den Bergh, 1956). Sin embargo, durante la ejecución de los dos protocolos, este tipo de acciones fueron evaluadas en el proceso inicial de ejecución de los ensayos (resultados no mostrados) y evitadas al máximo, razón por la cual se descartan como factores que ocasionarían el desacoplamiento de las mitocondrias.

Por otra parte, aunque los aislamientos mitocondriales continúan siendo el método más empleado para describir la función mitocondrial, por lo general solo se recupera entre el 20% y el 40% de las mitocondrias contenidas en el tejido original (Picard, Taivassalo, Gouspillou, *et al.*, 2011; Picard, Taivassalo, Ritchie, *et al.*, 2011). Esta baja tasa de recuperación puede deberse a que las mitocondrias aisladas por centrifugación diferencial aun contienen restos celulares como fracciones de membrana (mitocondrias rotas, membranas de vesículas, plástidos, peroxisomas), enzimas solubles hidrolíticas y bacterias en el extracto final (Chen *et al.*, 2016; Gualberto *et al.*, 1995). Sin embargo, el principal factor por el cual se obtienen mitocondrias desacopladas se relaciona con la pérdida de la estructura mitocondrial después del procedimiento de aislamiento, pues la homogenización mecánica del tejido genera el desgarre de estructuras mitocondriales, generando orgánulos esféricos homogéneos más pequeños (Picard *et al.*, 2011). La generación de este tipo de procesos en la mitocondria (fisión mitocondrial por fragmentación) se encuentran asociados a una disminución de la capacidad respiratoria y el incremento de ROS (Picard *et al.*, 2011). Esto contribuye a explicar los valores respiratorios obtenidos para los protocolos empleados, donde se observaron valores más altos con el protocolo de Borrero *et al.* (2018), indicando que tal vez el grado de fisión mitocondrial con este protocolo es menor que el ocasionado con el protocolo de Gonçalves *et al.* (2009). Por ello, teniendo en cuenta los valores de CCR, los cuales fueron ligeramente más altos con el protocolo de Borrero *et al.* (2018), se seleccionó este protocolo para realizar las posteriores pruebas de respiración mitocondrial en fases juveniles y adulto de *Ae. aegypti*.

Vale la pena considerar que durante todos los procedimientos para el aislamiento de mitocondrias se evaluaron los posibles factores que pudiesen influir en la calidad de estas (temperatura, manejo del material biológico, tiempos de homogenización, tiempos y cambios en

la centrifugación, manejo de las mitocondrias aisladas, etc), y que los resultados obtenidos siempre fueron similares entre sí (resultados no mostrados). De manera que existe la posibilidad de que los valores obtenidos para *Ae. aegypti* sean efectivamente los descritos en el presente trabajo y no se deba a la presencia de proteínas desacopladoras o algún tipo de daño mecánico ocasionado en ellas, hipótesis que deberá corroborarse con estudios posteriores.

1.5.2 Parámetros respiratorios en mitocondrias aisladas y verificación de la integridad mitocondrial

Uno de los métodos más usados para determinar alteraciones fisiológicas en *Ae. aegypti* y en otros insectos, consiste en la medición de parámetros bioenergéticos como consumo de oxígeno y actividad enzimática de la cadena transportadora de electrones bajo diferentes condiciones (Correa *et al.*, 2015). Sin embargo, la mayoría de los estudios describen la bioenergética mitocondrial de individuos adultos mediante el aislamiento de mitocondrias provenientes de los músculos del vuelo, debido a que poseen mitocondrias más grandes y altas tasas de actividad respiratoria (Correa *et al.*, 2015; Goncalves *et al.*, 2009).

En este estudio, se describe por primera vez el comportamiento respiratorio mitocondrial a lo largo del ciclo de vida de *Ae. aegypti*, con la adición de diferentes sustratos oxidables. Los valores más altos de consumo de oxígeno se obtuvieron al emplear el sustrato succinato, con un aumento progresivo en los valores registrados desde la fase de larva (L4) hasta adulto. Este resultado indicaría una mayor actividad del Complejo II, mediante la oxidación de succinato a fumarato por parte de la Succinato deshidrogenasa (Mailloux, 2015).

Teniendo en cuenta que el mosquito es un insecto holometábolo, a lo largo de su ciclo de vida se presentan cambios metamórficos que modifican diferentes funciones metabólicas (Merkey

et al., 2011), las cuales se representan en el aumento o disminución de requerimientos de energía y oxígeno por parte de las células (Merkey *et al.* 2011). Estos requerimientos son suplidos por la mitocondria, la cual se encarga de un gran número de procesos biológicos vitales para la célula, los cuales cambian y se modifican en respuesta a estímulos ambientales, estados de desarrollo y requerimientos energéticos particulares (Giacomello *et al.*, 2020; Goncalves *et al.*, 2009). Si bien no se han publicado estudios que describan la relación de la mitocondria con el metabolismo de juveniles en *Ae. aegypti*, Vital (2006) describe el metabolismo de la glucosa durante el proceso de embriogénesis de esta especie, encontrando que la Glucosa 6 fosfato (G-6P) es el intermediario clave entre la glucólisis y la vía de las pentosas para el metabolismo energético y la biosíntesis de nucleótidos, importantes para la formación de tejidos durante el desarrollo embrionario.

En relación con la fase de larva, Jacobs *et al.* (2020) describen el papel del metabolismo mitocondrial en la regulación del crecimiento larval en *Drosophila melanogaster*. Los autores mencionan que la actividad de la cadena respiratoria y la fosforilación oxidativa pueden ser fisiológicamente reguladas por la disponibilidad de nutrientes en el medio, posible presencia de xenobióticos y cualquier tipo de alteración medioambiental. De manera que diferencias y/o deficiencias en la dieta pueden alterar la expresión y funcionamiento de proteínas mitocondriales relacionadas con mecanismos de crecimiento (síntesis de proteínas, lípidos, nucleótidos y carbohidratos) y detoxificación. Considerando que la fase larval se caracteriza por la acumulación de biomasa, movilización de recursos alimenticios para la producción de ATP y síntesis de biomoléculas, individuos con valores bajos de respiración mitocondrial pueden presentar deficiencias en el suministro adecuado de nutrientes y debido a ello, emplear rutas alternativas en el ciclo de Krebs (Jacobs *et al.*, 2020).

PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Ae. aegypti*

Con *Ae. aegypti*, mayores valores de consumo de oxígeno con el sustrato succinato en la fase larval pueden estar relacionados con la necesidad de adquisición de biomasa y almacenamiento de energía. En algunos parásitos (tripanosomátidos) se ha descrito que el rol de la degradación de succinato es mantener el balance redox, permitiendo la reoxidación del NADH producido, brindando una importante flexibilidad de adaptación a rápidos cambios ambientales (Bringaud *et al.*, 2006). Considerando que el Complejo II no bombea protones a través de la membrana, contribuye en menor medida al gradiente de potencial de la membrana mitocondrial y disminuye asimismo la producción de H₂O₂ (Cecchini, 2003). Este aspecto es importante debido a que las L4 no se alimentan durante la mitad de su fase de desarrollo (Bounias *et al.*, 1989) y están cercanas a pasar a pupa, donde gran parte de los tejidos larvarios son degradados y reciclados para servir de soporte y recurso en la formación del ejemplar adulto (Jacobs *et al.*, 2020; Merkey *et al.*, 2011). Vale la pena mencionar que, aunque el consumo de oxígeno con los demás sustratos fue mucho menor, existe un aporte importante al gradiente de protones a través de moléculas de NADH (Vía complejo I) con los sustratos glutamato, malato y prolina+piruvato, cuyo aporte a la cadena transportadora de electrones permite mantener el funcionamiento adecuado de la mitocondria en condiciones ambientales poco estables. Adicionalmente, el aporte de electrones de estos tres sustratos puede estar relacionado directamente con las reservas energéticas en los insectos. Los insectos no cuentan con grandes reservas de glucógeno, pues presentan trehalosa como principal azúcar circulante en la hemolinfa. Las pocas cantidades de glucógeno que se encuentran en el tejido graso y en el intestino fluctúan en función de la actividad motora, condiciones ambientales y su casi agotamiento tras periodos de muda del exoesqueleto. De manera que gran parte de la alimentación en insectos adultos, esta destinada a recuperar las reservas de glucógeno (Thompson, 2003).

PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Ae. aegypti*

La fase de pupa se caracteriza por la reorganización de tejidos para la formación de órganos en el adulto. Debido a que durante esta fase la pupa no se alimenta, ocurre un decline en la producción de biomasa, pues los lípidos almacenados son metabolizados para proveer energía durante la división celular, la diferenciación y la eclosión (Jacobs *et al.* 2020). En la revisión realizada por Jacobs *et al.* (2020) con *Drosophila*, la actividad mitocondrial en esta fase de desarrollo es más baja que la registrada en las fases de larva y adulto, presentando una curva metabólica en forma de “U” (Merkey *et al.* 2011). Sin embargo, se debe considerar que el ciclo de vida de *Drosophila* es completamente terrestre, y las pupas permanecen inmóviles hasta la eclosión. Por el contrario, las fases juveniles de *Ae. aegypti* presentan hábitos acuáticos y la pupa permanece activa y móvil hasta la emergencia del adulto. Esta mayor actividad por parte de la pupa del mosquito se ve reflejada en un mayor gasto energético. Este hecho podría explicar en parte, el aumento en los valores consumo de oxígeno observados con el sustrato succinato (Vía complejo II), y con los sustratos glutamato y prolina+piruvato (Vía complejo I) (Figura 23).

La fase de adulto es la única fase del ciclo de vida de *Ae. aegypti* que cuenta con una representación de la fisiología mitocondrial más detallada. Gran parte de los estudios describen que la prolina juega un papel fundamental como fuente energética en los músculos del vuelo de *Ae. aegypti* (Goldstrohm *et al.*, 2003; Scaraffia & Wells, 2003). El papel de este aminoácido como sustrato oxidable en la mitocondria del mosquito fue descrito con mayor detalle en los estudios de Gonçalves *et al.* (2009) y Correa *et al.* (2015), quienes mencionan que los sustratos que contribuyen para la formación de ATP en machos y hembras adultas son prolina+ piruvato y glicerol 3-fosfato (G3P). Aunque encontraron pequeñas diferencias entre los adultos debido a la alimentación sanguínea (Fuente de prolina en hembras) y con azúcar (Fuente de Glucosa para los machos), la obtención de energía ocurre principalmente vía Complejo I, o mediante su paso directo

PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Ae. aegypti*

de electrones a la ubiquinona por la acción de deshidrogenasas específicas (Prolina deshidrogenasa ProDH, y G3P deshidrogenasa G3PDH) (Goncalves *et al.* 2009; Correa *et al.* 2015).

Los valores de consumo de oxígeno en el estado 3 con el sustrato prolina + piruvato reportados por Gonçalves *et al.* (2009) ($43,47 \pm 5,09$ nmol/(min*mg)) y Correa *et al.* (2015) (132 ± 58 nmol/(min*mg)) en hembras alimentadas con azúcar, constituyen más del triple de los valores reportados en este estudio ($4,4 \pm 0,9$ pmol/(s*mL)). Aunque estos autores mencionan que las tasas de respiración obtenidas por ellos con este sustrato son bajas en comparación con los valores obtenidos para otros insectos (Correa *et al.* 2015), nuestros datos son aún más bajos a los reportados en la literatura. De igual manera, los valores respiratorios obtenidos con el sustrato G3P presentan la misma tendencia, es decir, ellos reportan tasas respiratorias más altas (Gonçalves *et al.* (2009): $179,9 \pm 35,78$ nmol/(min*mg); Correa *et al.* (2015): 68 ± 28 nmol/(min*mg)) frente a los valores reportados en este estudio ($15,3 \pm 2,5$ pmol/(s*mL)). Correa *et al.* (2015) mencionan que teniendo en cuenta que el músculo del vuelo es uno de los tejidos con mayor actividad metabólica, altas tasas respiratorias con prolina + piruvato indican el agotamiento total del glucógeno almacenado en los cuerpos grasos y en este tipo de músculos. Por supuesto, se presenta un mayor grado de oxidación de la prolina+piruvato en hembras, las cuales adquieren la prolina directamente de la alimentación sanguínea. Sin embargo, considerando que las hembras recién emergidas solo buscan alimentación sanguínea después de algunos días de emergidas, la búsqueda de recursos alimenticios se centra en carbohidratos y azúcares con el fin de reponer rápidamente las reservas de glucógeno, haciendo uso de las reservas tenebresales producto de la biosíntesis larval, limitando el potencial de vuelo y tiempo de sobrevivencia al acceso a alimentación alta en azúcares (Briegel *et al.*, 2001; Dou *et al.*, 2023).

Considerando que nuestros datos no son similares a lo reportado en la literatura, se decidió corroborar la integridad de las mitocondrias obtenidas de larvas L4 con el protocolo de Borrero *et al.* (2018) mediante tres métodos diferentes: cuantificación del potencial eléctrico mitocondrial ($\Delta\Psi$) con el colorante Rhodamina 123 (Rh 123), cálculo del Coeficiente de Control Respiratorio (CCR) y respiración mitocondrial al adicionar Citocromo c. Los resultados obtenidos con estos métodos indican que se están obteniendo mitocondrias que han perdido su integridad o están desacopladas. En mitocondrias normales, las reacciones de oxidación de los sustratos y de respiración aumentan hasta 20 veces el valor de la respiración en presencia de ADP (Beconi, 1981). Sin embargo, un aspecto en común entre las observaciones registradas fue que no se obtuvo un aumento notable en los valores respiratorios al adicionar ADP a las mitocondrias ni al adicionar los diferentes sustratos, por ende, las mitocondrias no están oxidando de manera adecuada el sustrato suministrado. Este comportamiento contribuiría a explicar los menores valores respiratorios obtenidos en el presente estudio al ser comparados con los valores respiratorios de otros insectos, la no disminución en la intensidad de la fluorescencia con el colorante RH 123 al adicionar ADP y los valores de CCR obtenidos. Aunque no se puede afirmar que las mitocondrias aisladas en el presente estudio estuvieran desacopladas, los valores observados pueden estar relacionados con daños mecánicos o químicos en la membrana externa, ocasionados durante el proceso de aislamiento (Hartwig *et al.*, 2015), pues al aislar las mitocondrias de su medio celular, se alteran diferentes parámetros funcionales entre la mitocondria y el espacio extra mitocondrial (Saks *et al.*, 1998).

1.5.3 Medición de respiración sobre larvas, pupas y tórax de hembras permeabilizados

La mayoría de los métodos empleados para el aislamiento de mitocondrias se basan en el uso de técnicas de centrifugación diferenciada, sin embargo, estas técnicas no tienen en cuenta que existe una fuerte relación entre la estructura mitocondrial y su funcionalidad. Por ejemplo, las mitocondrias características del músculo esquelético presentan estructuras tubulares y alargadas, con fuertes conexiones entre ellas (Picard *et al.* 2011). De manera que posterior a un procedimiento de homogenización y aislamiento, estas estructuras y conexiones se ven radicalmente alteradas (Picard *et al.* 2011), lo cual afecta la cantidad de mitocondrias totales obtenidas al finalizar el procedimiento y la calidad de las mismas (Picard *et al.* 2011).

Un aspecto importante en el estudio fisiológico mitocondrial es la preservación de la arquitectura celular y de las interacciones entre los organelos celulares *in situ* (Saks *et al.* 1998). Por ello, diferentes autores han propuesto un método para el estudio de las mitocondrias *in vivo*, sin necesidad de aislarlas del tejido (Beenackers, *et al.*, 1984; Candy, 1970; Saks *et al.*, 1991). Este método consiste en la separación manual de pequeñas fibras de tejido o parte del tejido, seguido del uso de detergentes para la permeabilización (saponina y digitonina) (Nicholls *et al.*, 2012). Entre las ventajas de este método esta la posibilidad de controlar el medio extra-mitocondrial, emplear pequeños trozos del material biológico bajo estudio y la conservación intacta de las propiedades de las mitocondrias (Saks *et al.*, 1998).

Considerando las ventajas de usar tejido permeabilizado y con el fin de eliminar potenciales daños en las mitocondrias, se procedió a la evaluación de parámetros respiratorios en tejidos permeabilizados de larvas, pupas y tórax de adultos de *Ae. aegypti*. Teniendo en cuenta que tampoco se han llevado a cabo estudios con tejido permeabilizado en fases juveniles, se realizó la comparación entre 1 y 5 individuos, con el fin de determinar un número mínimo de ejemplares

para este tipo de experimentos. Los resultados mostraron que, empleando 1 individuo permeabilizado, las tasas de consumo de oxígeno fueron mucho menores a las registradas con 5 individuos. Para 1 larva L4 el mayor consumo de oxígeno se obtuvo con el sustrato glutamato; para 1 pupa fue con el sustrato prolina+piruvato y para 1 tórax de adulto con el sustrato succinato. Al analizar estadísticamente los datos, no se encontraron diferencias en el consumo de oxígeno para 1 larva permeabilizada con los sustratos glutamato y succinato; y para 1 pupa permeabilizada con los sustratos prolina+piruvato y succinato. Es decir, empleando 1 individuo permeabilizado, se tendrían tres vías de ingreso de electrones: vía Complejo I y II para larvas; vía deshidrogenasas (Ubiquinona) y Complejo II para pupas, y vía Complejo II para adultos.

Por otra parte, los resultados obtenidos con 5 individuos permeabilizados presentaron valores similares a los resultados obtenidos con mitocondrias aisladas, es decir, se obtuvo un mayor consumo de oxígeno al emplear succinato como sustrato oxidable en todas las fases de desarrollo evaluados, indicando un mayor ingreso de electrones vía Complejo II. Sin embargo, al analizar estadísticamente los datos, no se encontraron diferencias en el consumo de oxígeno para 5 pupas permeabilizadas con los sustratos succinato y prolina+piruvato y para 5 tórax permeabilizados con los sustratos succinato y G3P. Este dato podría estar indicando que efectivamente el Complejo II no es la única vía de ingreso de electrones para estas fases, equiparándose con los resultados obtenidos con 1 individuo permeabilizado.

En términos generales, los valores respiratorios obtenidos con tejido permeabilizado son similares a los obtenidos con mitocondrias aisladas. Es decir, con el sustrato succinato se presentaron los mayores valores de consumo de oxígeno en todas las fases evaluadas. Sin embargo, este resultado no implica que el Complejo II sea la única vía de ingreso de electrones a la cadena

respiratoria mitocondrial. De hecho, de acuerdo con los resultados obtenidos, existe una preferencia por ciertos sustratos acorde a la fase de desarrollo.

Para larva L4 se observaron altos valores respiratorios en el estado 2, especialmente en larvas permeabilizadas ($40,1 \pm 1,7$ nmol/(min*mg)), indicando el consumo de sustratos endógenos previo a la adición de cualquier sustrato. El mayor consumo de oxígeno se obtuvo con el sustrato succinato y aunque se encontraron diferencias estadísticas significativas con los demás sustratos evaluados, el consumo de oxígeno registrado y los valores calculados de Capacidad Bioenergética indican el ingreso adicional de electrones vía Complejo I (glutamato) y vía Ubiquinona a través del glicerol 3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH). Dado que los individuos juveniles de la familia Culicidae se caracterizan por poseer hábitos acuáticos, las larvas de *Ae. aegypti* poseen estructuras especializadas (Sifón respiratorio) para tomar aire directamente del medio mientras permanecen cerca de la superficie del agua. Sin embargo, las fases juveniles (larvas y pupas) suelen pasar por ciertos periodos de hipoxia, durante los cuales se desplazan hacia el fondo del agua para alimentarse y como estrategia de evasión frente a potenciales amenazas. Antes de llegar a un potencial estado anoxia, estos individuos deben restaurar su estatus metabólico y suplir la energía necesaria en los tejidos (Redecker & Zebe, 1988). Una de las estrategias empleadas y que da flexibilidad de adaptación a rápidos cambios ambientales, consiste en la activación de la vía catabólica de oxidación de ácidos grasos en el Ciclo de Krebs para la obtención de succinato. Se ha descrito que cuando un tejido activo no recibe la suficiente cantidad de oxígeno para suplir su demanda metabólica, ocurre una acumulación de succinato, el cual contribuye de manera significativa en el proceso de re-oxidación en el tejido (Pekny *et al.*, 2018). Este mecanismo presenta una gran ventaja, pues dado que con el succinato (Complejo II) no se bombean protones a través de la membrana mitocondrial, se mantiene el balance Redox de la mitocondria y se

disminuye el aporte de electrones para la formación de ROS, sin la disminución en la producción de ATP (Bringaud *et al.*, 2006).

Aunque también se registró el consumo de sustratos endógenos para pupas, los valores obtenidos fueron menores que los registrados para larva L4 (mitocondrias aisladas: $9,2 \pm 1,7$ nmol/(min*mg); pupas permeabilizadas $33,7 \pm 1,2$ nmol/(min*mg)). Para la mayoría de los sustratos evaluados, el consumo de oxígeno en pupas fue ligeramente menor al de larvas, con una mayor tasa respiratoria con el sustrato succinato. Contrario a lo registrado para larvas, no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre succinato y prolina+piruvato, indicando que la respiración en esta fase se da mediante el ingreso de electrones vía complejo II y vía ubiquinona (prolina deshidrogenasa - PDH), dato soportado con los valores calculados de capacidad bioenergética. Al igual que con la fase de larva, la pupa también pasa por periodos de hipoxia, recurriendo a la activación de la vía catabólica de oxidación de ácidos grasos para la obtención de succinato como fuente de electrones y para procesos de recuperación de la capacidad oxidativa (Pekny *et al.* 2018). Aunque la cantidad de prolina en fases larvales y pupales de *Ae. aegypti* es baja (Goldstrohm *et al.*, 2003), la presencia de este aminoácido juega un rol esencial en el metabolismo y en la síntesis de la cutícula durante los cambios de muda como suplemento energético (Bounias *et al.*, 1989; Chaput & Liles, 1969). La mayoría de los insectos holometábolos acumulan grandes cantidades de lípidos hasta la mitad de su último instar larval (donde dejan de alimentarse) para ser empleados como reserva energética durante la etapa de pupa (Beenackers *et al.*, 1981). De manera que la disminución en los valores de consumo de oxígeno registrados se relaciona con la mediación de las mitocondrias en los procesos de muerte celular para la degradación de tejidos, disminuyendo los procesos de demanda energética y el transporte activo de iones (VenkatRao *et al.*, 2016).

Para adultos, se obtuvo una baja tasa de respiración mitocondrial en estado 2, indicando un bajo consumo de sustratos endógenos. Este resultado concuerda con lo reportado por Correa *et al.* (2015), quienes evaluaron la fisiología mitocondrial de *Ae. aegypti* en tórax permeabilizados de machos y hembras. En relación con el consumo de oxígeno en estado 3, en este estudio encontramos una mayor tasa de consumo con el sustrato succinato, seguido del sustrato G3P, sin encontrar diferencias estadísticas entre ellos. Sin embargo, Correa *et al.* (2015) reportan que el mayor consumo de oxígeno fue registrado con los sustratos prolina+piruvato y G3P. Estos autores describen que cerca del 90 % de los electrones que son usados en la fosforilación oxidativa en el músculo del vuelo, provienen de la prolina+piruvato como sustrato y que parte de ellos se obtienen de la oxidación de la prolina mediante cuatro reacciones: catalizada por la prolina deshidrogenasa (PDH) y enviados directamente a la ubiquinona, por la acción del carboxilato deshidrogenasa, por la glutamato geshidrogenasa y por enzimas del Ciclo de Krebs. Asimismo, que las altas tasas respiratorias con este sustrato explican el agotamiento total del glucógeno almacenado en los cuerpos grasos y en los músculos torácicos después de periodos de vuelo (Correa *et al.* 2015). Goldstrohm *et al.* (2003) también encontraron una alta cantidad de prolina en hembras sin alimentar, la cual aumenta considerablemente después de la alimentación sanguínea. Adicionalmente, notaron que, en machos, los niveles de prolina también aumentaron después de la alimentación con azúcares, sugiriendo que la producción de este aminoácido es necesaria como almacenamiento temporal de amonio tóxico, liberado durante la degradación de los aminoácidos de la dieta, el cual es almacenado como prolina y finalmente excretado como urea o ácido úrico.

El consumo de oxígeno observado con el sustrato succinato en adultos en el presente estudio posiblemente está relacionado con el uso de este sustrato como principal fuente de electrones. Adicionalmente, es posible que el rompimiento de las membranas mitocondriales

durante el periodo inicial de permeabilización en las cámaras del oxígrafo facilite la disponibilidad y uso de los sustratos por parte de la cadena respiratoria mitocondrial. Se ha reportado que daños en las uniones entre las proteínas mitocondriales y elementos del citoesqueleto influyen en la afinidad de los sustratos no dependientes de constituyentes de la matriz mitocondrial, como el succinato (Picard *et al.* 2011).

Los valores de consumo de oxígeno en este estudio con el sustrato G3P son más bajos que los reportados por Correa *et al.* (2015). La producción de G3P se relaciona con la acción de la enzima glicerol quinasa durante la lipólisis en el músculo del vuelo. La actividad de esta enzima permite el uso de G3P para contrarrestar la alta demanda energética del músculo (Beenackers *et al.* 1981). En el tejido permeabilizado puede predominar la forma citosólica de glicerol 3-gosfato deshidrogenasa (G3PDH), la cual se encarga de la reoxidación del NADH extra-mitocondrial derivado de la glucólisis, con un mayor ingreso de electrones a la fosforilación oxidativa (Correa *et al.* 2015). Aunque este mayor ingreso de electrones podría relacionarse directamente con la producción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), la mitocondria es capaz de regular el ingreso de electrones mediante la cuantificación del ADP y el ATP presentes en la célula, como mecanismos de control de la actividad de la G3PDH y de la lanzadera glicerol fosfato (Gaviraghi & Oliveira, 2019). Adicionalmente, se ha reportado que parte de G3P producido en el músculo del vuelo es liberado directamente en la hemolinfa para ser transportado hacia el cuerpo graso (Beenackers *et al.* 1981), de manera que parte de este sustrato no entraría a la fosforilación oxidativa.

De forma similar a los experimentos realizados con mitocondrias aisladas, se realizó la verificación de integridad mitocondrial en los tejidos permeabilizados. Los valores obtenidos de CCR (≤ 3) indican que las mitocondrias en todas las fases evaluadas no se encontraban integras o estaban desacopladas. Estos valores pueden ser atribuidos principalmente a dos factores: 1. Con el

uso de tejido permeabilizado (*in vivo*) no es posible controlar el entorno extra-mitocondrial o cambiar el medio intracelular con el fin de eliminar potenciales sustratos respiratorios, así como resulta imposible medir directamente la concentración de metabolitos o sustratos que llegan finalmente a la cadena transportadora de electrones (Picard *et al.* 2011). 2. Un periodo de permeabilización muy prolongado de los tejidos antes de la adición de los sustratos respiratorios, periodos largos de permeabilización comprometen la integridad de la membrana interna mitocondrial, así como el funcionamiento de la cadena transportadora de electrones y la disponibilidad de componentes solubles del ciclo de Krebs, necesarios para la reducción de equivalentes NAD⁺ (Picard *et al.* 2011). Adicionalmente, la pérdida del potencial de membrana mitocondrial no solo puede derivar en un incremento en las especies reactivas de oxígeno (ROS), sino además en la pérdida de Citocromo c endógeno a través de la membrana (Hartwig *et al.*, 2015).

Aun cuando no se obtuvieron los valores de integridad mitocondrial adecuados con el uso de tejido permeabilizado, al comparar los resultados obtenidos con mitocondrias aisladas y con tejido permeabilizado, se consideró que es mejor emplear 5 individuos permeabilizados para la medición de parámetros fisiológicos mitocondriales. Adicionalmente, concordamos con lo expuesto por Correa *et al.* (2015), quienes concluyen que dada la similitud en los valores de consumo de oxígeno con mitocondrias aisladas y con tejido permeabilizado, la medición de estos parámetros puede efectuarse *in situ*, sin necesidad de ejecutar un protocolo de aislamiento.

1.5.4 Actividad enzimática

No existen muchos estudios que describan la actividad enzimática mitocondrial en insectos sin la alteración de sustancias de origen natural o sintético. Por ello, este es el primer estudio que

PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Ae. aegypti*

describe la actividad de las enzimas relacionadas con la cadena respiratoria mitocondrial en diferentes fases del ciclo de vida del mosquito *Ae. aegypti*.

En la fase de larva, se observó una actividad intrínseca de los complejos I y II, posiblemente relacionada con el consumo de sustratos endógenos descrito anteriormente. La actividad de las oxidاسas indica que posiblemente el ingreso de electrones se da de manera equitativa con los sustratos glutamato y succinato, aunque con mayor eficacia vía Complejo I (Glutamato). Estos resultados son consecuentes con los valores de consumo de oxígeno obtenidos con tejido permeabilizado de larvas, donde se registró el ingreso de electrones vía Complejo I y II. Adicionalmente, se observa un mayor paso de electrones provenientes del Complejo I con la actividad de la NADH Cyt c reductasa y la Citocromo c oxidasa. De manera consecuente con el paso efectivo de electrones vía Complejo I hasta el Complejo IV, se registró una alta actividad de la enzima ATPasa, posiblemente relacionada con un mayor requerimiento energético (producción de ATP) debido a la síntesis de tejidos de almacenamiento energético (lípidos) y a la alta actividad metabólica de la larva.

Para las pupas, se registró una mayor actividad de las enzimas relacionadas con el complejo II, tanto en la actividad oxidativa de la enzima Succinato oxidasa, como en la actividad intrínseca del complejo (Succinato deshidrogenasa). Esta actividad sustenta los valores de consumo de oxígeno registrados con el sustrato succinato, que como se mencionó anteriormente, es usado como fuente de electrones posterior a periodos de hipoxia. Adicionalmente, para la fase de pupa se obtuvo una alta actividad de las enzimas reductاسas, especialmente con la NADH Cyt c, denotando un paso efectivo de electrones al Complejo III, de preferencia aquellos provenientes de la Ubiquinona. Aunque inicialmente pueda parecer un resultado contradictorio con los valores de actividad registrados para las oxidاسas, se debe tener en cuenta que el uso del sustrato succinato

posiblemente se da únicamente cuando los tejidos necesitan reactivar la fosforilación oxidativa posterior a un periodo con poco oxígeno, por lo cual, el ingreso de electrones con el sustrato prolina+piruvato contribuye de manera significativa en la actividad registrada. La alta actividad de la Cyt c oxidasa puede estar relacionada con los procesos de muerte celular subyacentes (VenkatRao *et al.*, 2016), relacionándose directamente con la baja actividad de la ATPasa y baja concentración de sustratos (NADH y succinato), pues las pupas deben conservar un metabolismo basal lento con el fin de emplear la mayor cantidad de fuentes energéticas (ácidos grasos) para los procesos de histólisis e histogénesis en el desarrollo del individuo adulto (Beenackers *et al.* 1981).

Para adultos, se encontró una mayor actividad de la enzima succinato oxidasa, en concordancia con los resultados obtenidos de consumo de oxígeno en el presente estudio. También se encontró actividad de la NADH oxidasa, denotando la oxidación de sustratos vía Complejo I. Al verificar la actividad intrínseca (Deshidrogenasas) de los complejos I y II, se obtuvo una mayor actividad de la succinato deshidrogenasa. Al analizar el paso de electrones al complejo III, este se realiza principalmente a través de las enzimas de los complejos I y II, con un leve aumento en la actividad de la enzima NADH Cyt c reductasa (Complejo I – glutamato y prolina+piruvato). En concordancia con lo reportado por Correa *et al.* (2015), se encontró una baja actividad de la cyt c oxidasa en este estudio, sugiriendo un posible control sobre la generación de potencial de membrana, debido a un posible estrés oxidativo de estas mitocondrias.

En términos generales, se observan cambios importantes en el funcionamiento enzimático de la cadena transportadora de electrones a lo largo del ciclo de vida del mosquito *Ae. aegypti*. Durante la fase larval hay un ingreso importante de electrones vía complejos I y II, con una mayor generación de ATP, la cual es requerida para la formación de tejidos, síntesis de moléculas, gasto energético durante las 4 fases larvales y almacenamiento de glucógeno para las siguientes fases de

desarrollo. Esta actividad decae durante la fase de pupa, la cual recurre principalmente a las reservas de lípidos y el glucógeno almacenados en el cuerpo graso como principal fuente energética. Aunque en el adulto se encontró una baja actividad de la ATPasa, los requerimientos energéticos se encuentran condicionados y varían acorde a factores como el tipo de alimentación, disponibilidad de alimentación rica en carbohidratos y azúcares previa a la primera alimentación sanguínea en las hembras, disponibilidad de azúcares (Glucosa) en machos, disponibilidad y uso de aminoácidos (prolina) en las hembras durante los ciclos gonadotrópicos y gasto energético durante el vuelo.

1.6 CONCLUSIONES

El principal objetivo de un aislamiento mitocondrial es la obtención de la mayor cantidad de mitocondrias integras para la descripción de la función mitocondrial. Sin embargo, aunque los aislamientos mitocondriales continúan siendo el método más empleado, los resultados obtenidos en el presente estudio evidencian que tanto el tratamiento mecánico del tejido, como la centrifugación diferencial, influyen en la obtención de un porcentaje muy bajo de mitocondrias integras. Por ello, el uso de tejido permeabilizado para la medición de parámetros mitocondriales en insectos garantiza no solo el uso de una menor cantidad de individuos (máximo 5 individuos) para la ejecución de los ensayos, sino también la obtención de valores acordes al funcionamiento mitocondrial en el medio celular y con las interacciones intracelulares correspondientes.

En este estudio se describe por primera vez el comportamiento respiratorio mitocondrial a lo largo del ciclo de vida de *Ae. aegypti* empleando mitocondrias aisladas y tejido permeabilizado. Los valores mas altos de consumo de oxígeno (estado 3) se obtuvieron al emplear el sustrato

PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Ae. aegypti*

succinato como sustrato oxidable en todas las fases de desarrollo de *Ae. aegypti*, con un aumento progresivo en los valores registrados desde larva (mitocondrias aisladas: $30,3 \pm 5,0$ pmol/(s*mL), tejido permeabilizado: $48,8 \pm 1,8$ pmol/(s*mL)), pasando por pupa (mitocondrias aisladas: $42,8 \pm 3,6$ pmol/(s*mL); tejido permeabilizado: $47,4 \pm 2,2$ pmol/(s*mL)), hasta adulto (mitocondrias aisladas: $53,4 \pm 6,0$ pmol/(s*mL); tejido permeabilizado: $27,4 \pm 2,4$ pmol/(s*mL)). Estos resultados se sustentan con los valores obtenidos de la actividad enzimática, con una mayor actividad de las enzimas Succinato oxidasa y Succinato deshidrogenasa (Complejo II).

Los valores obtenidos del cálculo de los valores del Coeficiente de Control Respiratorio (CCR) empleando mitocondrias aisladas y tejido permeabilizado para todas las fases de desarrollo de *Ae. aegypti* fueron menores a los reportados en literatura, con valores que oscilaron entre 1 y 1,8, sugiriendo la presencia de mitocondrias dañadas o desacopladas. Sin embargo, los resultados derivados de la medición de integridad mitocondrial al emplear Citocromo c, indicaron la presencia de mitocondrias íntegras. Esta discordancia en los resultados obtenidos puede deberse no solo a las condiciones de aislamiento mitocondrial, sino a factores intrínsecos propios, como presencia de sustratos endógenos o proteínas desacopladoras como la UCP4, localizada en la membrana mitocondrial interna de invertebrados. Aunque se conoce muy poco sobre el rol de esta proteína desacopladora, entre sus principales funciones se encuentra el regular el potencial de membrana mitocondrial y los niveles de ROS, además de incrementar la síntesis de ATP mediante su interacción directa con el Complejo II.

La respiración mitocondrial en la fase de larva se caracteriza por un mayor ingreso de electrones con el sustrato succinato (Complejo II), seguido de los sustratos glutamato, malato y prolina+piruvato (Complejo I). Debido a que las L4 no se alimentan durante la mitad de su fase de desarrollo y están cercanas a pasar a pupa, donde gran parte de los tejidos son degradados y

PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Ae. aegypti*

reciclados para servir de soporte y recurso en la formación del ejemplar adulto, el aporte de electrones está dirigido al almacenamiento de glucógeno en tejido graso y en el abdomen. Adicionalmente, las larvas suelen pasar por algunos periodos de hipoxia, durante los cuales se desplazan hacia el fondo del agua para alimentarse y como estrategia de evasión frente a potenciales amenazas. Una de las estrategias empleadas y que da flexibilidad de adaptación a rápidos cambios ambientales, consiste en la activación de la vía catabólica de oxidación de ácidos grasos en el Ciclo de Krebs para la obtención de succinato su ingreso en la cadena transportadora de electrones.

La respiración mitocondrial en la fase de pupa se da principalmente mediante el ingreso de electrones vía Complejo II y Prolina deshidrogenasa, empleando succinato y prolina+piruvato como sustratos oxidables, con valores de consumo de oxígeno ligeramente menores al de larvas. Al igual que con la fase de larva, la pupa también pasa por periodos de hipoxia, recurriendo a la activación de la vía catabólica de oxidación de ácidos grasos para la obtención de succinato como fuente de electrones y para procesos de recuperación de la capacidad oxidativa. Este comportamiento se suma a que la pupa no se alimenta y posee un metabolismo basal lento, presentándose un decline en la producción de biomasa, pues los lípidos almacenados son metabolizados para proveer energía para los procesos de histólisis (muerte celular programada), división celular, diferenciación y la emergencia del individuo adulto. Por último, la presencia de prolina en la pupa juega un rol esencial en el metabolismo y en la síntesis de la cutícula durante los cambios de muda como suplemento energético.

Entre todas las fases de desarrollo de *Ae. aegypti*, el adulto cuenta con un mayor número de estudios relacionados con la fisiología mitocondrial en hembras con alimentación sanguínea. No obstante, el presente estudio se describe la respiración mitocondrial en hembras alimentadas

únicamente con azúcar, las cuales se caracterizan por presentar un mayor ingreso de electrones con el sustrato succinato (Complejo II), seguido del sustrato G3P. Las hembras recién emergidas poseen escasas reservas de glucógeno, por lo que inicialmente solo buscan recursos alimenticios centrados en carbohidratos y azúcares, haciendo uso de las reservas teneales obtenidas durante la fase larval para su actividad de búsqueda alimenticia. La alta actividad de la enzima Succinato oxidasa indica un transporte activo de electrones a través del complejo II, cuya función fisiológica podría contribuir a la disminución de especies reactivas de oxígeno (ROS), especialmente en tejidos con alta demanda energética como el músculo del vuelo. El uso de G3P se relaciona con la acción de la enzima Glicerol quinasa durante la lipólisis, permitiendo el uso de G3P para contrarrestar la alta demanda energética del músculo del vuelo al agotar casi totalmente el glucógeno almacenado en los cuerpos grasos y en los músculos torácicos. Adicionalmente, parte de G3P producido en este músculo es liberado directamente en la hemolinfa para ser transportado hacia el cuerpo graso, de manera que parte de este sustrato no entra a la fosforilación oxidativa.

Bibliografía Citada

- Bajda, S., Dermauw, W., Panteleri, R., Sugimoto, N., Douris, V., Tirry, L., Osakabe, M., Vontas, J., & Van Leeuwen, T. (2017). A mutation in the PSST homologue of complex I (NADH : ubiquinone oxidoreductase) from *Tetranychus urticae* is associated with resistance to METI acaricides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 80(2017), 79–90. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2016.11.010>
- Baracca, A., Sgarbi, G., Solaini, G., & Lenaz, G. (2003). Rhodamine 123 as a probe of mitochondrial membrane potential: evaluation of proton flux through F(0) during ATP synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1606(1-3), 137–146. [https://doi.org/10.1016/s0005-2728\(03\)00110-5](https://doi.org/10.1016/s0005-2728(03)00110-5)
- Barron, E. S. G., & Tahmisian, T. N. (1948). The metabolism of cockroach muscle (*Periplaneta americana*). *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 32(1), 57–76. <https://doi.org/10.1002/jcp.1030320105>
- Beconi, M. T. (1981). Actividad de oxidasa alternativa y respiración mitocondrial en plantas superiores. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/greenstone3/exa/collection/tesis/document/tesis_n1674_Beconi
- Beenackers, A. M. T., Th. Beenackers, A. M., Van der Horst, D. J., & Van Marrewijk, W. J. A. (1984). Insect flight muscle metabolism. In *Insect Biochemistry*. Vol. 14, Issue 3, pp. 243–260. [https://doi.org/10.1016/0020-1790\(84\)90057-x](https://doi.org/10.1016/0020-1790(84)90057-x)
- Beenackers, A. M. T., Van der Horst, D. J., & Van Marrewijk, W. J. A. (1981). Role of Lipids in Energy Metabolism. In R. G. H. Downer (Ed.), *Energy Metabolism in Insects* (pp. 53–100). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-9221-1_3

- Beenackers, A. M. T., Van der Horst, D. J., & Van Marrewijk, W. J. A. (1984). Insect flight muscle metabolism. *Insect Biochemistry*, *14*(3), 243–260. [https://doi.org/10.1016/0020-1790\(84\)90057-X](https://doi.org/10.1016/0020-1790(84)90057-X)
- Bensley, R. R., & Hoerr, N. L. (1934). Studies on cell structure by the freezing-drying method VI. The preparation and properties of mitochondria. In *The Anatomical Record* (Vol. 60, Issue 4, pp. 449–455). <https://doi.org/10.1002/ar.1090600408>
- Bhatt, S., Gething, P., Brady, O., Messina, J., Farlow, A., Moyes, C., Drake, J., Brownstein, J., Hoen, A., Sankoh, O., Myers, M., George, D., Jaenisch, T., Wint, W., Simmons, C., Scott, T., Farrar, J., & Hay, S. (2013). The global distribution and burden of dengue. *Nature*, *496*((7446)), 504–507. <https://doi.org/10.1038/nature12060>
- Bolter, C. J., & Chefurka, W. (1990). Extramitochondrial release of hydrogen peroxide from insect and mouse liver mitochondria using the respiratory inhibitors phosphine, myxothiazol, and antimycin and spectral analysis of inhibited cytochromes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *278*(1), 65–72. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(90\)90232-N](https://doi.org/10.1016/0003-9861(90)90232-N)
- Borrero-Landazabal, M. A., Duque, J. E., & Mendez-Sanchez, S. C. (2020). Model to design insecticides against *Aedes aegypti* using in silico and in vivo analysis of different pharmacological targets. *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology: CBP*, *229*, 108664. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2019.108664>
- Borrero, M. A., Carreño, 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*(June 2017), 19–26. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2017.11.006>

PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Ae. aegypti*

- Bounias, M., Vivarès, C. P., & Nizeyimana, B. (1989). Functional relationships between free amino acids in the hemolymph of fourth instar larvae of the mosquito *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) as a basis for toxicological studies. *Journal of Invertebrate Pathology*, 54(1), 16–22. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(89\)90133-x](https://doi.org/10.1016/0022-2011(89)90133-x)
- 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, 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Briegel, H., Knüsel, I., & Timmermann, S. E. (2001). *Aedes aegypti*: size, reserves, survival, and flight potential. *Journal of Vector Ecology: Journal of the Society for Vector Ecology*, 26(1), 21–31. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11469181>
- Bringaud, F., Rivière, L., & Coustou, V. (2006). Energy metabolism of trypanosomatids: adaptation to available carbon sources. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 149(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2006.03.017>
- Bursell, E. (1975). Substrates of oxidative metabolism in dipteran flight muscle. *Comparative Biochemistry and Physiology. B, Comparative Biochemistry*, 52(2), 235–238. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(75\)90057-7](https://doi.org/10.1016/0305-0491(75)90057-7)
- Candy, D. J. (1970). Metabolic studies on locust flight muscle using a new perfusion technique. *Journal of Insect Physiology*, 16(3), 531–543. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(70\)90192-7](https://doi.org/10.1016/0022-1910(70)90192-7)
- Castillo-Morales, R. M., Carreño Otero, A. L., Mendez-Sanchez, S. C., Da Silva, M. A. N., 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: Toxicology and Pharmacology*, 221. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2019.03.006>

PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Ae. aegypti*

- Castrillón, J., Carlos, J., & Urcuqui, S. (2014). Dengue en Colombia, diez años de evolución. *Revista Chilena de Infectología*, 32((2)), 22–29. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182015000300002>
- Cecchini, G. (2003). Function and structure of complex II of the respiratory chain. *Annual Review of Biochemistry*, 72, 77–109. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.72.121801.161700>
- Chance, B., & Williams, G. R. (1955). A simple and rapid assay of oxidative phosphorylation. *Nature*, 175, 1120–1121. <https://doi.org/10.1038/1751120a0>
- Chaput, R. L., & Liles, J. N. (1969). Free and peptide-bound amino acids during the larval and pupal stages of the yellow-fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Annals of the Entomological Society of America*, 62(4), 742–747. <https://doi.org/10.1093/aesa/62.4.742>
- Chen, W. W., Freinkman, E., Wang, T., Birsoy, K., & Sabatini, D. M. (2016). Absolute quantification of matrix metabolites reveals the dynamics of mitochondrial metabolism. *Cell*, 166(5), 1324–1337.e11. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.07.040>
- Claude, A. (1946). Fractionation of mammalian liver cells by differential centrifugation : I. problems, methods, and preparation of extract. *The Journal of Experimental Medicine*, 84(1), 51–59. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19871553>
- Colinet, H., Renault, D., & Roussel, D. (2017). Cold acclimation allows *Drosophila* flies to maintain mitochondrial functioning under cold stress. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 80, 52–60. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2016.11.007>
- Correa, C. C., Aw, W. C., Melvin, R. G., Pichaud, N., & Ballard, J. W. O. (2012). Mitochondrial DNA variants influence mitochondrial bioenergetics in *Drosophila melanogaster*. *Mitochondrion*, 12(4), 459–464. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2012.06.005>

- Correa, J., 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>
- Deshwal, S., Onishi, M., Tatsuta, T., Bartsch, T., Cors, E., Ried, K., Lemke, K., Nolte, H., Giavalisco, P., & Langer, T. (2023). Mitochondria regulate intracellular coenzyme Q transport and ferroptotic resistance via STARD7. *Nature Cell Biology*, *25*(2), 246–257. <https://doi.org/10.1038/s41556-022-01071-y>
- Djafarzadeh, S., & Jakob, S. M. (2017). High-resolution Respirometry to Assess Mitochondrial Function in Permeabilized and Intact Cells. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, *120*. <https://doi.org/10.3791/54985>
- Dou, X., Chen, K., Brown, M. R., & Strand, M. R. (2023). Multiple endocrine factors regulate nutrient mobilization and storage in *Aedes aegypti* during a gonadotrophic cycle. *Insect Science*, *30*(2), 425–442. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.13110>
- Dröse, S., & Brandt, U. (2012). Molecular mechanisms of superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *748*, 145–169. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3573-0_6
- Dunham-Snary, K. J., Sandel, M. W., Westbrook, D. G., & Ballinger, S. W. (2014). A method for assessing mitochondrial bioenergetics in whole white adipose tissues. *Redox Biology*, *2*, 656–660. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2014.04.005>
- Emaus, R. K., Grunwald, R., & Lemasters, J. J. (1986). Rhodamine 123 as a probe of transmembrane potential in isolated rat-liver mitochondria: spectral and metabolic properties. *Biochimica et Biophysica Acta*, *850*(3), 436–448. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(86\)90112-x](https://doi.org/10.1016/0005-2728(86)90112-x)
- Ernster, L., & Schatz, G. (1981). *Mitochondria : A Historical Review*. *91*(December).

PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Ae. aegypti*

- Frezza, C., Cipolat, S., & Scorrano, L. (2007). Organelle isolation: functional mitochondria from mouse liver, muscle and cultured fibroblasts. *Nature Protocols*, 2(2), 287–295. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.478>
- Gaviraghi, A., Aveiro, Y., Carvalho, S. S., Rosa, R. S., Oliveira, M. P., & Oliveira, M. F. (2021). Mechanical permeabilization as a new method for assessment of mitochondrial functions in insect tissues. In V. Weissig & M. Edeas (Eds.), *Mitochondrial Medicine : Volume 2: Assessing Mitochondria* (pp. 67–85). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1266-8_5
- Gaviraghi, A., & Oliveira, M. F. (2019). A method for assessing mitochondrial physiology using mechanically permeabilized flight muscle of *Aedes aegypti* mosquitoes. *Analytical Biochemistry*, 576, 33–41. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2019.04.005>
- Giacomello, M., Pyakurel, A., Glytsou, C., & Scorrano, L. (2020). The cell biology of mitochondrial membrane dynamics. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 21(4), 204–224. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0210-7>
- Giulivi, C., Ross-Inta, C., Horton, A. A., & Luckhart, S. (2008). Metabolic pathways in *Anopheles stephensi* mitochondria. *Biochemical Journal*, 415(2), 309–316. <https://doi.org/10.1042/BJ20080973>
- Goldstrohm, D. A., Pennington, J. E., & Wells, M. A. (2003). The role of hemolymph proline as a nitrogen sink during blood meal digestion by the mosquito *Aedes aegypti*. *Journal of Insect Physiology*, 49(2), 115–121. [https://doi.org/10.1016/s0022-1910\(02\)00267-6](https://doi.org/10.1016/s0022-1910(02)00267-6)
- Goncalves, R., Machado, A. C. L., Paiva-silva, G. O., Marcos, H. F., Momoli, M. M., Oliveira, J. H. M., Vannier-santos, M. A., Oliveira, P. L., & Oliveira, M. F. (2009). Blood-feeding induces reversible functional changes in flight muscle mitochondria of *Aedes aegypti* Mosquito. *PloS One*, 4(11), 7854–7865. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007854>

PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Ae. aegypti*

- González, P. D. S. (2004). *Control Respiratorio*. 1–12.
- Grimm, S. (2013). Respiratory chain complex II as general sensor for apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1827(5), 565–572. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.09.009>
- Gualberto, J. M., Handa, H., & Grienenberger, J. M. (1995). Isolation and fractionation of plant mitochondria and chloroplasts: specific examples. *Methods in Cell Biology*, 50, 161–175. [https://doi.org/10.1016/s0091-679x\(08\)61029-8](https://doi.org/10.1016/s0091-679x(08)61029-8)
- Hartwig, S., Kotzka, J., & Lehr, S. (2015). Isolation and quality control of functional mitochondria. In *Methods in Molecular Biology* (pp. 9–23). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2257-4_2
- Hearne, A., Chen, H., Monarchino, A., & Wiseman, J. S. (2020). Oligomycin-induced proton uncoupling. *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA*, 67, 104907. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2020.104907>
- Hogeboom, G. H., Schneider, W. C., & Pallade, G. E. (1948). Cytochemical studies of mammalian tissues: i. isolation of intact mitochondria from rat liver; some biochemical properties of mitochondria and submicroscopic particulate material. *The Journal of Biological Chemistry*, 172(2), 619–635. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52749-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52749-1)
- Hu, J., Liang, P., Shi, X., & Gao, X. (2008). Effects of insecticides on the fluidity of mitochondrial membranes of the diamondback moth, *Plutella xylostella*, resistant and susceptible to avermectin. *Journal of Insect Science*, 8, 3. <https://doi.org/10.1673/031.008.0301>
- 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>

PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Ae. aegypti*

- Kuznetsov, A. V., Veksler, V., Gellerich, F. N., Saks, V., Margreiter, R., & Kunz, W. S. (2008). Analysis of mitochondrial function *in situ* in permeabilized muscle fibers, tissues and cells. *Nature Protocols*, 3(6), 965–976. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.61>
- Liao, P.-C., Bergamini, C., Fato, R., Pon, L. A., & Pallotti, F. (2020). Isolation of mitochondria from cells and tissues. *Methods in Cell Biology*, 155, 3–31. <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2019.10.002>
- Madrigal, Vázquez, Peimbert, & Perez. (2010). De la bioenergética a la bioquímica del ATP. *ContactoS*, 77(2), 39–45. <http://www.izt.uam.mx/newpage/contactos/anterior/n77ne/atp.pdf>
- Mailloux, R. J. (2015). Teaching the fundamentals of electron transfer reactions in mitochondria and the production and detection of reactive oxygen species. *Redox Biology*, 4, 381–398. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.02.001>
- Mason, T. L., & Schatz, G. (1973). Cytochrome c oxidase from Bakers' Yeast. In *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 248, Issue 4, pp. 1355–1360). [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)44306-8](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)44306-8)
- 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>
- Miwa, S., St-Pierre, J., Partridge, L., & Brand, M. D. (2003). Superoxide and hydrogen peroxide production by *Drosophila* mitochondria. *Free Radical Biology & Medicine*, 35(8), 938–948. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(03\)00464-7](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(03)00464-7)
- Nicholls, D. G., Palmeira, C. M., & Moreno, A. J. (2012). *Mitochondrial Bioenergetics: Methods and Protocols*.
- O'Connor, J. E., Vargas, J. L., Kimler, B. F., Hernandez-Yago, J., & Grisolia, S. (1988). Use of rhodamine 123 to investigate alterations in mitochondrial activity in isolated mouse liver

PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Ae. aegypti*

mitochondria. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 151(1), 568–573.

[https://doi.org/10.1016/0006-291x\(88\)90632-8](https://doi.org/10.1016/0006-291x(88)90632-8)

Palmer, C. S., Osellame, L. D., Stojanovski, D., & Ryan, M. T. (2011). The regulation of mitochondrial morphology: intricate mechanisms and dynamic machinery. *Cellular Signalling*, 23(10), 1534–1545. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2011.05.021>

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 (Sdh-d) polymorphic insect. *The Journal of Experimental Biology*, 221(Pt 6). <https://doi.org/10.1242/jeb.171009>

Pérez, A. (2013). Cadena de transporte de electrones mitocondrial, una nueva visión (Colegio of). Zaragoza: Cometa, S.A. Retrieved from <http://www.academiadefarmaciadearagon.es/docs/Documentos/Documento52.pdf>

Picard, M., & McEwen, B. S. (2018). Psychological Stress and Mitochondria. *Psychosomatic Medicine*, 80(2), 141–153. <https://doi.org/10.1097/PSY.0000000000000545>

Picard, M., Taivassalo, T., Gouspillou, G., & Hepple, R. T. (2011). Mitochondria: isolation, structure and function. *The Journal of Physiology*, 589(Pt 18), 4413–4421. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.212712>

Picard, M., Taivassalo, T., Ritchie, D., Wright, K. J., Thomas, M. M., Romestaing, C., & Hepple, R. T. (2011). Mitochondrial Structure and Function Are Disrupted by Standard Isolation Methods. In *PLoS ONE* (Vol. 6, Issue 3, p. e18317). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018317>

Picard, M., Wallace, D. C., & Burelle, Y. (2016). The rise of mitochondria in medicine. *Mitochondrion*, 30, 105–116. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2016.07.003>

PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Ae. aegypti*

- Popkov, V. A., Plotnikov, E. Y., Zorova, L. D., Pevzner, I. B., Silachev, D. N., Babenko, V. A., Jankauskas, S. S., Zorov, S. D., & Zorov, D. B. (2016). Quantification of mitochondrial morphology *in situ*. *Tsitologiya*, 58(9), 699–706. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30198684>
- Pullman, M. E., Penefsky, H. S., Datta, A., & Racker, E. (1960). Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. In *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 235, Issue 11, pp. 3322–3329). [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(20\)81361-1](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(20)81361-1)
- Redecker, B., & Zebe, E. (1988). Anaerobic metabolism in aquatic insect larvae: studies on *Chironomus thummi* and *Culex pipiens*. *Journal of Comparative Physiology. B, Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 158(3), 307–315. <https://doi.org/10.1007/BF00695329>
- Rodríguez Cruz, R. (2002). Estrategias para el control del dengue y del *Aedes aegypti* en las Américas. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602002000300004
- Rodríguez-Morales, A. (2015a). Aedes: un eficiente vector de viejos y nuevos arbovirus (dengue, chikungunya y zika) en las Américas. *Rev. Cuerpo Med.*, 8(2), 50–52.
- Rodríguez-Morales, A. (2015b). No era suficiente con dengue y chikungunya : llegó también Zika. *iMedPub Journals*, 11(2-3), 1–4. <https://doi.org/10.3823/1245>
- Sacktor, B. (1953). Investigations on the mitochondria of the house fly, *Musca domestica* L. I. Adenosinetriphosphatases. *The Journal of General Physiology*, 36(3), 371–387. <https://doi.org/10.1085/jgp.36.3.371>
- Saks, V. A., Belikova, Y. O., & Kuznetsov, A. V. (1991). In vivo regulation of mitochondrial respiration in cardiomyocytes: specific restrictions for intracellular diffusion of ADP. In

PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Ae. aegypti*

Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects (Vol. 1074, Issue 2, pp. 302–311).

[https://doi.org/10.1016/0304-4165\(91\)90168-g](https://doi.org/10.1016/0304-4165(91)90168-g)

Saks, V. A., Veksler, V. I., Kuznetsov, A. V., Kay, L., Sikk, P., Tiivel, T., Tranqui, L., Olivares, J., Winkler, K., Wiedemann, F., & Kunz, W. S. (1998). Permeabilized cell and skinned fiber techniques in studies of mitochondrial function in vivo. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *184*(1-2), 81–100. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9746314>

Scaraffia, P. Y., & Wells, M. A. (2003). Proline can be utilized as an energy substrate during flight of *Aedes aegypti* females. *Journal of Insect Physiology*, *49*(6), 591–601. [https://doi.org/10.1016/s0022-1910\(03\)00031-3](https://doi.org/10.1016/s0022-1910(03)00031-3)

Shaw, M. C. (1971). Microdetermination of phosphorus in proteins. *Analytical Biochemistry*, *44*(1), 288–291. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(71\)90371-x](https://doi.org/10.1016/0003-2697(71)90371-x)

Singer, T. P. (1974). Determination of the activity of Succinate, NADH, Choline and α-Glycerophosphate dehydrogenases. *Methods of Biochemical Analysis*, *22*, 123–175.

Slocinska, M., Barylski, J., & Jarmuszkiewicz, W. (2016). Uncoupling proteins of invertebrates: A review. *IUBMB Life*, *68*(9), 691–699. <https://doi.org/10.1002/iub.1535>

Somlo, M. (1965). Induction des laticocytocrome c reductases (D-ET L-) de la levure aerobie par les lactates (D- ET t-). *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, *4*, 183–201.

Sun, F., Huo, X., Zhai, Y., Wang, A., Xu, J., Su, D., Bartlam, M., & Rao, Z. (2005). Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II. *Cell*, *121*(7), 1043–1057. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.05.025>

Sun, F., Zhou, Q., Pang, X., Xu, Y., & Rao, Z. (2013). Revealing various coupling of electron transfer and proton pumping in mitochondrial respiratory chain. *Current Opinion in Structural Biology*, *23*(4), 526–538. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2013.06.013>

PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Ae. aegypti*

- Thompson, S. N. (2003). Trehalose—the insect “blood”sugar. *Advances in Insect Physiology*.
https://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=EogT_YtQREAC&oi=fnd&pg=PA205&dq=Thompson+2003+The+insect+blood+sugar+Advances+in+insect+physiology&ots=svwVCaLOaL&sig=f--QyMoKg7n28OgMYR7f_5Bj8ew
- Van den Bergh, S. G. (1967). [22] Insect mitochondria. In *Methods in Enzymology* (pp. 117–122).
[https://doi.org/10.1016/0076-6879\(67\)10025-6](https://doi.org/10.1016/0076-6879(67)10025-6)
- VenkatRao, V., Chaitanya, R. K., Naresh Kumar, D., Bramhaiah, M., & Dutta-Gupta, A. (2016). Developmental and hormone-induced changes of mitochondrial electron transport chain enzyme activities during the last instar larval development of maize stem borer, *Chilo partellus* (Lepidoptera: Crambidae). *General and Comparative Endocrinology*, 239, 32–39.
<https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2015.12.015>
- Vercesi, A. E., Bernardes, C. F., Hoffmann, M. E., Gadelha, F. R., & Docampo, R. (1991). Digitonin permeabilization does not affect mitochondrial function and allows the determination of the mitochondrial membrane potential of *Trypanosoma cruzi* in situ. In *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 266, Issue 22, pp. 14431–14434). [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)98703-x](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)98703-x)
- Vesga, L. C., Bueno, Y., Stashenko, E., & Mendez Sánchez, S. C. (2014). Efecto del aceite esencial de *Eucalyptus citriodora* sobre el metabolismo energético mitocondrial. *Revista Colombiana de Química*, 43(2), 10–17. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v43n2.53118>
- Vital, W. D. E. O. (2006). *Metabolismo de Glicose Durante a Embriogênese do Mosquito Aedes aegypti (Diptera: Culicidae)*.

PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Ae. aegypti*

Voss, D. O., Campello, A. P., & Bacila, M. (1961). The respiratory chain and the oxidative phosphorylation of rat brain mitochondria. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 4, 48–51. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(61\)90253-4](https://doi.org/10.1016/0006-291x(61)90253-4)

Weaver, S., & Lecuit, M. (2015). Chikungunya Virus and the Global Spread of a Mosquito-Borne Disease. *The New England Journal of Medicine*, 372, 1231–1239. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1406035>.

2. CAPITULO II

PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Aedes aegypti*

2.1 INTRODUCCIÓN

El desarrollo de las ciencias ómicas ha dado paso a la implementación de nuevas tecnologías que contribuyen a tener una visualización total del genoma, transcriptoma, proteoma y metaboloma con el fin de comprender la complejidad biológica de un organismo en sus diferentes niveles de desarrollo biológico. Particularmente, resulta una aplicación metodológica que se integra en la visualización de potenciales dianas farmacéuticas (Pando & Lanz, 2009). En los últimos años, el desarrollo de técnicas de secuenciación de nueva generación (*Next Generation Sequencing*-NGS) ha permitido conocer diferentes aspectos genéticos y funcionales de un sin número de organismos, permitiendo la rápida caracterización de diferentes genomas, particularmente de especies de interés en salud pública. La descripción del genoma de *Anopheles gambiae* en el 2003 (Holt *et al.*, 2002), principal vector de la malaria, fomentó el interés por el conocimiento y uso de recursos entomológicos moleculares y su posterior aplicación en el diseño de nuevas estrategias de control enfocadas en la modificación específica de genes.

Aedes aegypti, principal transmisor de los serotipos del virus dengue y de los alfavirus del chikungunya y Zika (Bhatt *et al.*, 2013; Castrillón *et al.*, 2014; Rodríguez Cruz, 2002; Rodríguez-Morales, 2015a, 2015b; Weaver & Lecuit, 2015), es considerado como modelo de estudio de muchos trabajos científicos debido a su fácil transición de condiciones de campo a laboratorio y sus condiciones cómodas de manejo en colonia (Akbari *et al.*, 2013; Timoshevskiy *et al.*, 2013). Sin embargo, solo hasta 1991 se realizó la primera aproximación para describir su genoma,

PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Ae. aegypti*

estimándolo en ~813 Mbp (Warren & Crampton, 1991). Posteriormente, en el 2007, se redescubrió que su genoma consta 1376 Mpb, con 50% de elementos transponibles (Nene *et al.*, 2007; Sinkins, 2010).

Aun cuando se cuenta también con la descripción del genoma mitocondrial de *Ae. aegypti* (Behura *et al.*, 2011), este ha sido enfocado principalmente en estudios evolutivos de genética de poblaciones y sistemática filogenética (Desalle *et al.*, 2017). Para ello, fueron empleados genes altamente conservados como el COI que codifica para citocromo oxidasa, y el gen que codifica para el complejo NADH deshidrogenasa (Complejo 1), especialmente las subunidades ND4 y ND5 (Paduan & Ribolla, 2008). Los escasos análisis de expresión génica mitocondrial en *Ae. aegypti*, enfocados en la identificación de nuevos mecanismos de acción para el desarrollo de insecticidas, describen las diferencias en la expresión del citocromo b frente a diferentes condiciones abióticas (altas temperaturas, radiación ultravioleta y acción de pesticidas) y en diferentes fases de desarrollo (Zhao *et al.*, 2009).

Sin embargo, con todos los avances hasta la fecha publicados en la literatura científica, no se ha descrito el proteoma mitocondrial de *Ae. aegypti*, así como su papel funcional en cada una de las etapas de desarrollo del mosquito en relación con la bioenergética propia de cada fase de desarrollo. Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, se debe considerar que no todas las proteínas presentes en la cadena respiratoria mitocondrial son codificadas directamente por el ADN mitocondrial mtADN (Nene *et al.*, 2007), llegando a presentar posibles variaciones en la expresión en relación con los cambios metabólicos propios de cada fase metamórfica de desarrollo. Estas posibles modificaciones en la expresión génica influyen en el funcionamiento de la cadena respiratoria mitocondrial, contribuyendo a la adaptación de las fases juveniles a medioambientes

acuáticos, así como cambios en individuos adultos que les permita la adquisición de diferentes mecanismos de resistencia a insecticidas (Akbari *et al.*, 2013).

Una de las técnicas más empleadas para confirmar la identificación proteica consiste en el uso de ARN-seq. Esta técnica brinda información de la secuencia y estructura de exones, así como una visión general de los genes activados o reprimidos sin restringirse a genes previamente caracterizados, permitiendo analizar sus niveles de expresión y la presencia de transcritos desconocidos (Rodríguez Cubillos *et al.*, 2014). Akbari *et al.* (2013) realizaron la descripción del transcriptoma de *Ae. aegypti* a través de diferentes fases del ciclo de vida del mosquito empleando como principal herramienta la técnica de ARN-seq. Los autores identificaron un total de 14238 nuevas regiones transcritas, con un nivel de confirmación del 99% de genes previamente descritos.

Considerando lo anteriormente expuesto, en el presente capítulo se caracteriza la expresión génica mitocondrial de diferentes fases de desarrollo de *Ae. aegypti*, en busca de proteínas diferencialmente expresadas e implicadas en funciones metabólicas propias de cada fase.

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 GENERAL

Analizar el proteoma mitocondrial de las fases de larva, pupa y adulto de *Ae. aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae).

2.2.2 ESPECÍFICOS

Identificar y caracterizar el proteoma mitocondrial de las fases de larva, pupa y adulto de *Ae. aegypti*.

Confirmar la expresión génica mitocondrial mediante RNAseq de las fases de larva, pupa y adulto de *Ae. aegypti*.

Caracterizar algunas proteínas de importancia funcional mitocondrial de las fases de desarrollo de *Ae. aegypti* mediante análisis bioinformático.

2.3 MATERIALES Y MÉTODOS

2.3.1 Colonia *Aedes aegypti*

Todos los experimentos fueron realizados con una colonia Rockefeller de *Ae. aegypti*, mantenida en jaulas de cría (40×40×40 cm) en insectario a $25 \pm 5^\circ\text{C}$, humedad de $70 \pm 5\%$ y fotoperiodo (12:12). A los individuos de *Ae. aegypti* se les brindó permanentemente una solución azucarada de miel disuelta aproximadamente al 10% (P/v). Cada ocho días, dependiendo de la necesidad de material biológico, se suministró a las hembras alimentación sanguínea para la

PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Ae. aegypti*

obtención de huevos utilizando rata albina (*Rattus norvegicus*) de raza Wistar WI IOPS AF/Han, facilitada por el bioterio de la Universidad Industrial de Santander, cumpliendo las disposiciones de la ley 84 de 1989 del Congreso de Colombia, la aprobación del Comité de ética en investigación Científica de la Universidad Industrial de Santander (CEINCI-UIS) (Acta No. 21 del 23 de noviembre de 2018) y la Resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia. Las larvas de la colonia madre se mantuvieron en bandejas plásticas en un número constante y se alimentaron con concentrado para peces TetraMin Tropical Flakes®.

2.3.2 Componente Experimental

2.3.2.1. Aislamiento de mitocondrias

De la colonia de *Ae. aegypti* se seleccionaron aproximadamente 3000 larvas L4, 300 pupas y el músculo de vuelo extraído del tórax de 280 adultos para cada muestra de mitocondrias analizada. Para la obtención de mitocondrias se empleó el protocolo descrito por Borrero *et al.* (2018), descrito en la sección 1.2.3.1 del capítulo 1.

2.3.2.2. Extracción de proteínas mitocondriales

Posterior a la obtención de mitocondrias para cada una de las fases de desarrollo de *Ae. aegypti*, se procedió a preparar esta muestra para realizar el análisis proteómico mediante electroforesis bidimensional (2D). Para ello, se modificó el protocolo descrito por Ferro *et al.*, (2002) y Santoni *et al.*, (2000): El pellet obtenido en la última centrifugación a 7000 g por 10 min se resuspendió en 100 mL buffer de lisis (7 M Urea, 2 M Tiourea, Triton X-100, 0,5% P/v, formalitos 1,2% P/v, DTT 20 mM, CHAPS 4% P/v). La muestra se incubó en agitación suave a 4°C por 15 minutos para su posterior centrifugación a 12000 g por 15 minutos. Se determinó la concentración de proteína de la muestra con el método colorimétrico de Bradford (Bradford, 1976)

PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Ae. aegypti*

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, utilizando una curva de calibración de albúmina sérica bovina BSA. La muestra se almacenó a -80°C hasta ser empleada en la electroforesis bidimensional.

2.3.2.3. Electroforesis bidimensional (2D PAGE)

Una vez obtenidas las proteínas mitocondriales, se procedió a caracterizar e identificar el proteoma mitocondrial diferencial de las fases de larva, pupa y adulto de *Ae. aegypti* mediante electroforesis bidimensional 2D-PAGE. La electroforesis bidimensional 2D-PAGE consiste en la separación inicial de las proteínas de acuerdo con su punto isoeléctrico, seguido de una separación acorde a su peso molecular. Para realizar la separación de la muestra de proteínas por su punto isoeléctrico, se emplearon tiras de gradiente no lineal de pH inmovilizado IPG (Immobilized pH gradient) con rango de pH de 3 a 10, previamente hidratadas con 125 µL de una mezcla de Buffer de rehidratación (Urea 8M, Tiourea 2M, CHAPS 4% P/v, DTT 50 mM, anfolitos 0,2% P/v del mismo rango de pH de las tiras y azul de bromofenol 0,002% P/v) y una muestra de las proteínas a una concentración de 180 µg/ µL. Las tiras se rehidrataron durante 16 horas.

Luego de ese tiempo, las tiras se trasladaron a una bandeja o cámara de Isoelectroenfoque IEF (PROTEAN® i12™ IEF System (Bio-Rad), donde las proteínas se separaron aplicando una diferencia de potencial de forma gradual durante tres etapas: la primera etapa con un voltaje máximo de 100 V por 20 minutos, la segunda con un voltaje máximo de 4000 V durante 2 horas y la tercera a un voltaje máximo de 10000 V por 1 hora. Después del IEF, las tiras de IPG se equilibraron en 2mL de buffer de equilibrio I (Urea 6 M, TrisHCl 0,38M pH 8,8, SDS 2% p/v, glicerol 20% v/v, DTT 2% p/v), permaneciendo en agitación suave durante 10 minutos.

PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Ae. aegypti*

Posteriormente, este buffer se descartó y se adiciono 2 mL de buffer de equilibrio II (Urea 6 M, TrisHCl 0,38M pH 8,8, SDS 2% p/v, glicerol 20% v/v, Yodoacetamida 2,5% P/v), permaneciendo en agitación suave durante 10 minutos para finalmente ser descartado.

En la segunda dimensión se separaron las proteínas según su peso molecular. Para ello, las tiras IPG fueron sumergidas cuidadosamente en 100 mL de buffer de corrida (Glicina 1,44%, Tris-base 0,20%, SDS 0,10%). Se emplearon geles de SDS - PAGE al 12% en una cámara electroforética (Bio-Rad) y se ubicaron horizontalmente las tiras IPG obtenidas en el IEF sobre el borde superior derecho del gel. Luego se adicionó agarosa overlay (Agarosa 0,5% P/v, Tris-HCl 25 mM, Glicina 192 mM, SDS 0,1% P/v, azul de Bromofenol 0,002 % P/v) a temperatura ambiente. Una vez los geles se solidificaron, se ubicaron en la cámara de electroforesis, se adicionó buffer de corrida y se conectó la cámara a una fuente de poder (Bio-Rad). La primera fase de la corrida fue a 10 V durante 15 minutos y luego un voltaje constante de 150 V durante 1 hora y 15 minutos. Una vez finalizada la segunda dimensión, las proteínas en los geles se fijaron con una solución compuesta de azul Coomassie R-250 (0,25%), metanol 50% V/v, Ácido acético 10% V/v y agua tipo I durante 24 horas en agitación suave. Posteriormente se trataron con una solución de decolorante fuerte (metanol 50% V/v y ácido acético 10% V/v) por una hora y luego se almacenaron en una solución de decolorante débil (metanol 5% V/v y ácido acético 10% V/v). Para cada fase de desarrollo (Larva, pupa y adulto) se corrieron tres geles por separado. Cada gel obtenido fue registrado en un documentador de geles (Gel Doc XR+ System Bio-Rad) para la posterior detección de spots y análisis mediante el software PD Quest 2D Analysis.

2.3.2.4. Identificación de proteínas por espectrometría de masas

Con el fin de identificar las proteínas obtenidas mediante electroforesis bidimensional (2D PAGE), los *spots* de proteínas de interés en cada fase se cortaron de cada gel y se decoloraron con un buffer de lavado (Bicarbonato de amonio 50 mM, acetonitrilo 50% V/v) durante 15 minutos inicialmente y se repitió hasta no observar coloración alguna en cada trozo de gel. La solución de lavado se reemplazó por una solución de 50 μ L de acetonitrilo 100% V/v y se incubó hasta que los trozos de gel tomaron una coloración blanquecina para posteriormente dejarlos secar al aire.

A continuación, se realizó la digestión trípica re-suspendiendo cada muestra en 7 μ L de tripsina (20mg/mL) durante 30 minutos a 4°C y posteriormente durante 12 horas a 37°C. Al finalizar esos tiempos de incubación, se adiciono 7 μ L de acetonitrilo 60% V/v y TFA 1% V/v y se procedió a incubarlos en un baño de ultrasonido durante 15 minutos. Por último, las muestras se concentraron en un horno a 60°C y se re-suspendieron en acetonitrilo 50% V/v y TFA 1% V/v.

Después del tratamiento trípico, una mezcla de 1 μ L de los péptidos con matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico -HCCA (Sigma-Aldrich) fueron sembrados en un *target* para MALDI-TOF en relación 1:1. Como patrones para la espectrometría de masas se empleó una mezcla de los péptidos Bombesin, Bradykinin y Renin-substrate a 1 ppm cada uno. La digestión trípica fue analizada en modo ion positivo con un espectrómetro de masas MALDI-TOF-TOF Ultraflex extreme (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) equipado con láser Nd:YAG 355 nm y operado con el software FlexControl V.33 perteneciente a la Universidad Industrial de Santander y ubicado en el Parque Tecnológico Guatiguará.

2.3.2.5. Análisis del transcriptoma de *Ae. aegypti*

Teniendo en cuenta que la información del transcriptoma del mosquito se encuentra disponible en el repositorio localizado en la página www.Aedes.caltech.edu (Akbari *et al.* 2013), en el presente estudio se tomaron estos datos con el fin de realizar un análisis con énfasis en proteínas mitocondriales.

Inicialmente, se procedió a decodificar la totalidad de los transcritos empleando la base de datos consignada en la página del “*National Center for Biotechnology Information*” (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov/) a proteínas. Posteriormente se empleó la herramienta en línea PredSL (<http://aias.biol.uoa.gr/PredSL/>), que emplea la presencia de un N-terminal en la secuencia target, redes neurales y matrices de puntaje para realizar una predicción de la localización subcelular de cada proteína (Petsalaki *et al.*, 2006). Teniendo como inicio esta predicción, se procedió a separar en una base de datos aquellas proteínas con localización mitocondrial con el fin de realizar la búsqueda de aquellas con expresión diferenciada entre fases de desarrollo del mosquito y realizar la comparación de estas con los resultados obtenidos de la extracción 2D-PAGE e identificación de proteínas por espectrometría de masas.

2.3.2. Componente Bioinformático

2.3.2.1. Análisis de los geles 2D Page

Una vez obtenidas las imágenes por triplicado de cada fase de desarrollo de *Ae. aegypti* (larvas, pupas y adultos), se procedió a analizarlas empleando el Software PD Quest 2D Analysis. Este software permitió la visualización de *spots* diferenciales entre fases de desarrollo, además de su cuantificación (expresión diferencial) empleando el parámetro *foldchange* con el fin de indicar cuantitativamente la expresión de determinada proteína.

De cada triplete de imágenes obtenido por fase de desarrollo se detectaron los *spots* coincidentes, los cuales fueron cuantificados y ajustados manualmente. La cantidad de proteína de cada *spot* fue expresada como su volumen, definida como la suma de la intensidad de píxeles que forman el *spot*. De cada fase se elaboró un *master gel*, el cual fue empleado como guía para el conteo final de *spots* identificados por fase y para la sustracción de *spots* e identificación mediante espectrometría de masas.

Para realizar las comparaciones entre fases (*foldchange*), los *spots* entre geles fueron comparados mediante la sustracción del ruido de la imagen y los volúmenes fueron calculados por densitometría normalizando el volumen total de *spots* presentes en cada imagen tomando como control a la fase de adulto de *Ae. aegypti*. Se confirmó la asignación de *spots* expresados entre todas las fases (larva, pupa y adulto) mediante la comparación numérica de la intensidad de los *spots*. Para cada *spot* identificado se calculó la expresión diferenciada entre fases, los *spots* de proteínas se consideraron sobre-expresados si la tasa de cambio fue $\geq 2,0$ e inhibidos si la tasa de cambio fue menor a $\leq 0,5$.

2.3.2.2. Análisis de espectros de masas

Los espectros de masas obtenidos de la digestión trípica fueron procesados con el programa Flex Analysis (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) y como muestra control se tomó el espectro de un patrón conocido (BSA). Los valores *m/z* de las señales de los péptidos se introdujeron en el software online MASCOT 2.1 (<http://www.matrixscience.com>) para ser comparados con las bases de datos de Swiss-Prot. Los parámetros para la obtención del nombre y score fueron los siguientes: Base de datos SwissProt, Enzima de digestión: tripsina, con un máximo de 1 o 2 escisiones “perdidas” o no realizadas por la proteasa durante el proceso de digestión;

PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Ae. aegypti*

taxonomía: todas las entradas disponibles; modificaciones fijas: carbamidometil (C); modificaciones variables: oxidación; tolerancia peptídica de 0,5, 1 y 1,5 Da, para un total de seis posibles proteínas por espectro analizado. La identificación de cada uno de los péptidos fue consignada en una base de datos en Excel.

Adicionalmente, se consultó la función de cada proteína obtenida empleando la base de datos Uniprot (<https://www.uniprot.org/>). La selección de las proteínas entre las posibles arrojadas por el software MASCOT se realizó acorde a su score y la función de la proteína encontrada. El valor del *score* es una probabilidad de la semejanza del espectro de masas obtenido experimentalmente en comparación a la literatura, a mayor valor de score mayor es la certeza en la identificación de dicha proteína (Koenig *et al.*, 2008). En este caso, fueron consideradas aquellas proteínas con un valor de score ≥ 30 debido a que gran parte de las proteínas mitocondriales del mosquito *Ae. aegypti* no se encuentran caracterizadas. Todos los péptidos y proteínas identificadas fueron registrados en una base de datos en Excel, junto con su función molecular.

2.3.2.3. Interacciones funcionales entre proteínas

Las proteínas identificadas a través de espectrometría de masas MALDI-TOF, fueron seleccionadas para realizar un análisis de posibles interacciones proteína-proteína a través de la herramienta online STRING (<https://string-db.org/>). La lista de proteínas fue introducida en la sección de múltiples proteínas (por nombre) seleccionando como organismo de referencia la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*. Como ajustes avanzados se seleccionó: *full STRING network* (*network type*), confianza media (valor relativo de 0,4) y el rango de error estadístico, en escala media (5%). La modificación del estilo de los interactomas se realizó con el programa gratuito

Cytoscape, en el cual se modificó el tamaño, etiqueta, color y ubicación de los interactores (Szklarczyk *et al.*, 2020).

2.3.2.4. Análisis del transcriptoma de *Ae. aegypti*

Una vez se organizó la base de datos con las lecturas por transcrito (genes) en TPM (*Transcripts Per Kilobase Million*) de las proteínas mitocondriales, se procedió a la búsqueda de proteínas con expresión diferenciada entre fases de desarrollo (*foldchange*). Considerando que los transcritos corresponden a genes a lo largo del desarrollo del mosquito, se realizó el procesamiento inicial de los datos empleando estadística descriptiva. Posteriormente, los datos de expresión fueron transformados a logaritmo en base 2 y posteriormente normalizados en una base de datos en Excel. Los valores obtenidos se emplearon para la elaboración de una gráfica tipo “*Heat map*” en GraphPad Prisma 8.0 con el fin de visualizar los cambios de expresión de cada gen a lo largo del ciclo de vida de *Ae. aegypti*.

Adicionalmente, se realizó una búsqueda de las proteínas identificadas por espectrometría de masas MALDI-TOF en la base de datos del transcriptoma. Se cotejaron las proteínas identificadas derivadas de la identificación proteica con la predicción teórica de cada uno de los genes descritos en el transcriptoma. Con esta información se elaboró una gráfica de cambios en la expresión (“*Heat map*”) en GraphPad Prisma 8.0 para las fases de larva, pupa y adulto de *Ae. aegypti*.

2.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y BIOINFORMÁTICO

Para confirmar la concordancia en la identificación de las proteínas en el programa MASCOT se empleó el *Protein score*, valor que indica la probabilidad de que los péptidos de una

muestra coincidan con los de la base de datos de proteínas, y el *Expectation value*, número de veces que se espera obtener un score igual o superior aleatoriamente. Cuanto menor es este valor, más significativo será el resultado.

Con el programa PDQuest se realizó la comparación cuantitativa de las proteínas mitocondriales identificadas en el master gel mediante el cálculo del *fold change* a lo largo del ciclo de vida del mosquito empleando el valor promedio de la densidad de cada spot y comparándolo estadísticamente mediante la prueba t de Student ($p \leq 0,05$) para todas las réplicas. Las diferencias entre las réplicas fueron normalizadas empleando como control los geles de la fase de adulto. Se consideraron como valores de sobre expresión valores de cambio iguales o superiores a 1,5 y valores de inhibición de la expresión por debajo de 0,5. Los resultados fueron graficados en GrahPad Prisma 8.0.

Se realizaron Análisis de Componentes Principales (ACP) para analizar la expresión del transcriptoma a lo largo del ciclo de vida de *Ae. aegypti*. Este análisis se realizó con el programa *Statistica* V11. Se suministraron dos matrices, la primera con una dimensión de 1235 x 6, correspondiente a transcritos mitocondriales (1235 genes); y la segunda de 13 x 6, correspondiente a proteínas coincidentes entre el análisis 2D y el transcriptoma. Con los datos obtenidos se elaboraron gráficas de cuadrantes con los factores de mayor peso estadístico en la correlación simple de las variables de la expresión génica.

2.5 RESULTADOS

2.5.1 Electroforesis bidimensional de proteínas mitocondriales de larvas E4

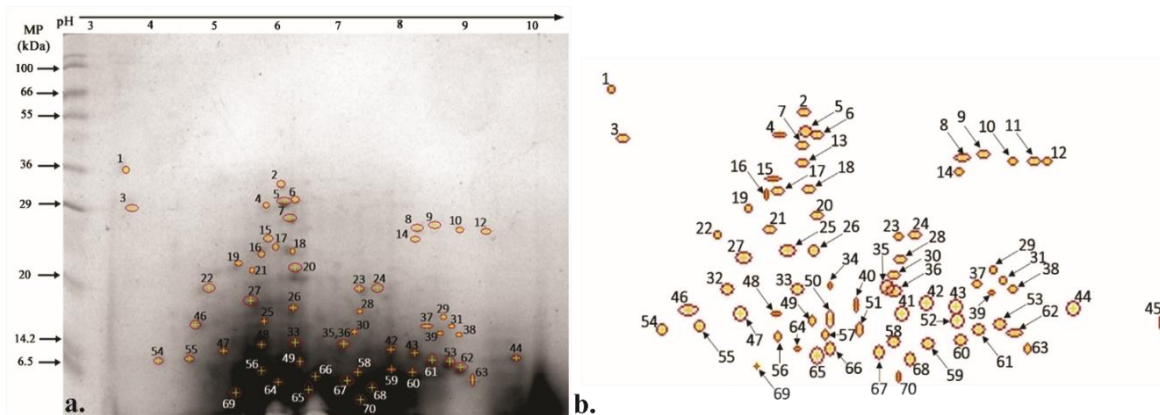
Al comparar los geles 2D de mitocondrias de larvas de *Ae. aegypti* mediante el software PDQuest, se elaboró una imagen “*Master*” o consolidado que representa la ubicación de las

PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Ae. aegypti*

proteínas coincidentes en los geles analizados. La elaboración de este gel *Master* permitió señalar 70 spots con un peso molecular entre 6,5 - 36 kDa y un rango de punto isoeléctrico (pI) entre 3,5 - 9. (Figura 1).

Figura 1

Perfil proteico bidimensional de proteínas de mitocondrias de larvas L4 de Aedes aegypti. a. Ubicación de los spots identificados en uno de los geles 2D. b. Master gel señalando la ubicación de cada spot (Se muestra uno de los geles que componen el triplicado de cada fase de desarrollo y el master gel correspondiente).



Una vez identificadas visualmente las proteínas en el gel, se separaron manualmente y se analizaron por espectrometría de masas, obteniendo huellas peptídicas por cada spot. Los espectros obtenidos de la huella peptídica de cada proteína en los geles de larva fueron analizados, encontrándose un conjunto de señales repetitivas en todos los geles cercana a los 2100 m/z , las cuales fueron excluidas para el proceso de identificación (Anexo 1). Durante el proceso de identificación de las proteínas empleando el software MASCOT fueron seleccionadas aquellas proteínas cuyos valores de *Protein score* fueron superiores a 60. Aunque el programa recomienda emplear valores superiores a 70, se debe considerar que hasta el momento no se encuentran publicados datos proteómicos de mitocondrias de *Ae. aegypti*, disminuyendo el número de

PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Ae. aegypti*

potenciales proteínas a analizar. De esta manera, del total de spots señalados, el 51% (36 spots) fue identificado a nivel de proteína, de las cuales un 69% son mitocondriales (25 spots) (Tabla 1).

Los valores de la masa teórica de las proteínas identificadas se encuentran entre 10000 y 15000 Da. La proteína con menor masa teórica (10486 Da) corresponde a una proteína relacionada con alfa-defensina 2 (*spot 29*), mientras que la Subunidad beta de ARN polimerasa dirigida por ADN (*spot 7*) presentó el valor más alto (144310 Da). La distribución de la masa experimental de las proteínas identificadas se concentró entre 1 y 36 kDa. La proteína identificada con menor masa experimental (1,53 kDa) corresponde a la 50S proteína ribosomal L16 (*spot 70*), mientras que la proteína Sulfato adenililtransferasa (*spot 1*) presentó el valor más alto (35,55 kDa) (Tabla 1). Los bajos valores de la masa experimental pueden estar relacionados con la degradación de la proteína original durante el proceso de tratamiento de la muestra para su identificación. Sin embargo, el fragmento de proteína identificado en la huella peptídica fue suficiente para la identificación de la proteína completa en el programa MASCOT.

Tabla 1

Caracterización de las proteínas mitocondriales de larvas de Ae. aegypti obtenidas de los geles 2D. Spot: Número asignado a cada spot en el gel master; Protein score: Valor que indica la probabilidad de acierto en la identificación de la proteína al ser cotejada con una base de datos; Masa experimental: Masa de cada proteína estimada directamente en la imagen del gel; Masa teórica: Masa de cada proteína calculada en el programa MASCOT.

Spot	Proteína identificada	Protein Score	Masa experimental (KDa)	Masa teórica (Da)
1	Sulfato adenililtransferasa	61	35,55	45907

PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Ae. aegypti*

2	Enolasa	59	32,67	47421
3	Probable E3 ubiquitina- proteína ligasa	57	29,27	50437
5	NAD(P)H-quinona oxidoreductasa subunidad H	55	30,16	45545
7	Subunidad beta de ARN polimerasa dirigida por ADN	77	29,08	144310
8	Proteína adenililtransferasa	53	27,03	56283
10	CTP sintasa	57	26,67	61640
13	Biosíntesis de ubiquinona/menaquinona C- metiltransferasa UbiE	70	26,36	27190
14	Supuesta cisteína ligasa	67	25,45	63105
18	Proteína quinasa C tipo delta	63	78485	34091
20	Timidina quinasa	57	21,15	22669
23	Peroxirredoxina	53	19,48	27080
24	ARNt dimetilaliltransferasa	57	19,62	35296
25	Leucina--tRNA ligasa	66	18,32	95932
27	S-ribosilhomocisteína liasa	59	18,04	17912
28	Proteína de choque térmico de 70 kDa 14	63	17,55	55444
29	Secuencia relacionada con alfadefensina 2	57	16,72	10486

PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Ae. aegypti*

31	Glucoquinasa	62	16	34727
Proteína homóloga MAEA				
37	Proteína tegumentaria homóloga UL46	60	15,74	48325
38	Proteína GrpE	63	15,37	21793
39	ARN helicasa dependiente de ATP	68	15,11	47354
41	Proteína 1 relacionada con el choque térmico 70	62	12,8	68915
42	Subunidad grande de ARN ribosómico metiltransferasa H	59	14,52	16641
44	Transportador de glicina mitocondrial	69	14,09	33829
46	Proteína no caracterizada L862	66	14,03	37324
52	ATP sintasa subunidad beta	56	10,93	17912
53	ATP sintasa subunidad beta	74	9,39	52311
58	Cadena gamma ATP sintasa	56	5,23	33105
59	Homólogo de la proteína chaperona HscA	69	4,83	66854
60	Importación de fosfato Proteína de unión a ATP PstB	67	5,43	28158
61	50S proteína ribosomal L6	61	7,91	19403
62	Glutamato--tRNA ligasa 1	67	7,18	50568

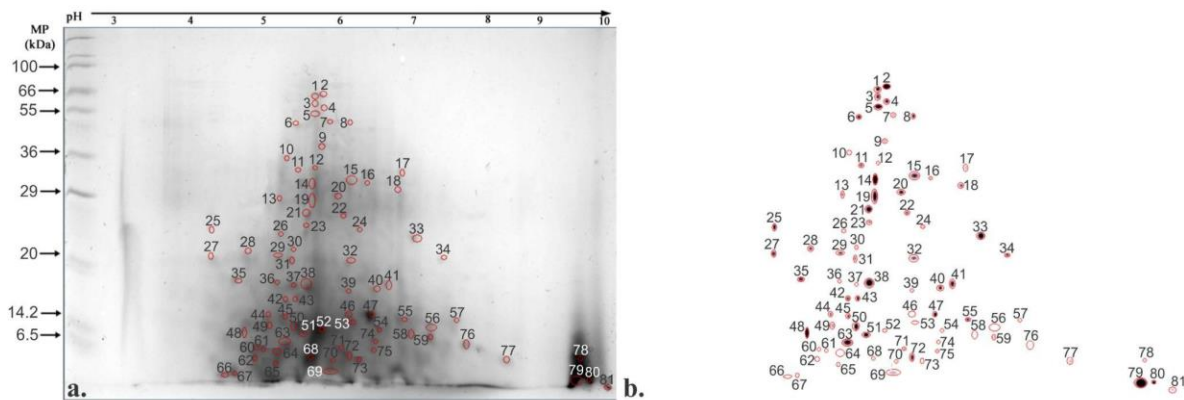
63	50S proteína ribosomal L11	58	4,13	16727
68	Mioglobina	90	2,78	15756
70	50S proteína ribosomal L16	60	1,53	15270

2.5.2 Electroforesis bidimensional de pupas

Al comparar 3 geles 2D de mitocondrias de pupas de *Ae. aegypti* mediante el software PDQuest, la imagen del gel *Master* permitió señalar 81 spots con un peso molecular entre 6,5 - 66 kDa y un rango de pI entre 4 - 10 (Figura 2).

Figura 2

Perfil proteico bidimensional de proteínas de mitocondrias de pupas L4 de Aedes aegypti. a. Ubicación de los spots identificados en uno de los geles 2D. b. Master gel señalando la ubicación de cada spot (Se muestra uno de los geles que componen el triplicado de cada fase de desarrollo y el master gel correspondiente).



Una vez identificadas visualmente las proteínas en el gel, se separaron manualmente y se analizaron por espectrometría de masas, obteniendo huellas peptídicas por cada spot. Los espectros obtenidos de la huella peptídica de cada proteína en los geles de pupa fueron analizados, encontrando nuevamente un conjunto de señales repetitivas en todos los geles cercana a los 2100

PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Ae. aegypti*

m/z, las cuales fueron excluidas para el proceso de identificación (Anexo 2). De igual manera que con los geles de larva, fueron seleccionadas aquellas proteínas cuyos valores de *Protein score* fueron superiores a 45 en el software MASCOT, esto se hizo debido a que hasta el momento no se encuentran publicados datos proteómicos de mitocondrias de pupas *Ae. aegypti*. Del total de spots señalados, el 87,6% (71 spots) fue identificado a nivel de proteína, de las cuales un 26,7% son mitocondriales (19 spots) (Tabla 2).

Los valores de la masa teórica de las proteínas identificadas se encuentran entre 7000 y 77000 Da. La proteína con menor masa teórica (7066 Da) corresponde a una proteína que contiene repetición de pentatricopéptido At2g25580 (*spot* 45), mientras que el factor de elongación G (*spot* 14) presentó el valor más alto (76720 kDa). La distribución de la masa experimental de las proteínas identificadas se concentra entre 0,5 y 99 kDa. La proteína identificada con menor masa experimental (0,93 kDa) corresponde a la Proteína ribosómica L24 39S (*spot* 79), mientras que la proteína ribosómica L2-54S (*spot* 7) presentó el valor más alto (98,21 kDa) (Tabla 2). De manera similar a lo observado para las proteínas de larvas, los bajos valores de la masa experimental pueden estar relacionados con la degradación de la proteína original durante el proceso de identificación.

Tabla 2

Caracterización de las proteínas mitocondriales de pupas de Ae. aegypti obtenidas de los geles 2D. Spot: Número asignado a cada spot en el gel master; Protein score: Valor que indica la probabilidad de acierto en la identificación de la proteína al ser cotejada con una base de datos; Masa experimental: Masa de cada proteína estimada directamente en la imagen del gel; Masa teórica: Masa de cada proteína calculada en el programa MASCOT.

PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Ae. aegypti*

Spot	Proteína identificada	Protein Score	Masa experimental (KDa)	Masa teórica (Da)
7	Proteína ribosómica L2 54S	49	98,21	40996
12	Histidina - tRNA ligasa	55	64,42	54624
14	Factor de elongación G	64	55,66	76720
15	Acil-CoA Delta12-desaturasa	46	57,58	41528
18	ATP sintasa subunidad gamma	49	52,81	33078
Probable proteína de				
19	biosíntesis de polisacáridos	66	48,02	66509
EpsC				
Proteína que contiene				
23	repetición de pentatricopéptido	59	38,26	71991
At2g35030				
27	Lipoil sintasa	58	29,01	36592
29	Proteína ribosómica S12	60	29,19	14782
Cadena épsilon de la ATP				
31	sintasa	64	27,77	13495
38	Dihidrolipoil deshidrogenasa	54	22,44	50848
Proteína que contiene				
45	repetición de pentatricopéptido	64	16,74	7066
At2g25580				

PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Ae. aegypti*

51	Subunidad delta de la ATP sintasa	52	11,02	20052
52	Chaperonina de 10 kDa	58	13,84	10089
58	2-tiouridilasa MnmA específica de ARNt	59	10,95	43283
65	Subunidad E de la ATPsintasa de tipo V	47	2,39	20575
70	2-tiouridilasa MnmA específica de ARNt	66	2,78	41253
76	Factor de elongación G	54	6,49	75710
79	Proteína ribosómica L24 39S	54	0,93	24827

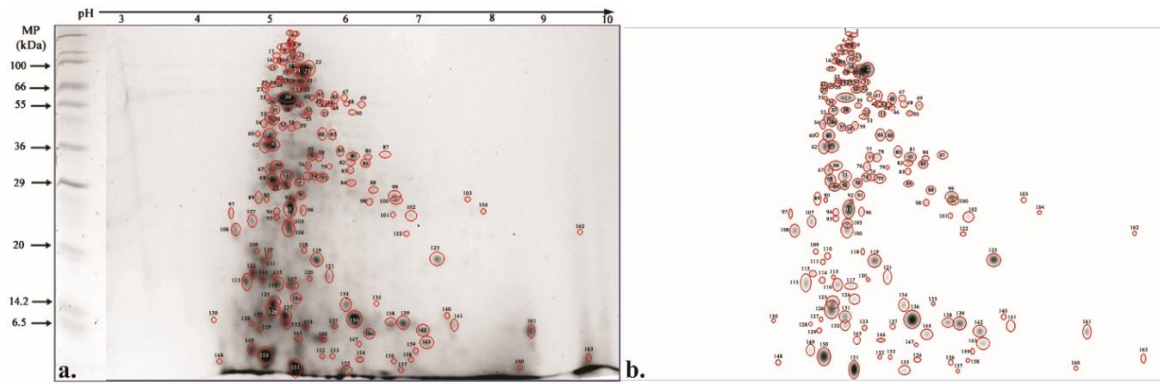
2.5.3 Electroforesis bidimensional de adultos

Al comparar 3 geles 2D de mitocondrias de adulto de *Ae. aegypti* mediante el software PDQuest, la imagen del gel *Master* permitió señalar 163 spots con un peso molecular entre 6,5 - 100 kDa y un rango de pI entre 4 - 10 (Figura 3).

Figura 3

Perfil proteico bidimensional de proteínas de mitocondrias de adulto L4 de Aedes aegypti. a. Ubicación de los spots identificados en uno de los geles 2D. b. Master gel señalando la ubicación de cada spot (Se muestra uno de los geles que componen el triplicado de cada fase de desarrollo y el master gel correspondiente).

PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Ae. aegypti*



Una vez identificadas visualmente las proteínas en el gel, se separaron manualmente y se analizaron por espectrometría de masas, obteniendo huellas peptídicas por cada spot. Los espectros obtenidos de la huella peptídica de cada proteína en los geles de pupa fueron analizados, encontrándose nuevamente un conjunto de señales repetitivas en todos los geles cercana a los 2100 m/z , las cuales fueron excluidas para el proceso de identificación (Anexo 3). Nuevamente, fueron seleccionadas aquellas proteínas cuyos valores de *Protein score* fueron superiores a 30 en el software MASCOT considerando que no se encuentran publicados datos proteómicos de mitocondrias de adultos de *Ae. aegypti*. Del total de spots señalados, el 62,5% (102 spots) fue identificado a nivel de proteína, de las cuales un 27,4% son mitocondriales (28 spots) (Tabla 3).

Los valores de la masa teórica de las proteínas identificadas se encuentran entre 2000 y 14000 Da. La proteína con menor masa teorica (2314 Da) corresponde a una proteína principal de la membrana externa de 39 kDa (Fragmento) (*spot* 138), mientras que la proteína ADN polimerasafactor (*spot* 10) presentó el valor más alto (137010 Da). La distribución de la masa experimental de las proteínas identificadas se concentra entre 4 y 250 kDa. La proteína identificada con menor masa experimental (4,23 kDa) corresponde a la proteína de unión a ATP-ZnuC (*spot* 151), mientras que la proteína Gamma-glutamyl fosfato reductasa (*spot* 8) presentó el valor más alto (210,13 kDa) (Tabla 3). Como se describió para el proceso de identificación de larvas y pupas,

los bajos valores de masa experimental de las proteínas de adultos pueden estar relacionados con la degradación de la proteína original durante el tratamiento de la muestra para su posterior identificación.

Tabla 3

Caracterización de las proteínas mitocondriales de adultos de Ae. aegypti obtenidas de los geles 2D. Spot: Número asignado a cada spot en el gel master; Protein score: Valor que indica la probabilidad de acierto en la identificación de la proteína al ser cotejada con una base de datos; Masa experimental: Masa de cada proteína estimada directamente en la imagen del gel; Masa teórica: Masa de cada proteína calculada en el programa MASCOT.

Spot	Proteína identificada	Protein Score	Masa experimental (KDa)	Masa teórica (Da)
8	Gamma-glutamil fosfato reductasa	53	210,13	45181
9	Holo-[acil-carrier-protein] sintasa mitocondrial	64	209,38	19385
10	ADN polimerasa	51	194,86	137010
13	Subunidad IX del centro de reacción del fotosistema I	35	186,13	5130
15	Factor de elongación Ts	48	178,41	30079
16	Proteína transportadora de acilo	40	176,55	8789
18	Proteína 1 del proceso de fisión mitocondrial	50	167,85	18056

PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Ae. aegypti*

22	Succinato: subunidad beta de CoA ligasa [formadora de ADP]	52	165,44	41028
25	Proteína 1 similar a la endonucleasa III	51	147,62	32237
28	Subunidad XII del centro de reacción del fotosistema I	33	145,21	3900
33	Ensamblaje de grupo de hierro- azufre 2 homólogo, mitocondrial	49	134,53	16694
44	Factor de elongación Ts	47	116,11	29294
57	Proteína adenililtransferasa SelO	51	92,8	54841
72	Aspartato--tRNA (Asp/Asn) ligasa	58	53,56	68131
81	Glutamato--tRNA ligasa 1	64	69,18	54025
89	Proteína reguladora de nitrógeno P-II	61	45,65	12364
91	30S proteína ribosómica S7	53	47,08	18044
97	Hemolisina-3	51	39,3	24504
102	Chaperona molecular dependiente de ATP HSC82	59	38,14	80850
109	Defecto a baja temperatura proteína 1	52	26,85	39504
113	Probable arginina-tRNA ligasa	56	18,7	65989

PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Ae. aegypti*

123	Proteína 4 que contiene el dominio EH	63	24,48	61365
126	N-acetil-gamma-glutamyl-fosfato reductasa	61	12,84	38581
136	Gamma-glutamyl fosfato reductasa	56	10,77	44830
138	Proteína principal de la membrana externa de 39 kDa (Fragmento)	28	10,19	2314
141	Transportador de iones de fluoruro putativo CrcB 1	50	9,53	12798
145	Proteína translocasa proteína independiente de sec TatAd	36	7,34	7426
151	Importación de zinc Proteína de unión a ATP ZnuC	62	4,23	27306

2.5.4 Comparación de electroforesis bidimensional entre fases de desarrollo de *Ae. aegypti*

Con el fin de conocer las proteínas diferencialmente expresadas a lo largo del ciclo de vida del mosquito, se comparó la totalidad de los geles obtenidos para cada una de las fases de desarrollo (larva, pupa y adulto) de *Ae. aegypti*. Se consideraron los valores del *Protein score* (con rangos de concordancia entre 43 y 90) y *Expectation value* donde valores cercanos 0,05 indican un mayor valor de coincidencia (Tabla 4).

Tabla 4

Identificación de proteínas de larvas, pupas y adultos de Ae. aegypti obtenidas de los geles 2D. Protein score: Valor que indica la posibilidad de que los péptidos de una muestra coincidan con los de la base de datos de proteínas; Valor E (Expectation value): Valor que indica el número de veces que se espera obtener un score igual o superior aleatoriamente. Cuanto menor sea este valor, más significativo será el resultado. Valores cercanos a 0,05 indican un mayor valor de coincidencia en el programa MASCOT.

SSP	Proteína	Ubicación celular	Score	Valor E
LARVA				
6104	Mioglobina	Relacionada con mitocondria	90	0,00056
3503	Subunidad beta de ARN polimerasa dirigida por ADN	Mitocondria	77	0,012
9111	Transportador de glicina mitocondrial	Mitocondria	69	0,071
5404	Supuesta cisteína ligasa	No registra	67	0,1
7101	Importación de fosfato Proteína de unión a ATP PstB	Mitocondria	67	0,12
7105	Glutamato--tRNA ligasa 1	Mitocondria	67	0,11
2202	Leucina--tRNA ligasa	Mitocondria	66	0,14
3403	Proteína quinasa C tipo delta	No registra	63	0,3
4502	Sulfato adenililtransferasa	Peroxisomas	61	0,49

PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Ae. aegypti*

7202	50S proteína ribosomal L6	Mitocondria	61	0,42
6103	50S proteína ribosomal L6	Mitocondria	60	0,53
3502	Enolasa	Mitocondria	59	0,69
1304	S-ribosilhomocisteína liasa	Citosol	59	0,73
6204	Subunidad grande de ARN ribosómico metiltransferasa H	Mitocondria	59	0,71
2303	Timidina quinasa	Mitocondria	57	1,2
6102	Cadena gamma ATP sintasa	Mitocondria	56	1,5
3501	NAD(P)H-quinona oxidorreductasa subunidad H	Mitocondria	55	1,8
5202	Peroxiredoxina	Mitocondria	53	3
5502	Proteína adenililtransferasa	Mitocondria	53	4,2
PUPA				
6403	Proteína inhibidora de unión a MAP3K12 1	Nucleo, citoplasma	74	0,024
3205	2-deshidropantoato 2-reductasa	Citoplasma	71	0,049
5101	Subunidad pequeña de ARN ribosómico metiltransferasa H	Citoplasma	70	0,05
2305	50S proteína ribosomal L13	Mitocondria	69	0,078
5103	2-tiouridilasa MnmA específica de ARNt	Mitocondria	66	0,13
2204	Proteína que contiene repetición de pentatricopéptido At2g25580	Membrana interna	64	0,23

PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Ae. aegypti*

2205	Proteína que contiene repetición de pentatricopéptido At2g25580	Membrana interna	64	0,23
4302	Fosfoglucosamina mutasa	Citoplasma	63	0,3
5203	Corismato sintasa	Citoplasma	62	0,36
5102	Corismato sintasa	Citoplasma	62	0,36
7201	Polirribonucleótido nucleotidiltransferasa	Citoplasma	60	0,62
6105	2-tiouridilasa MnmA específica de ARNt	Mitocondria	59	0,73
7104	2-tiouridilasa MnmA específica de ARNt	Mitocondria	59	0,73
4406	GTPasa Obg	Citoplasma	59	0,76
4301	GTPasa Obg	Mitocondria	59	0,76
6205	Homólogo de proteína NifS/IcsS	No registra	59	0,76
3203	Proteína que contiene repetición de pentatricopéptido At2g35030	Mitocondria	59	0,73
4103	Chaperonina de 10 kDa	Mitocondria	58	0,84
2302	Proteína de distribución nuclear PAC1	Núcleo	58	0,94
3705	Proteína ribosómica S12 metiltiottransferasa	Citoplasma	58	0,84
2104	Fenilalanina: subunidad beta de la ligasa del ARNt	Citoplasma	57	1,1

PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Ae. aegypti*

2102	Subunidad delta de la ATP sintasa	Mitocondria	52	3,2
9112	Acetil-coenzima A carboxilasa carboxil transferasa subunidad beta	Citoplasma	50	6,2
ADULTO				
5506	Glutamato--tRNA ligasa 1	Mitocondria	64	0,21
3301	Oxidorreductasa no caracterizada C162.03	Citosol	64	0,2
4403	Proteasa dependiente de ATP ATPasa subunidad HslU	Citosol	63	0,28
7302	Proteína 4 que contiene el dominio EH	Membrana	63	0,28
4104	Importación de zinc Proteína de unión a ATP ZnuC	Membrana interna	62	0,37
3201	N-acetil-gamma-glutamyl-fosfato reductasa	Mitocondria	61	0,46
2403	Proteína reguladora de nitrógeno P-II	Citosol	61	0,41
7307	Chaperona molecular dependiente de ATP HSC82	Mitocondria	59	0,74
2504	S-ribosilhomocisteína liasa	Citosol	58	0,87
5402	Aspartato--tRNA (Asp/Asn) ligasa	Mitocondria	58	0,84
1205	Probable arginina-tRNA ligasa	Mitocondria	56	1,4
6506	Inhibidor de apoptosis U19	Núcleo, citoplasma	56	1,5

PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Ae. aegypti*

6202	Gamma-glutamyl fosfato reductasa	Mitocondria	56	1,3
7308	Proteína ribosomal 50S L7/L12	Ribosoma	56	1,5
4405	30S proteína ribosómica S7	Citosol	53	2,7
3401	Cadena alfa de ATP sintasa tipo V	Mitocondria	53	2,6
3504	Proteína adenililtransferasa	Mitocondria	51	4,4
7203	Transportador de iones de fluoruro putativo CrcB 1	Membrana	50	6,3
2304	Probable factor de transcripción WRKY 65	Núcleo	50	6,3
4501	Ensamblaje de grupo de hierro-azufre 2 homólogo	Mitocondria	49	7,3
2203	Proteína de hierro nitrogenasa	No registra	48	8,9
2505	Péptido de módulo alfa 2 soluble en fenol	No registra	43	29

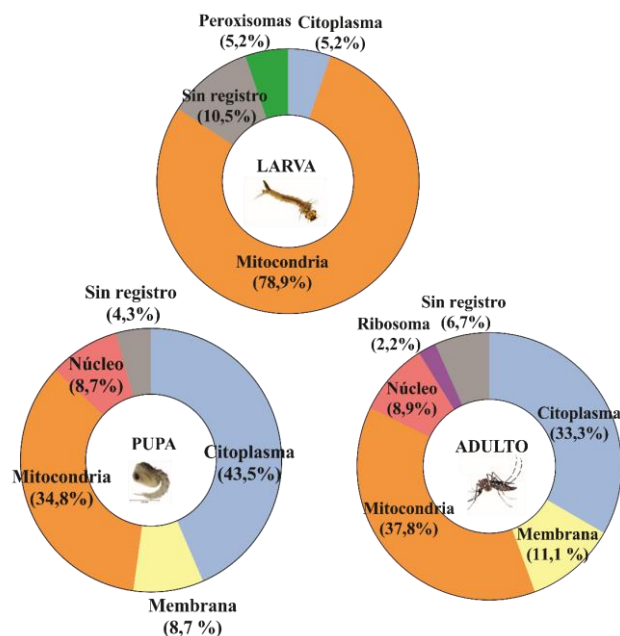
Usando la base de datos UniProt y Gene Ontology (GO), se determinó la asociación de las proteínas a su ubicación celular. Estas bases de datos emplean organismos modelo y la comparación de anotaciones funcionales de productos genéticos para predecir anotaciones biológicas entre diferentes organismos. Sin embargo, considerando que aún no se ha descrito el proteoma mitocondrial de *Ae. aegypti*, la ubicación celular se basa en similitudes a nivel de secuencias, ubicándolas en diferentes lugares de la célula.

PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Ae. aegypti*

De esta manera, para la fase de larva se identificaron 19 proteínas, de las cuales 15 (78,9%) están asociadas a la mitocondria, 2 no cuentan con registro (10,5%), 1 asociada a citoplasma (5,2%) y otra a peroxisomas (5,2%). Para la fase de pupa se identificaron 23 proteínas, 10 asociadas a citoplasma (43,5%), 8 a mitocondria (34,7%), 2 a membranas (8,7%), 2 al núcleo (8,7%) y 1 no cuenta con registro (4,3%). Para adulto se identificaron 45 proteínas, 17 asociadas a mitocondria (37,8%), 15 a citoplasma (33,3%), 5 a membranas (11,1%), 4 a núcleo (8,9%), 3 sin registro (6,6%) y 1 a ribosoma (2,2%) (Figura 4). Vale la pena mencionar que aun cuando se trabajó con extractos proteicos mitocondriales, se identificaron proteínas pertenecientes a otros compartimientos celulares. Esto puede estar relacionado con una posible contaminación de la fracción mitocondrial durante el proceso de aislamiento y a la falta de caracterización de proteínas mitocondriales de *Ae. aegypti*, pues las bases de datos asignan una ubicación celular por homología con otras proteínas caracterizadas previamente.

Figura 4

Asociación de las proteínas identificadas a una ubicación celular para cada una de las fases de desarrollo de Ae. aegypti (larva, pupa y adulto).



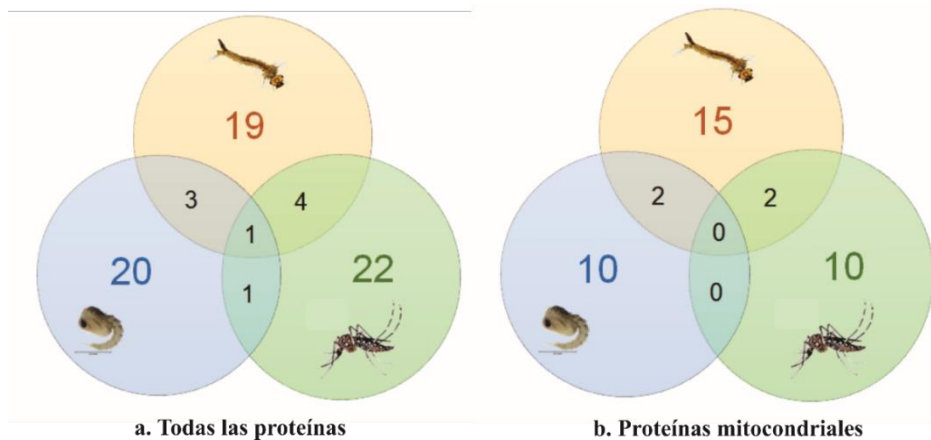
PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Ae. aegypti*

Al comparar todas las proteínas a lo largo de las fases evaluadas, entre larva y pupa se encontraron 3 proteínas coincidentes: ATP Sintasa, 50s Ribosomal y subunidad de ARN ribosomal metiltransferasa H. La proteína 50s Ribosomal fue la única coincidente entre pupa y adulto, mientras que entre adulto y larva coincidieron 4 proteínas: Glutamato tRNA ligasa 1, 50s Ribosomal, adenililtransferasa y S-ribosilhomocisteína liasa (Figura 5a).

Al realizar el mismo análisis únicamente para las proteínas que fueron ubicadas en la mitocondria, entre larva y pupa coinciden las proteínas ATP Sintasa y 50s Ribosomal. Entre adulto y larva coinciden las proteínas Glutamato tRNA ligasa 1 y adenililtransferasa. Entre pupa y adulto no se encontraron proteínas coincidentes (Figura 5b).

Figura 5

Diagramas de Ven mostrando las proteínas coincidentes entre las fases del ciclo de vida del mosquito *Ae. aegypti* (larva, pupa y adulto). a. Para el total de proteínas identificadas. b. Para proteínas ubicadas en la mitocondria.



Se calcularon los valores de expresión normalizada de las proteínas mitocondriales a lo largo del ciclo de vida del mosquito, los cuales se encuentran en la Tabla 5. La dinámica de expresión de las proteínas mitocondriales a lo largo de las fases de desarrollo se muestra en el *Heatmap* de la Figura 6. Se observaron diferentes patrones de expresión de las proteínas

PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Ae. aegypti*

identificadas. Las proteínas que presentaron un aumento progresivo en la expresión de larva a adulto son cinco proteínas con actividad catalítica y que actúan como cofactores: N-acetil-gamma-glutamyl-fosfato reductasa, GTPasa Obg, Transportador de glicina mitocondrial, 2-tiouridilasa MnmA específica de ARNt y Proteína PstB importadora de fosfato de unión a ATP (Figura 6).

Tabla 5

Valores de expresión normalizada de proteínas mitocondriales de larvas, pupas y adultos de Ae. aegypti obtenidas de los geles 2D.

SSP	Proteína	Larva	Pupa	Adulto
2505	Péptido de módulo alfa 2 soluble en fenol	79,7	3,7	1441,0
6105	2-tiouridilasa MnmA específica de ARNt	0	2,0	417,4
4403	Proteasa dependiente de ATP ATPasa subunidad HslU	62,6	0	8339,6
2305	50S proteína ribosomal L13	0	11,8	1288,9
1205	Probable arginina-tRNA ligasa	16,9	11,8	1208,8
7201	Polirribonucleótido nucleotidiltransferasa	0	24,0	2392,5
3501	NAD(P)H-quinona oxidoreductasa subunidad H	16,6	0	4336,0
7203	Transportador de iones de fluoruro putativo CrcB 1	0	1,9	166,3
6102	Cadena gamma ATP sintasa	27,3	8,4	603,5

PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Ae. aegypti*

2203	Proteína de hierro nitrogenasa	0	3,9	215,3
2504	S-ribosilhomocisteína liasa	36,8	0	1974,5
4405	30S proteína ribosómica S7	0	8,8	339,4
3401	Cadena alfa de ATP sintasa tipo V	19,1	0	1605,1
3205	2-deshidropantoato 2-reductasa	0	45,5	1397,8
4104	Importación de zinc Proteína de unión a ATP ZnuC	249,2	220,6	6704,9
3403	Proteína quinasa C tipo delta	14,1	0	1279,4
3502	Enolasa	30,4	0	1224,7
5402	Aspartato--tRNA (Asp/Asn) ligasa	0	16,4	412,3
1304	S-ribosilhomocisteína liasa	88,9	0	999,4
2102	Subunidad delta de la ATP sintasa	91,2	188,3	3942,1
5202	peroxirredoxina	16,1	18,3	334,2
7302	Proteína 4 que contiene el dominio EH	6,7	196,5	3586,6
4302	Fosfoglucosamina mutasa	93,0	83,9	1428,3
5404	Supuesta cisteína ligasa	61,8	0	757,0
3201	N-acetil-gamma-glutamil-fosfato reductasa	0	502,4	6904,9
6403	Proteína inhibidora de unión a MAP3K12 1	0	27,0	343,3
5506	Glutamato--tRNA ligasa 1	65,6	0	528,3
3504	Proteína adenililtransferasa SelO	17,2	0	508,7
4103	Chaperonina de 10 kDa	09,3	12,1	123,8

PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Ae. aegypti*

9111	Transportador de glicina mitocondrial	0,2	198,4	1786,8
6204	Subunidad grande de ARN ribosómico metiltransferasa H	55,2	102,1	855,5
2202	Leucina--tRNA ligasa	3,3	0	380,1
6506	Inhibidor de apoptosis U19	24,0	46,9	332,8
7104	2-tiouridilasa MnmA específica de ARNt	0	145,1	784,1
4406	GTPasa Obg	5,3	34,2	165,4
5203	Corismato sintasa	7,2	27,9	131,8
5101	Subunidad pequeña de ARN ribosómico metiltransferasa H	0	49,8	230,8
4502	Sulfato adenililtransferasa	08,5	0	217,7
3301	Oxidorreductasa no caracterizada C162.03	64,0	0	195,9
6104	Mioglobina	51,9	8,1	31,6
4301	GTPasa Obg	0	197,7	758,0
6205	Homólogo de proteína NifS/IcsS	28,2	238,9	895,5
2204	Proteína que contiene repetición de pentatricopéptido At2g25580	9,8	17,0	63,6
7101	Proteína PstB importadora de fosfato de unión a ATP	67,9	416,7	1519,1
9112	Acetil-coenzima A carboxilasa carboxil transferasa subunidad beta	0	58,4	186,4

PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Ae. aegypti*

7202	50S proteína ribosomal L6	49,2	11,5	34,6
6202	Gamma-glutamil fosfato reductasa	0	2891,4	8275,8
5502	Proteína adenililtransferasa	84,9	0	123,3
2303	Timidina quinasa	03,4	0	111,9
6103	50S proteína ribosomal L16	0,4	24,2	53,7
3503	Subunidad beta de ARN polimerasa dirigida por ADN	91,6	335,0	741,3
5102	Corismato sintasa	0,8	60,6	126,7
2302	Proteína de distribución nuclear PAC1	59,6	0	42,8
2403	Proteína reguladora de nitrógeno P-II	75,1	0	41,2
7308	Proteína ribosomal 50S L7/L12	32,5	0	0
5103	2-tiouridilasa MnmA específica de ARNt	73,6	35,3	24,9
2304	Probable factor de transcripción WRKY 65	95,2	65,7	37,8
7105	Glutamato--tRNA ligasa 1	54,7	0	22,7
3705	Proteína ribosómica S12 metiltiotransferasa	0	695,3	310,3
4501	Ensamblaje de grupo de hierro-azufre 2 homólogo	0	964,3	313,8
2205	Proteína que contiene repetición de pentatricopéptido At2g25580	2,3	121,2	36,8

PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Ae. aegypti*

2104	Fenilalanina: subunidad beta de la ligasa del ARNt	0	1127,3	91,7
3203	Proteína que contiene repetición de pentatricopéptido At2g35030	86,5	889,8	46,3
7307	Chaperona molecular dependiente de ATP HSC82	46,6	2432,9	37,0

Se observó que algunas proteínas mitocondriales aumentaron su expresión en una única fase de desarrollo. Para la fase de larva se encontraron 15 proteínas con sobre expresión: S-ribosil homocisteína liasa, supuesta cisteína ligasa, glutamato -tRNA ligasa 1, adenil transferasa SeIO, chaperonina de 10 kDa, subunidad grande de ARN ribosomal metil transferasa H, Inhibidor de apoptosis U19, oxidorreductasa no caracterizada C162,03, adeniltransferasa, timidida quinasa, proteína de distribución nuclear PACI, proteína reguladora de nitrógeno P II, ribosomal 50S L7/L12, 2-tiouridillasa MnmA específica de ARN y cadena gamma ATP sintasa. Para la fase de pupa se encontraron 8 proteínas con sobre expresión: gamma-glutamil fosfato reductasa, subunidad beta de ARN polimerasa dirigida por ADN, corismato sintasa, ribosómica S12 metil tiotransferasa, ensamblaje de grupo de hierro-azufre 2 homólogo, fenilalanina subunidad beta de la ligasa del ARNt, proteína que contiene la repetición de pentatricopeptido At2g35030 y chaperona molecular dependiente de ATP HSC 82. Por último, para adulto se encontraron 15 proteínas que aumentaron su expresión: proteasa dependiente de ATPasa subunidad AsIU, polirribonucleotido nucleotidiltransferasa, NAD (P)H quinona oxidorreductasa Sub H, cadena gamma ATP sintasa, cadena alfa de ATP sintasa tipo V, 2-deshiro pantoato 2-reductasa, proteína de unión a zinc ATP ZnUC, subunidad delta de la ATPsintasa, proteína 4 que contiene el dominio

PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Ae. aegypti*

EH, acetil-gamma-glutamyl-fosfato reductasa, transportador de glicina mitocondrial, 2-trouridilasa MnmA específica de ARNt, GTPasa Obg, Proteína PstB importadora de fosfato de unión a ATP y gamma glutamil fosforeductasa (Figura 6).

Al comparar la expresión diferencial entre larva y adulto, se observan 7 proteínas con sobre expresión en larvas: péptido de módulo alfa soluble en fenol, probable arginina tRNA ligasa, cadena gamma ATP sintasa, cadena alfa de ATP sintasa tipo V, proteína de unión a zinc ZnuC, quinasa C tipo delta y enolasa. Entre pupa y adulto, se observaron 3 proteínas sobre expresadas en pupa: GTPasa Obg, Proteína PstB importadora de fosfato de unión a ATP y gamma-glutamyl-fosfato reductasa. Entre larva y pupa se encontraron 3 proteínas similares: subunidad delta de ATPsintasa, homólogo de proteína Nifg/IcaS y Proteína PstB importadora de fosfato de unión a ATP (Figura 6).

Considerando que las proteínas en un organismo no actúan de manera independiente, sino que establecen relaciones dinámicas entre ellas para llevar a cabo funciones biológicas complejas, esta interacción proteína-proteína mitocondrial en *Ae. aegypti* fue analizada con el software STRING. En el interactoma generado se identificaron cuatro nodos, donde el grosor de la línea indica una interacción más fuerte entre proteínas. El primer nodo está conformado por subunidades de los complejos I (NADH deshidrogenasa o NADH ubiquinona oxidoreductasa) y V (ATPasa) de la cadena transportadora de electrones en la membrana interna de la mitocondria (Figura 7, nodo de color naranja). Las proteínas agrupadas en este nodo presentaron una mayor expresión en la fase de adulto y larva (Figura 6), posiblemente relacionado con una mayor producción de ATP.

El segundo y tercer nodos están conformados por proteínas con actividad catalítica (tRNA ligasas) y proteínas relacionadas con la transcripción de ADN, respectivamente (Figura 7, nodos de color verde menta y verde oscuro). Este conjunto de proteínas no evidenció una sobreexpresión

PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Ae. aegypti*

en una fase particular del ciclo de vida de *Ae. aegypti* en el presente estudio. Sin embargo, sería interesante conocer en futuros estudios el rol de este conjunto de proteínas (catálisis de productos secundarios y transcripción de información genética) con las fases de desarrollo del zancudo. El último nodo está compuesto por cofactores (Ornitina - oxo-ácido aminotransferasa) y proteínas con actividad glucolítica (Enolasa y Fosfoglicerato quinasa (PGK), Arginasa), sobre expresadas en las fases de larva y adulto (Figura 7, nodo color azul). También se encontraron algunas proteínas con conexiones débiles entre nodos (Peroxirredoxina) o sin ellas (Glutamato cisteína ligasa, Adenosín monofosfato transferasa). La actividad de estas proteínas se relaciona con actividad catalítica y reguladora de procesos en la producción de ATP y remoción de productos tóxicos al interior de la mitocondria (Figura 7).

Figura 6

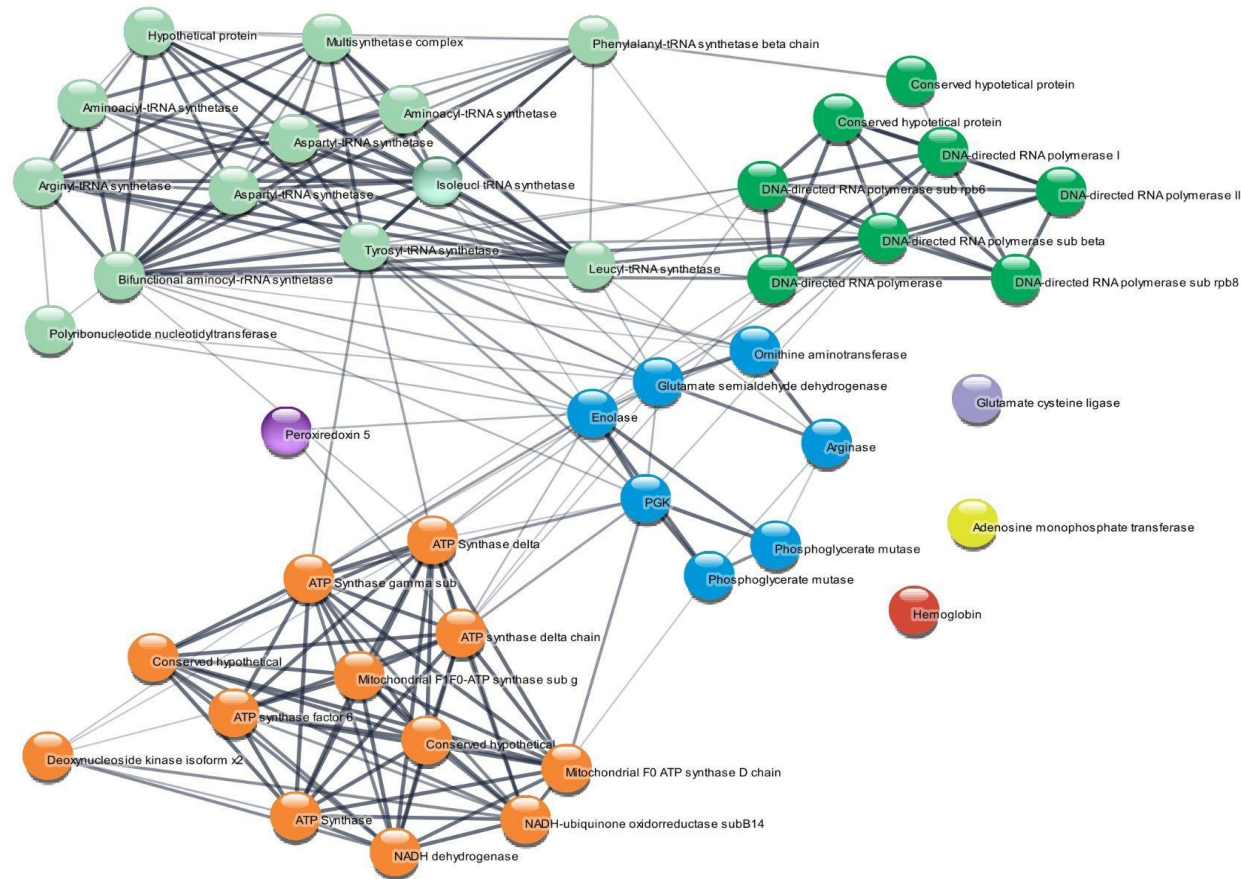
*Heat Map de la expresión diferencial de proteínas mitocondriales de larvas, pupas y adultos de *Ae. aegypti*.*

PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Ae. aegypti*



Figura 7

Interactoma de todas las proteínas mitocondriales identificadas de larvas, pupas y adultos de Ae. aegypti obtenido con el software STRING y empleando como organismo de referencia a Ae. aegypti.



2.5.5 Análisis del transcriptoma de *Ae. aegypti*

Se procesaron 19610 genes correspondientes al transcriptoma de *Ae. aegypti* descrito por Akbari *et al.* (2013) con el fin de seleccionar aquellos con ubicación subcelular mitocondrial. En total, se seleccionaron 1235 genes con expresión para cada una de las fases de vida del mosquito: embrión, larvas L1-L2-L3-L4, Pupas clasificadas por sexo y adultos (desarrollo de ovarios, testículos y cuerpos de machos y hembras).

Considerando que en el presente estudio solo se analizaron las fases de larva (L3-L4), pupa y adulto (hembras), estas mismas fases fueron seleccionados para realizar un análisis de componentes principales. Al analizar los componentes de los datos, se definieron cuatro factores. El Factor 1 representa 93,35% de las variables, seguido del Factor 2 con un 2.602%. En el Factor 1, las fases de larva L4 y pupas hembra son las fases que más contribuyen a representar la expresión génica (Tabla 6).

Tabla 6

*Valores de contribución de las variables (expresión génica) a cada factor calculado en cada fase de desarrollo de *Ae. aegypti*.*

Variable	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4
Larvas L3	-0,969262	0,188995	0,100544	-0,071519
Larvas L4	-0,974550	0,168069	-0,023933	-0,103881
Pupas hembras	-0,965445	-0,108805	-0,212900	-0,036279
Pupas machos	-0,970164	0,080385	-0,123511	0,179634
Machos adultos	-0,956670	-0,262169	0,050169	-0,077949
Hembras adultas	-0,965645	-0,071569	0,210475	0,109648

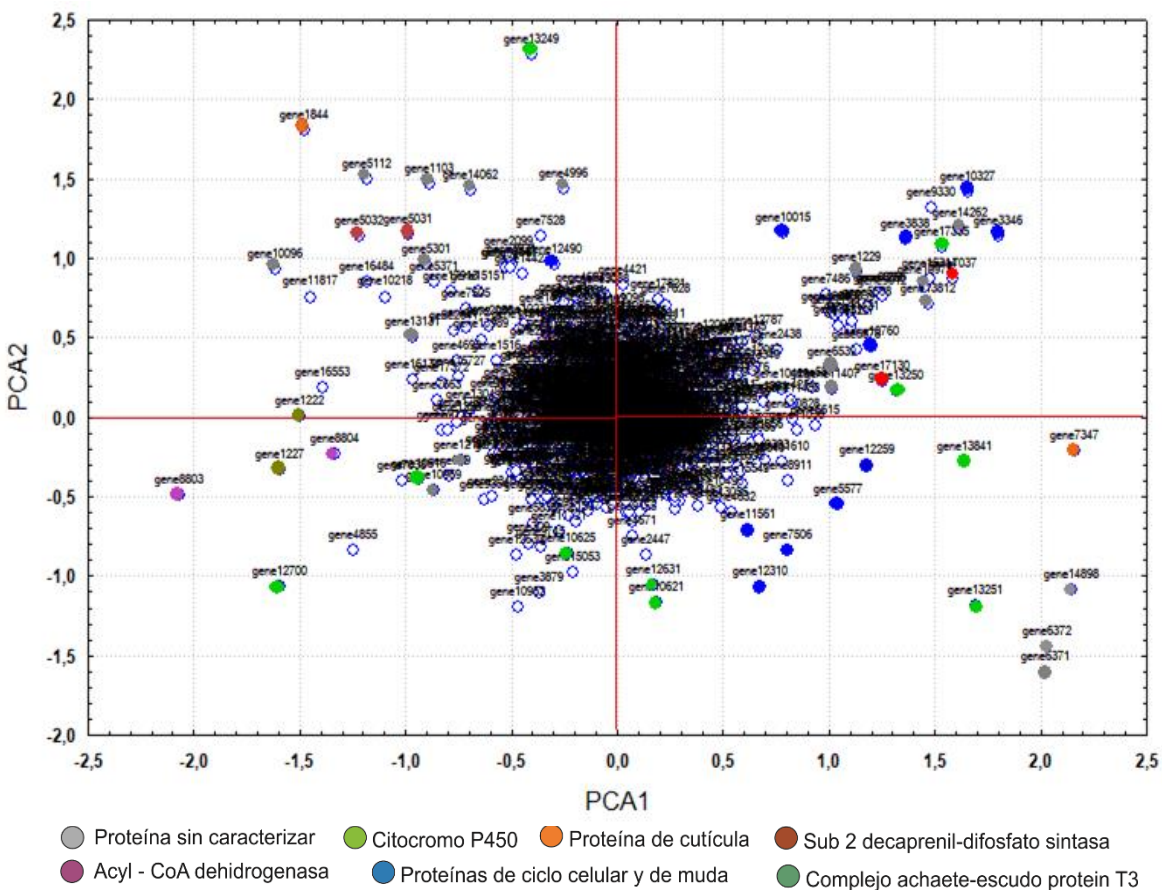
PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Ae. aegypti*

Acorde con la representación de las variables, se seleccionaron los Factores 1 y 2 para elaborar la gráfica de dispersión correspondiente debido a que representan el 96.1% de las variables (expresión génica). La mayoría de los genes se encuentran agrupados en el centro del cuadrante, muy cercanos al valor de cero, indicando que no existe una correlación en su expresión. Sin embargo, en el cuadrante superior derecho de la gráfica se observan algunos genes con una relación positiva, representado principalmente por proteínas relacionadas con el ciclo celular (puntos color azul): Aminopeptidasa citosólica, proteína de fibra densa, protamina, dineína cadena pesada axonemal, Histona H1. También se encuentran dos proteínas Citocromo oxidasa (Puntos color verde claro), dos proteínas relacionadas directamente con la mitocondria, superóxido dismutasa y translocasa de la membrana interna mitocondrial (puntos color rojo) y cinco proteínas sin caracterizar (puntos color gris) (Figura 8).

Con una relación positiva únicamente para el factor 1 (cuadrante inferior derecho), se observan 5 proteínas relacionadas con el ciclo celular (puntos color azul): Criptocromo 1, quitinasa 10, fenol oxidasa 2, proteína G activadora del canal de potasio y una probable 4-coumarate-CoA ligasa 1. También se encuentran dos proteínas Citocromo oxidasa (Puntos color verde claro), 1 proteína de cutícula pupal (punto color naranja) y tres proteínas sin caracterizar (puntos color gris) (Figura 8).

Figura 8

Análisis de componentes principales (ACP) del transcriptoma mitocondrial de Larvas (L3-L4), pupas (machos y hembras) y adultos (machos y hembras) de Ae. aegypti.



Con una relación negativa entre la expresión génica (cuadrante inferior izquierdo), se observaron tres proteínas Citocromo oxidasa (Puntos color verde claro), dos proteínas de cadena larga de Acyl-CoA deshidrogenasa (puntos color púrpura) y dos proteínas sin caracterizar (puntos color gris). Con una relación positiva únicamente para el factor 2 (cuadrante superior izquierdo), se observa una proteína asociada a microtúbulos (punto color azul), una proteína Citocromo oxidasa (Puntos color verde claro), dos proteínas sub2 de decaprenil-difosfato sintasa y 7 proteínas sin caracterizar (puntos color gris) (Figura 8).

PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Ae. aegypti*

Con el fin de facilitar la visualización y análisis de los transcritos al ser comparados, se procedió a identificar en el transcriptoma aquellos genes que expresan proteínas mitocondriales identificadas de larvas, pupas y adultos de *Ae. aegypti* en los geles 2D. Para esta comparación, se seleccionaron únicamente proteínas con un *Score* mayor a 60 y un valor E menor a 0,3. Se encontraron 13 proteínas coincidentes, 6 para larva, 4 para pupa y 4 para adulto (Tabla 7).

Tabla 7

Comparación de la expresión de proteínas obtenidas en los geles 2D con la expresión del transcriptoma mitocondrial de larvas, pupas y adultos de Ae. aegypti.

SSP	Score	Valor E	Gene del transcriptoma	Proteína
LARVA				
3503	77	0,01	gene2953	Subunidad beta de ARN polimerasa dirigida por ADN
			gene8273	
			gene8957	
9111	69	0,07	gene10828	Transportador de glicina mitocondrial
			gene15563	
5404	67	0,1	gene15282	Supuesta cisteína ligasa
			gene11777	
			gene3826	
7105	67	0,11	gene13327	Glutamato--tRNA ligasa 1
2202	66	0,14	gene10557	Leucina--tRNA ligasa
			gene12589	
PUPA				

PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Ae. aegypti*

			gene15589	
3205	71	0,049	gene16400 gene8026 gene15588	2-deshidropantoato 2-reductasa
5101	70	0,05	gene14266	Subunidad pequeña de ARN ribosómico metiltransferasa H
2305	69	0,078	gene4332	50S proteína ribosomal L13
5103	66	0,13	gene16034	2-tiouridilasa MnmA específica de ARNt
ADULTO				
5506	64	0,21	gene15282 gene13327	Glutamato--tRNA ligasa 1
3301	64	0,2	gene6345 gene3815	Oxidorreductasa no caracterizada C162.03
4403	63	0,28	gene11444	Proteasa dependiente de ATP ATPasa subunidad HslU
7302	63	0,28	gene3753	Proteína 4 que contiene el dominio EH

Una vez identificadas estas coincidencias, se procedió a conocer la expresión de estas proteínas a lo largo del ciclo de vida de *Ae. aegypti*. Se calcularon los valores de expresión normalizada de los transcritos a lo largo del ciclo de vida del mosquito para conocer la dinámica de expresión de las proteínas mediante una gráfica tipo *Heat map*.

Se observaron diferentes patrones de expresión génica de las proteínas cotejadas. No se evidencia un patrón de aumento progresivo en la expresión génica desde la fase de larva a adulto

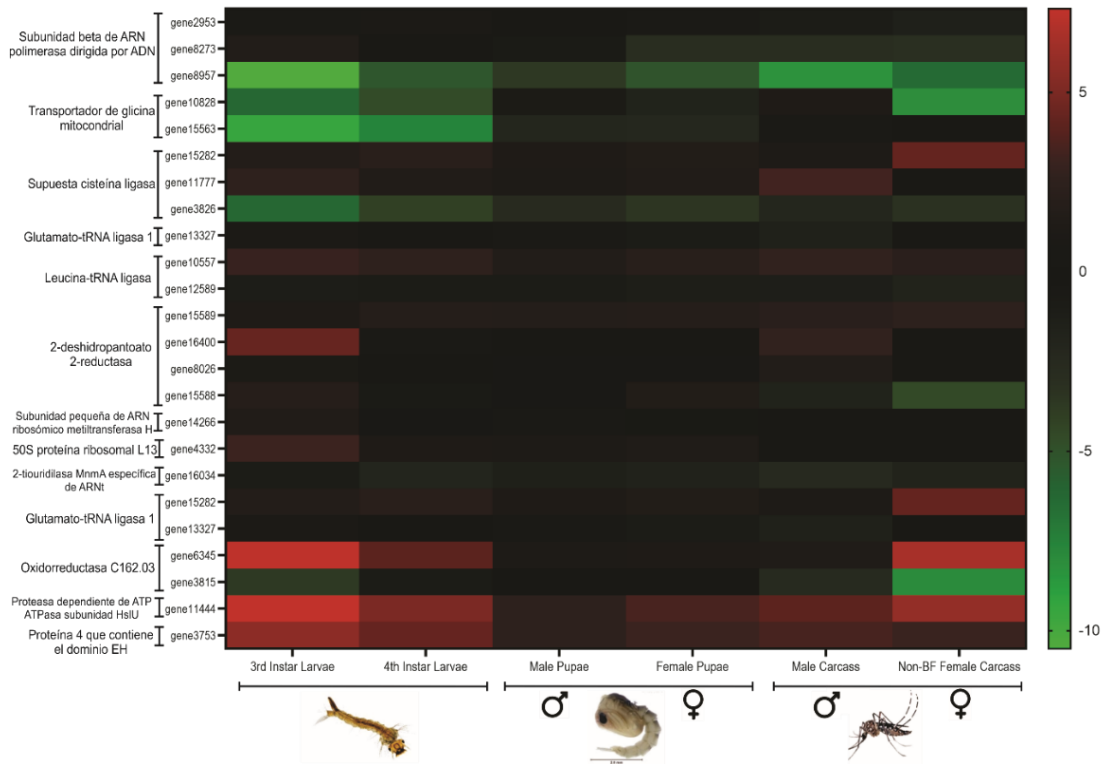
PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Ae. aegypti*

para ninguno de los genes analizados. Las larvas L3 presentaron mayor expresión en genes que codifican para la 2- deshidro pantoato 2-reductasa, oxidorreductasas, proteasa dependiente de ATP y la proteína 4 con dominio EH. En larvas L4 la expresión génica es similar a la expresión de larvas L3, con una disminución en la expresión de la 2- deshidro pantoato 2-reductasa. Para la fase de pupa se observa una marcada disminución en la expresión de las pupas macho en todos los genes al ser comparado con la expresión de las pupas hembra, las cuales mostraron una mayor expresión para la proteasa dependiente de ATP y la proteína 4 con dominio EH. Adicionalmente, se observa una disminución de la expresión de la Sub-beta de la ARN polimerasa, el transportador de glicina mitocondrial y una cisteína ligasa (Figura 9).

Para adultos, las hembras presentaron mayor expresión en genes que codifican para cisteína ligasa, glutamato -tRNA ligasa, oxidorreductasa (gene 6345) y proteasa dependiente de ATP. Adicionalmente, se observó una disminución en la expresión para la Sub-beta de la ARN polimerasa, transportador de glicina, - deshidro pantoato 2-reductasa y oxidorreductasa (gen 3815) (Figura 9).

Figura 9

Heat Map de la expresión génica diferencial de proteínas mitocondriales a lo largo del ciclo de vida de Ae. aegypti: larvas (L3, L4), pupas (hembra y macho), macho adulto y hembra adulta no alimentada con sangre.



Por último, los datos del transcriptoma mitocondrial correspondiente a las proteínas obtenidas en los geles 2D de Larvas (L3-L4), pupas (machos y hembras) y adultos (machos y hembras) de *Ae. aegypti* fueron empleados para realizar un ACP. Al analizar los componentes de los datos, el Factor 1 representa 80,43% de las variables, seguido del Factor 2 con un 8,34%. En el Factor 1, las fases de larva L4 y pupas (hembras y machos) son las fases que más contribuyen a representar la expresión génica, mientras que en el Factor 2, las larvas L4 y los machos adultos son que más contribuyen a representar la expresión génica (Tabla 8).

Tabla 8

Valores de contribución de las variables (expresión génica) a cada factor calculado del transcriptoma mitocondrial correspondiente a las proteínas obtenidas en los geles 2D de Larvas (L3-L4), pupas (machos y hembras) y adultos (machos y hembras) de Ae. aegypti.

Variable	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4	Factor 5	Factor 6
Larvas L3	-0,914681	-0,303195	0,008668	-0,240237	0,113374	0,028097
Larvas L4	-0,930538	-0,327842	0,045991	-0,021010	0,140351	-0,066066
Pupas hembras	-0,960554	0,029899	0,214139	0,125060	-0,056114	0,108617
Pupas machos	-0,940600	0,100017	0,220286	0,200613	0,110595	-0,065304
Machos adultos	-0,818200	0,538136	0,006055	-0,197494	-0,039572	-0,018772
Hembras adultas	-0,804009	0,024001	-0,582795	0,114497	0,011384	0,010235

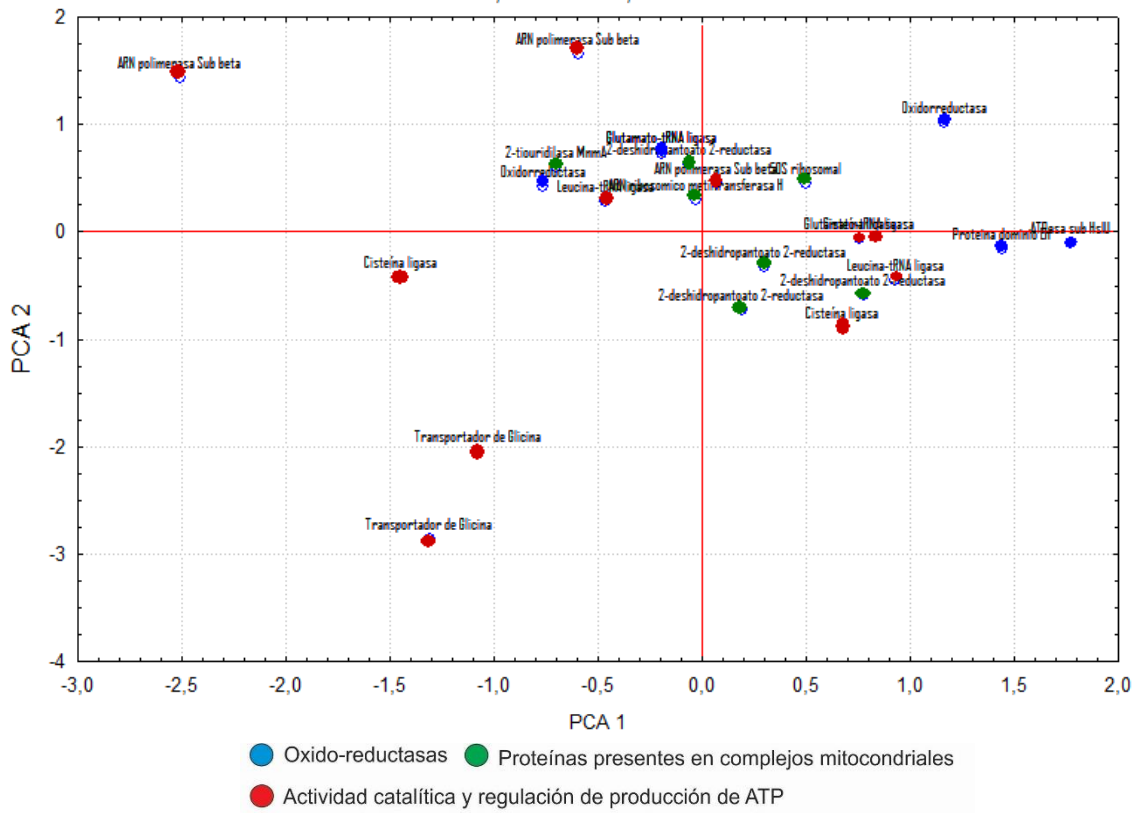
Se seleccionaron los Factores 1 y 2 para elaborar la gráfica de dispersión correspondiente debido a que representan el 88,7% de las variables (expresión génica). Se obtuvieron pocos genes con una relación positiva (cuadrante superior derecho), representados por Oxidorreductasas, proteína 50S ribosomal y Sub-beta de la ARN polimerasa. Con una relación positiva únicamente para el factor 1 (cuadrante inferior derecho), se observa un mayor número de proteínas, proteasa dependiente de ATP, proteína 4 con dominio EH, Glutamato--tRNA ligasa 1, Leucina--tRNA ligasa, 2- deshidro pantoato 2-reductasa y cisteína ligasa (Figura 10).

Con una relación positiva únicamente para el factor 2 (cuadrante superior derecho), se encontró la Sub-beta de ARN polimerasa, glutamato tRNA ligasa, Leucina--tRNA ligasa, 2-tiouridilasa MnmA específica de ARNt y una oxidorreductasa. Con una relación negativa entre la

expresión génica (cuadrante inferior izquierdo), se observaron tres proteínas correspondientes a dos cisteínas ligasa y transportadores de glicina (Figura 10).

Figura 10

Análisis de componentes principales (ACP) del transcriptoma mitocondrial correspondiente a las proteínas obtenidas en los geles 2D de Larvas (L3-L4), pupas (machos y hembras) y adultos (machos y hembras) de Ae. aegypti.



2.6 DISCUSIÓN

Como resultado de los perfiles proteicos de las fases de larva, pupa y adulto de *Ae. aegypti*, se visualizaron 314 spots, correspondientes a 209 proteínas, 72 de ellas mitocondriales. La discordancia observada entre los valores de la masa teórica y la masa experimental (posición de cada spot en el gel) de las proteínas puede estar relacionado con que gran parte de ellas no se han

PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Ae. aegypti*

caracterizado en *Ae. aegypti*, dando lugar a la identificación de diferentes spots como pertenecientes a una misma proteína, indicando la posible presencia de subunidades o modificaciones postraduccionales. En relación con la ubicación celular de las 209 proteínas, una gran proporción de ellas se ubican en la mitocondria y en el citoplasma (Figura 4).

Al analizar la función de las proteínas mitocondriales identificadas, 35 de ellas se encuentran moduladas en las 3 fases de desarrollo del mosquito, con actividad catalítica (34,3%), de transporte (22,9%), función estructural (17,1%), implicadas en la síntesis de ATP (8,6%), biosíntesis (5,7%), actividad transferasa (5,7%), peroxidasa (2,9%) y reguladora (2,9%).

Entre las proteínas identificadas, se destaca la proteína constitutiva 50S ribosomal, la cual se encontró en todas las fases del ciclo de vida del mosquito. Esta proteína hace parte de la conformación estructural del ribosoma, compuesto por 2/3 de ARN y 1/3 por proteínas. (Maguire & Zimmermann, 2001). La principal característica de estas proteínas ribosomales consiste en que su nombre va acorde a la subunidad del ribosoma a la cual pertenecen, bien sea la subunidad grande o pequeña (Ramakrishnan & Moore, 2001). En el proteoma del mosquito *Ae. aegypti*, se identificaron 3 proteínas pertenecientes a la subunidad grande: L6, L13 y L16. Estas proteínas se caracterizan por ser globulares, poseer dominios expuestos y largas proyecciones que se extienden hasta el ARNr para estabilizar la estructura terciaria mediante interacciones de Van der Waal's y desempeñar algunas funciones en el proceso de síntesis proteica (Chandra Sanyal & Liljas, 2000; Maguire & Zimmermann, 2001), funciones fisiológicamente importantes durante cada una de las fases de desarrollo del mosquito.

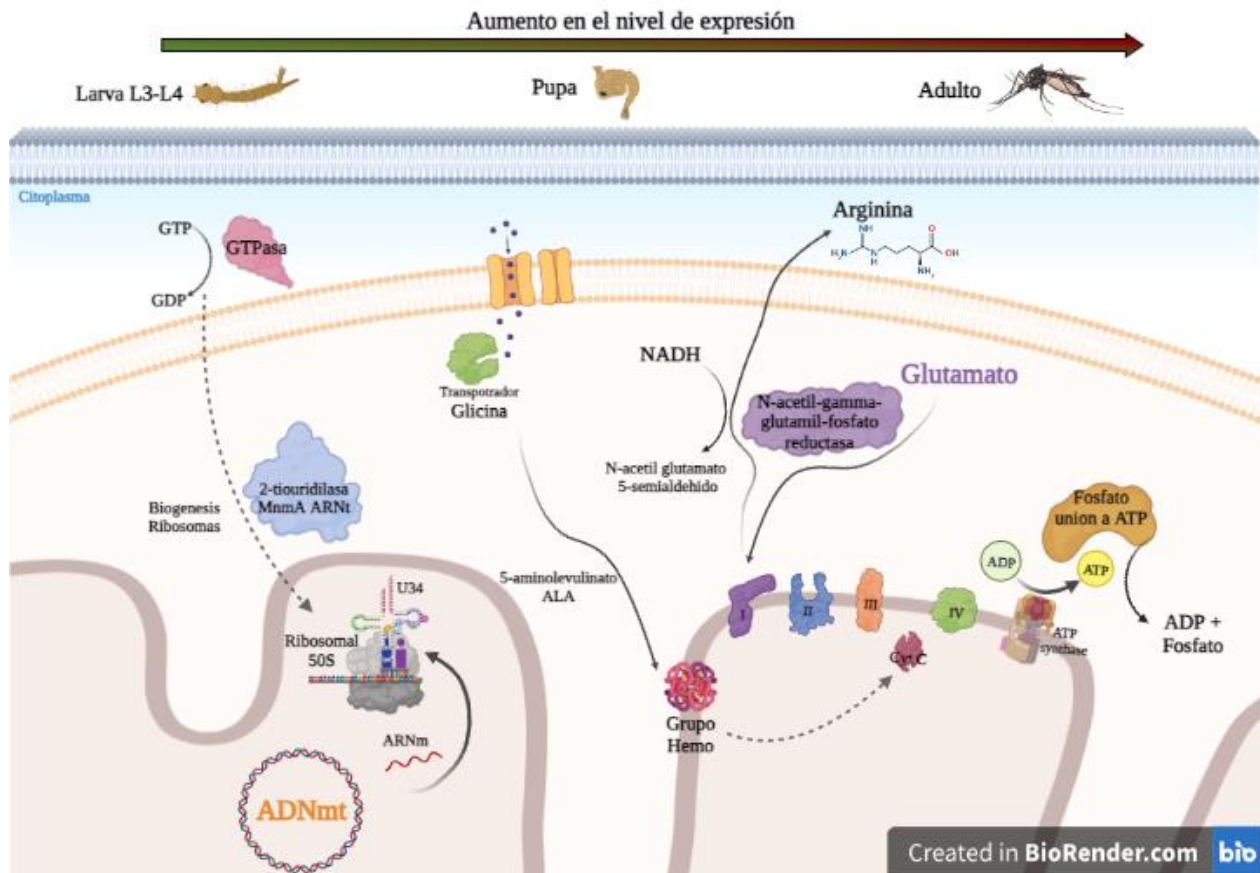
En relación con los patrones de modulación de la expresión, se observó un aumento progresivo en la actividad de cinco proteínas específicas a lo largo del ciclo de vida de *Ae. aegypti*, cuya función se encuentra relacionada con funciones de síntesis en las fases juveniles y regulación de diferentes procesos celulares. La proteína transportadora de glicina (*Spot 9111*), además de

PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Ae. aegypti*

transportar glicina a la matriz mitocondrial, desempeña un papel importante en el suministro de glicina para la producción de 5-aminolevulinato (ALA), producto intermedio en la biosíntesis del grupo Hemo. El grupo Hemo está involucrado en diferentes funciones biológicas, entre las que se encuentra el mediar como cofactor metálico en varias enzimas, específicamente aquellas involucradas en la transferencia de electrones (citocromos) en la cadena respiratoria mitocondrial (Lunetti *et al.*, 2016; Villavicencio-Queijeiro, 2012). La N-acetil-gamma-glutamil-fosfato reductasa (*Spot* 3201) actúa como catalizador en la biosíntesis de la arginina a partir de glutamato y la reducción de NADP en N-acetilglutamato 5-semialdehído (Gessert *et al.*, 1994; Ludovice *et al.*, 1992). La proteína 2-tiouridilasa MnmA específica de ARNt (*Spot* 6105) se encuentra reportada en la base de datos UNIPROT para el organismo *Drosophila melanogaster* (Meigen, 1830) con una función relacionada a la modificación en la U34 del ARNt mitocondrial, catalizando la tiolación de la uridina en la posición 2 del ARNt(Lys), ARNt(Glu), ARNt(Gln) (Johansson *et al.*, 2008; Schaffrath & Leidel, 2017). La GTPasa Obg (*Spot* 4301) pertenece a la familia de hidrolasas, posee un rol importante en el control del ciclo celular, la respuesta al estrés y la biogénesis de los ribosomas además de hidrolizar el GTP a GDP (Bonventre *et al.*, 2016). Por último, la proteína fosfato de unión a ATP (*Spot* 7101) hace parte de una superfamilia que usa la hidrólisis de ATP para energizar diferentes sistemas biológicos. Una vez se ha producido ATP, esta molécula es hidrolizada en ADP y fosfato para cumplir diferentes funciones, bien sea fijándose a receptores específicos, actuando como molécula de señalización en la comunicación intercelular o regulando canales iónicos con diferentes consecuencias fisiológicas (Domínguez-Ramírez & Gómez-Puyou, 2005) (Figura 11).

Figura 11

Resumen grafico de las proteínas que presentaron un aumento progresivo a lo largo del ciclo de vida de *Ae. aegypti* (Imagen creada con BioRender.com).



En fase de larva se observó un aumento en la expresión de 15 proteínas, las cuales se pueden dividir en dos grupos, el primero incluye proteínas involucradas en procesos de activación metabólica y biosíntesis de proteínas, y el segundo grupo incluye proteínas involucradas en la protección frente a daño oxidativo. Entre el primer grupo se encontró la S-ribosil homocisteína liasa (*Spot 2504*) la cual posee una función metabólica importante al activar el ciclo de metilo activado (AMC), importante para el reciclaje de metionina y procesos de metilación de ADN y proteínas (metilación intracelular) (Doherty *et al.*, 2006; Yao *et al.*, 2019). La cisteína ligasa (Glutamato cisteína ligasa) (*Spot 5404*) que participa en la síntesis del glutatión (GSH) al emplear

PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Ae. aegypti*

lo aminoácidos glutamato y cisteína como sustratos para formar el dipéptido γ -L-glutamilcisteína que en una segunda reacción se combina con glicina para formar GSH. El GSH participa en la homeostasis celular, especialmente en la defensa contra el daño oxidativo (Denzoin Vulcano *et al.*, 2013). La Glutamato-tRNA ligasa 1 (*Spot* 7105) hace parte de las proteínas aminoacil-ARNt sintetasas, que participan en la biosíntesis de 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 glutamato (Francklyn *et al.*, 2002; Popow *et al.*, 2012). La adeniltransferasa SeIO (*Spot* 5506) pertenece a la familia de nucleotidiltransferasas, cuya función es transferir grupos de nucleótidos que contienen fósforo. El nombre de la proteína describe el sustrato al cual transfiere el nucleótido fosfato. En este caso, cataliza la transferencia reversible de adenosina 5' monofosfato a residuos de tirosina, serina o treonina de una proteína diana (Garavaglia *et al.*, 2002). La función de la subunidad grande de ARN ribosomal metil transferasa H hace parte de un grupo de enzimas que catalizan la transferencia de un grupo metilo S-adenosil-I-metionina a sus sustratos en la subunidad grande del ribosoma, contribuyendo al control de la transcripción genética (Cai *et al.*, 2016). La timidina quinasa (*Spot* 2303) fosforila la desoxitimidina, la desoxiguanosina y la desoxiuridina, esencial para mantener las reservas de dNTP para la síntesis y reparación del ADN y la fosforilación de los cuatro desoxirribonucleósidos necesarios para la síntesis de ADN (Eriksson *et al.*, 2002). La proteína 50S proteína ribosomal L6 (*Spot* 7308) hace parte de un conjunto de proteínas con función estructural de la subunidad grande ribosomal (Chandra Sanyal & Liljas, 2000; Maguire & Zimmermann, 2001). La cadena gamma ATP sintasa (*Spot* 6102), hace parte del complejo ATP sintasa, compuesto por subunidades polipeptídicas denominadas F1, Fo y el tallo (Xu *et al.*, 2015). La subunidad identificada en este estudio hace parte del eje central del complejo (Sánchez-Vásquez & González-Halphen, 2017).

En el segundo grupo se tiene la Chaperonina de 10 kDa (*Spot* 4103) cuya función está relacionada con la prevención del daño proteico bajo condiciones ambientales de estrés (Gupta, 1995). La oxidorreductasa C162.03 (*Spot* 3301) hace parte de las enzimas que catalizan las reacciones de oxidación-reducción que actúan sobre el NADH o NADPH, contribuyendo al mantenimiento del estado redox intracelular (Cross *et al.*, 1999; Gaikwad *et al.*, 2001). También se identificó la proteína inhibidora de apoptosis U19 (*Spot* 6506), miembro de la familia de Inhibidores de apoptosis (IAPs) mediados por la activación de cisteína proteasas, las cuales son responsables de cambios morfológicos y bioquímicos. En *Drosophila* spp., estas proteínas mencionadas anteriormente juegan un importante papel en la respuesta adaptativa al estrés celular ocasionado por condiciones como hipoxia, anoxia, o estrés genotóxico (Berthelet & Dubrez, 2013). Considerando que las larvas de *Ae. aegypti* pueden estar sometidas a cambios ambientales rápidos, la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial puede incrementar para suplir las necesidades energéticas celulares. Sin embargo, las mitocondrias también 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 (Picard & McEwen, 2018). De manera que con el fin de contrarrestar el potencial daño ocasionado por el aumento en el estrés oxidativo debido a cambios ambientales, la larva de *Ae. aegypti* utiliza diferentes mecanismos como el uso de chaperonas, proteínas inhibidoras de apoptosis y oxidorreductasas que contribuyen al balance redox intracelular.

Para la fase de pupa, se encontraron 8 proteínas sobre expresadas, cuya función está relacionada con procesos de biosíntesis y degradación. La fase de pupa se caracteriza por la reorganización de tejidos para la formación de órganos en el adulto. Debido a que durante esta fase la pupa no se alimenta, ocurre una disminución en la producción de biomasa, pues los lípidos almacenados son metabolizados para proveer energía durante la división celular, la diferenciación

PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Ae. aegypti*

y la eclosión (Jacos *et al.* 2020). Las proteínas sobre-expresadas fueron la gamma-glutamil fosfato reductasa (*Spot* 6202) que cataliza el segundo paso en la biosíntesis de la prolina a partir de glutamato y la reducción dependiente de NADP de L-glutamato 5 fosfato a L-glutamato 5 - semialdehído y fosfato (Hu *et al.*, 1992; Pearson *et al.*, 1996). La subunidad beta de ARN polimerasa dirigida por ADN (*Spot* 3503), la cual hace parte del complejo central de la ARN polimerasa, encargada de polimerizar ribonucleótidos en una secuencia complementaria a la plantilla de ADN (Zhang *et al.*, 1999). La proteína ribosómica S12 metil tiotransferasa (*Spot* 3705), la cual hace parte de la familia de las metiltiotransferasas, encargadas de realizar la metilación de diferentes compuestos (Arragain *et al.*, 2010). La proteína ensamblaje del grupo hierro-azufre 2 homólogo (*Spot* 4501), involucrada en la maduración de las proteínas mitocondriales 4Fe-4S en la vía de ensamblaje de grupos de hierro-azufre y encargadas de los procesos de oxidoreducción en el transporte de electrones en los complejos I y III (Banci *et al.*, 2014). La Proteína de repetición de pentatricopéptido At2g35030 (*Spot* 3203), que al igual que la At2g25580 se relaciona con la unión de iones de Zn a organelas celulares membranosas, facilitando el anclaje de cationes divalentes (Lurin *et al.*, 2004). La Chaperona molecular dependiente de ATP (*Spot* 7307) que promueve la maduración el mantenimiento estructural y la regulación adecuada de proteínas diana específicas involucradas en el control del ciclo celular y la transducción de señales, todas ellas dependientes de ATP (Borkovich *et al.*, 1989). Vale la pena mencionar que para *Ae. aegypti* la única chaperona que se ha descrito es la Hsp90 (Quel *et al.*, 2020).

En fase de adulto, se sobre expresaron 15 proteínas involucradas en procesos de biosíntesis de proteínas, control del daño oxidativo y componentes de complejos proteicos. Cabe resaltar que se lograron identificar algunas subunidades de la ATP sintasa, como la cadena alfa, delta y gamma (*Spots* 6102, 3401 y 2102). La ATP sintasa es un complejo de varias proteínas presentes en la membrana interna mitocondrial. Su estructura se compone de subunidades polipépticas

denominadas F1, Fo y el tallo. La subunidad F1 sobresale hacia la matriz mitocondrial y tiene una función catalítica sobre la síntesis de ATP, mientras que la Fo atraviesa la membrana interna mitocondrial, por donde se canalizan los protones desde el espacio intermembrana y el tallo que une las subunidades F1 y Fo (Xu *et al.*, 2015). Fue precisamente de esta subunidad donde fue identificada la ATPasa de este estudio. En el caso de los adultos, la sobre-expresión de un constituyente de la ATP sintasa, podría atribuirse al tejido del cual se extrajo el extracto mitocondrial, que fue el tórax, donde el individuo posee el músculo de vuelo, un tipo de tejido con la mayor demanda energética, y se ha reportado en literatura que allí se encuentra la mayor cantidad de mitocondrias de mayor tamaño. Con lo anterior mencionado, se justifica encontrar en mayor proporción la expresión de esta proteína (Correa *et al.*, 2015).

La polirribonucleotido nucleotidiltransferasa (*Spot 7201*), también conocida como polinucleótido fosforilasa (PNPasa) procesa ARN monocatenario y está involucrada en la unión flexible del sustrato de ARN y en la formación de la estructura del canal trímero, que contribuye a la maduración del extremo 3' de mRNAs, rRNAs y tRNAs mitocondriales (Perrin *et al.*, 2004; Symmons *et al.*, 2000). La 2-deshidro pantoato 2-reductasa actúa en la ruta alternativa biosintética de pirimidina, o APB, utilizada para sintetizar el resto de pirimidina de la tiamina en la biosíntesis de purina (Frodyma & Downs, 1998; White *et al.*, 2001). La 2-tiouridilasa MnmA específica de ARNt (*Spot 7104*), cuya función ya ha sido descrita previamente. La Gamma-glutamil fosfato reductasa (*Spot 6202*), cuya expresión incrementó desde la fase de pupa y alcanzó su máximo nivel de expresión en la etapa adulta, está implicada en la biosíntesis de la prolina, un aminoácido no esencial, a partir del glutamato. Específicamente cataliza la reducción dependiente de NADPH de L-glutamato 5-fosfato en L-glutamato 5-semialdehído y fosfato. El producto se cicla espontáneamente para formar 1-pirrolina-5-carboxilato (Arentson *et al.*, 2012). La identificación de una proteína involucrada en la síntesis de la prolina, puede relacionarse con los reportes previos

PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Ae. aegypti*

en literatura de los altos niveles de este aminoácido en la hemolinfa de insectos vectores que se alimentan de sangre. Además, se ha demostrado que hembras de *Ae. aegypti*, han adaptado su metabolismo para oxidar eficientemente la prolina a través de la prolina deshidrogenasa ubicada en la membrana interna mitocondrial, la cual cede los electrones directamente a la ubiquinona (Correa *et al.* 2015).

La proteína GTPasa Obg (*Spot* 4301) es una proteína codificada por el gen Obg en el organismo *Bacillus subtilis*. Esta proteína pertenece a la familia de hidrolasas (hidroliza el GTP a GDP) y tiene un rol importante en el control del ciclo celular, la respuesta al estrés y la biogénesis de los ribosomas. Aun cuando se relaciona la proteína en una bacteria, existen reportes en la literatura de esta proteína GTPasa involucrada en la ruta de la biogénesis de ribosomas (Bonventre *et al.* 2016). La proteína transportadora de glicina mitocondrial (*Spot* 9111) tiene como principal función importar glicina a la matriz mitocondrial. Además, desempeña un papel importante en el suministro de glicina para el primer paso enzimático en la biosíntesis del hemo y la condensación de glicina con succinil-CoA para producir 5-aminolevulinato (ALA) en la matriz mitocondrial. Esta proteína únicamente se ha descrito en levaduras y humanos hasta el momento (Lunetti *et al.* 2016).

La NAD (P)H quinona oxidoreductasa Sub H (*Spot* 3501) hace parte de las enzimas que catalizan las reacciones de oxidación-reducción que actúan sobre el NADH o NADPH, contribuyendo al mantenimiento del estado redox intracelular (Cross *et al.* 1999; Gaikwad *et al.* 2001). La proteasa dependiente de ATPasa subunidad AsiU (*Spot* 4403) tiene funciones de chaperona al hidrolizar la parte N-terminal de sustratos proteicos. Junto con las HsIV y HsIU conforman el complejo HsIVU, encargado de degradar proteínas innecesarias o dañadas cuando se encuentra unido a ATP en respuesta a estrés celular (Ramachandran *et al.*, 2002).

La función de la proteína de unión a zinc ATP ZnUC (*Spot* 4104), se ha descrito en literatura como involucrada en el transporte del Zn. La regulación de los niveles del Zn es importante en la célula porque es un elemento clave para la actividad catalítica de algunas enzimas y también sirve como cofactor de proteínas (Navarro & Schneuwly, 2017). Por ejemplo, hay reportes de la importancia de la unión del Zn y la formación de enlaces disulfuro para la actividad de la chaperona Hsp33 y la biogénesis de pequeñas proteínas mitocondriales conocidas como “pequeñas tim”, estas se ubican en el espacio intermembrana de la mitocondria y están involucradas en la importación de proteínas de membrana mitocondrial (Morgan *et al.*, 2009). Aunque la ubicación de esta proteína está principalmente en la membrana celular para realizar la importación de Zn del espacio extracelular, también hay reportes de importadores intracelulares de Zn, en las organelas membranosas (Navarro & Schneuwly, 2017). Previamente se ha descrito la adaptación de los transportadores de Zn para transportar hierro en *Ae. aegypti*. Esto ocurre porque las hembras ingieren sangre, la cual es alta en niveles de hierro. Por lo tanto, el insecto requiere de transportadores para regular los niveles del metal a nivel celular, que es importante como nutriente esencial y cofactor de procesos biológicos. Por el contrario, la presencia de niveles altos de hierro puede catalizar procesos de formación de radicales de oxígeno (Tsujiimoto *et al.*, 2018). De esta manera, este reporte sustenta el hallazgo de la sobreexpresión del transportador de Zn en la muestra de tórax de hembras adultas con respecto a sus etapas juveniles.

Sumado al análisis de la expresión para cada fase del desarrollo de *Ae. aegypti*, se encontraron proteínas sobre expresadas entre 2 fases de desarrollo del mosquito. Entre pupa y adulto fue similar el nivel de expresión de las proteínas GTPasa y Gamma glutamil fosfato reductasa. La función de la GTPasa fue descrita anteriormente, relacionándose con la biogénesis de ribosomas, control del ciclo celular y respuesta al estrés. Por otra parte, la Gamma glutamil fosfato reductasa (*Spot* 6202) está implicada en la biosíntesis de la prolina, un aminoácido no

PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Ae. aegypti*

esencial, a partir del glutamato. Esta proteína cataliza la reducción dependiente de NADPH de L-glutamato 5-fosfato en L-glutamato 5-semialdehído y fosfato para formar 1-pirrolina-5-carboxilato (Arentson *et al.* 2012). Como se mencionó anteriormente, la identificación de una proteína involucrada en la síntesis de la prolina, puede relacionarse con los altos niveles de este aminoácido en la hemolinfa, como en el caso de las hembras de *Ae. aegypti*, quienes han adaptado su metabolismo para oxidar eficientemente la prolina a través de la prolina deshidrogenasa (Correa *et al.* 2015).

Entre larva y adulto también se encontraron proteínas sobre expresadas de manera similar:

El péptido de módulo α 2 soluble en fenol, probable arginina tRNA ligasa, cadenas α y γ de ATP sintasa, proteína de unión a zinc ZnuC, proteína quinasa c tipo delta y enolasa. El péptido de módulo α 2 soluble en fenol (*Spot* 2505) se ha reportado en literatura en el organismo *Staphylococcus aureus* como un péptido que puede lisar algunos leucocitos humanos. Al tratarse de un péptido que no guarda relación con la muestra analizada y tener un bajo score, se puede inferir que la identificación no es correcta y se requeriría un análisis minucioso. La enolasa (*Spot* 3502) 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 y participando de la importación de metabolitos. Se ha descrito que pueden participar en la canalización del piruvato, producto final de la glucólisis, hacia la matriz mitocondrial, donde ocurre el ciclo del ácido cítrico (Entelis *et al.*, 2006).

Al realizar el análisis del transcriptoma total para las fases de larva (L3-L4), pupa (hembras, machos) y adulto (hembras y machos), el PCA indicó que gran parte de la expresión génica no presenta una correlación directa de las variables, es decir, no es evidente el aumento de la expresión

de gran parte de los genes a lo largo del ciclo de vida del mosquito (Figura 8). Sin embargo, vale la pena mencionar que se encontró una relación positiva entre genes que expresan proteínas relacionadas con el ciclo celular y la muda (Cadena pesada axonemal de dineína, Citosol aminopeptidasa, proteína de fibra densa, Histona H1, protamina), proteínas con acción detoxificante (Superoxido dismutasa, citocromo C oxidasa), transportadores de membrana (translocasa de la membrana interna mitocondrial, intercambiador sodio/calcio) y algunas proteínas sin caracterizar. La función de las proteínas con relación positiva en el PCA coincide con la función de las proteínas 2D identificadas, es decir, existe una alta expresión de genes relacionados con proteínas de biosíntesis de tejidos y de protección frente al daño oxidativo.

Con el fin de optimizar el análisis de la información obtenida, se procedió a identificar aquellos transcritos (genes) coincidentes con proteínas identificadas mediante 2D. Al comparar los patrones de expresión génica de las 13 proteínas coincidentes, se observan tres proteínas sobre expresadas en las fases de larva (L3-L4) y hembras adultas que coinciden con los patrones de modulación de la expresión con las proteínas identificadas mediante 2D: la proteasa dependiente de ATP, la proteína 4 que contiene el dominio EH (EHD4) y la Oxidorreductasa. La proteasa dependiente de ATP (ATPasa subunidad HsiU) se encarga de procesos de hidrólisis de ATP, es decir, acopla el gradiente electroquímico de iones a través de la membrana mitocondrial, contribuyendo a regular el pH de los compartimientos intracelulares y por ende, afectando algunos procesos celulares como el transporte entre membranas intracelulares, procesamiento de prohormonas y transporte de neurotransmisores (Dominguez and Tuena 2005; Sánchez-Vásquez and González-Halphen 2017). La proteína 4 que contiene el dominio EH hace parte de una familia de proteínas implicadas en el tráfico endocítico (EHD1, EHD2, EHD3 y EHD4) (Posey *et al.*, 2011). Aunque la menos conocida es la EHD4, se ha implicado como regulador de la internalización de receptores del factor de crecimiento nervioso, interacciones con determinantes

celulares y regulación de la formación de endosomas, funciones implicadas en el mantenimiento de la homeostasis celular (Sharma *et al.*, 2008). Por último, las oxidorreductasas constituyen una amplia gama de enzimas que catalizan la transferencia de electrones desde una molécula donadora de electrones a otra receptora, generalmente tomando nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP) o nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) como cofactores (Cross *et al.* 1999; Gaikwad *et al.* 2001). En insectos, se ha descrito una familia de oxidorreductasas, las GMC-FAD, altamente conservadas en diferentes especies (*Drosophila melanogaster*, *Anopheles gambiae*, *Apis mellifera* y *Tribolium castaneum*) que juegan un papel en el metabolismo de ecdisteroides (Hormona de la muda) (Iida *et al.*, 2007). La sobreexpresión de estas tres proteínas se relaciona con procesos de diferenciación, señalización celular, biosíntesis de tejidos y regulación hormonal, procesos de gran importancia en el desarrollo del ciclo de vida del zancudo durante su fase juvenil. Adicionalmente, destaca la presencia de proteínas estrechamente relacionadas con la cadena respiratoria mitocondrial, sobre expresadas en adultos debido a un mayor requerimiento energético (ATP) derivado de la actividad del vuelo, necesaria para la búsqueda de alimentación sanguínea en hembras (Correa *et al.* 2015).

Contrario a lo observado en los patrones de modulación de la expresión con las proteínas identificadas mediante 2D, se observaron dos proteínas con disminución de la expresión en el transcriptoma a lo largo del ciclo de vida de *Ae. aegypti*: la subunidad beta de ARN polimerasa dirigida por ARN y el transportador de glicina mitocondrial. La función de estas proteínas se relaciona con la polimerización de ribonucleótidos y la producción del grupo Hemo respectivamente, descritas anteriormente en detalle (Arragain *et al.* 2010; Lunetti *et al.* 2016). Cabe mencionar que en el transcriptoma se encontró más de un gen que podría codificar estas proteínas, con patrones de expresión que difieren entre sí.

PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Ae. aegypti*

Al realizar un PCA con los transcritos que coinciden con proteínas identificadas en 2D (Figura 10), se observó una relación positiva para las oxidorreductasas y la Sub-beta de la ARN polimerasa, importantes en procesos de biosíntesis de proteínas, señalización y funcionamiento de la cadena respiratoria mitocondrial (Arragain *et al.*, 2010; Iida *et al.*, 2007). También se observó una relación negativa para la cisteína ligasa y el transportador de glicina. Las relaciones observadas entre los genes en el PCA concuerdan con los patrones de expresión descritos, con una mayor expresión de genes relacionados con biosíntesis de tejidos y activación metabólica en las diferentes fases del ciclo de vida de *Ae. aegypti*

El proteoma mitocondrial del mosquito *Ae. aegypti* se caracteriza por proteínas y enzimas que cumplen con funciones específicas en cada fase de desarrollo. En fase de larva (L3-L4) aumentó la expresión de proteínas relacionadas con la biosíntesis de tejidos, activación metabólica y protección frente al daño oxidativo. En fase de pupa se expresaron proteínas relacionadas a la biosíntesis y degradación de tejidos, estrechamente relacionadas con las funciones metabólicas características de esta fase. Y en el adulto, aumentó la expresión de proteínas de biosíntesis, de respuesta al estrés, al daño oxidativo y aumento en la producción de ATP. Aunque algunas proteínas no se encuentran caracterizadas para *Ae. aegypti*, los patrones de expresión génica descritos a partir del transcriptoma contribuyen a confirmar los cambios en la expresión y el papel (función) que cumplen acorde con los requerimientos fisiológicos de cada fase de desarrollo.

En términos generales, la expresión proteica mitocondrial de *Ae. aegypti* se encuentra estrechamente relacionada con el funcionamiento metabólico propio de cada una de las fases de desarrollo, contribuyendo a la regulación y modulación de diferentes procesos fisiológicos. La influencia de factores externos (disponibilidad de alimento, nivel de agua en las fases juveniles, búsqueda de alimentación sanguínea en las hembras, etc) pueden influenciar el funcionamiento de la cadena respiratoria mitocondrial, conllevando a condiciones de estrés y aumento de especies

PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Ae. aegypti*

reactivas de oxígeno, las cuales son contrarrestadas con algunas proteínas específicas (oxidorreductasas) a lo largo del ciclo de vida del mosquito.

Bibliografía Citada

- Akbari, O. S., Antoshechkin, I., Amrhein, H., Williams, B., Diloreto, R., Sandler, J., & Hay, B. a. (2013). The developmental transcriptome of the mosquito *Aedes aegypti*, an invasive species and major arbovirus vector. *G3* , 3(9), 1493–1509.
- Arentson, B. W., Benjamin, & Arentson, W. (2012). Substrate channeling in proline metabolism. In *Frontiers in Bioscience* (Vol. 17, Issue 1, p. 375). <https://doi.org/10.2741/3932>
- Arragain, S., Handelman, S. K., Forouhar, F., Wei, F.-Y., Tomizawa, K., Hunt, J. F., Douki, T., Fontecave, M., Mulliez, E., & Atta, M. (2010). Identification of Eukaryotic and Prokaryotic Methylthiotransferase for Biosynthesis of 2-Methylthio-N6-threonylcarbamoyladenine in tRNA. In *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 285, Issue 37, pp. 28425–28433). <https://doi.org/10.1074/jbc.m110.106831>
- Banci, L., Brancaccio, D., Ciofi-Baffoni, S., Del Conte, R., Gadepalli, R., Mikolajczyk, M., Neri, S., Piccioli, M., & Winkelmann, J. (2014). [2Fe-2S] cluster transfer in iron–sulfur protein biogenesis. In *Proceedings of the National Academy of Sciences* (Vol. 111, Issue 17, pp. 6203–6208). <https://doi.org/10.1073/pnas.1400102111>
- Behura, S. K., Lobo, N. F., Haas, B., deBruyn, B., Lovin, D. D., Shumway, M. F., Puiu, D., Romero-Severson, 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. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 41(10), 770–777.
- Berthelet, J., & Dubrez, L. (2013). Regulation of Apoptosis by Inhibitors of Apoptosis (IAPs). *Cells* , 2(1), 163–187.
- Bhatt, S., Gething, P., Brady, O., Messina, J., Farlow, A., Moyes, C., Drake, J., Brownstein, J.,

- Hoen, A., Sankoh, O., Myers, M., George, D., Jaenisch, T., Wint, W., Simmons, C., Scott, T., Farrar, J., & Hay, S. (2013). The global distribution and burden of dengue. *Nature*, *496*((7446)), 504–507.
- Bonventre, J. A., Zielke, R. A., Korotkov, K. V., & Sikora, A. E. (2016). Targeting an Essential GTPase Obg for the Development of Broad-Spectrum Antibiotics. *PloS One*, *11*(2), e0148222.
- Borkovich, K. A., Farrelly, F. W., Finkelstein, D. B., Taulien, J., & Lindquist, S. (1989). hsp82 is an essential protein that is required in higher concentrations for growth of cells at higher temperatures. In *Molecular and Cellular Biology* (Vol. 9, Issue 9, pp. 3919–3930). <https://doi.org/10.1128/mcb.9.9.3919-3930.1989>
- Borrero, M. A., Carreño, 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*(June 2017), 19–26.
- 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*, 248–254.
- Cai, X.-C., Kapilashrami, K., & Luo, M. (2016). Synthesis and assays of inhibitors of Methyltransferases. In *Methods in Enzymology* (pp. 245–308). <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2016.01.009>
- Castrillón, J., Carlos, J., & Urcuqui, S. (2014). Dengue en Colombia, diez años de evolución. *Revista Chilena de Infectología*, *32*((2)), 22–29.
- Chandra Sanyal, S., & Liljas, A. (2000). The end of the beginning: structural studies of ribosomal proteins. *Current Opinion in Structural Biology*, *10*(6), 633–636.

- Correa, J., 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.
- Cross, J. V., Deak, J. C., Rich, E. A., Qian, Y., Lewis, M., Parrott, L. A., Mochida, K., Gustafson, D., Pol, S. V., & Templeton, D. J. (1999). Quinone Reductase Inhibitors Block SAPK/JNK and NFκB Pathways and Potentiate Apoptosis. In *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 274, Issue 44, pp. 31150–31154). <https://doi.org/10.1074/jbc.274.44.31150>
- Denzoin Vulcano, L. A., Soraci, A. L., & Tapia, M. O. (2013). Homeostasis del glutatión. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, *47*(3), 0–0.
- Desalle, R., Schierwater, B., & Hadrys, H. (2017). MtDNA: The small workhorse of evolutionary studies. *Frontiers in Bioscience*, *22*(January), 873–887.
- Didiasova, M., Schaefer, L., & Wygrecka, M. (2019). When Place Matters: Shuttling of Enolase-1 Across Cellular Compartments. In *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Vol. 7). <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00061>
- Doherty, N., Holden, M. T. G., Qazi, S. N., Williams, P., & Winzer, K. (2006). Functional analysis of luxS in *Staphylococcus aureus* reveals a role in metabolism but not quorum sensing. *Journal of Bacteriology*, *188*(8), 2885–2897.
- Domínguez-Ramírez, L., & Gómez-Puyou, M. T. de. (2005). La F₁F₀ ATP sintasa: un complejo proteico con gran versatilidad estructural y funcional. *Tipica*, *8*(1), 18–27.
- Entelis, N., Brandina, I., Kamenski, P., Krasheninnikov, 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*. In *Genes & Development* (Vol. 20, Issue 12, pp. 1609–1620). <https://doi.org/10.1101/gad.385706>
- Eriksson, S., Munch-Petersen, B., Johansson, K., & Eklund, H. (2002). Structure and function of

- cellular deoxyribonucleoside kinases. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 59(8), 1327–1346.
- Ferro, M., Salvi, D., Riviere-Rolland, H., Vermat, T., Seigneurin-Berny, D., Grunwald, D., Garin, J., Joyard, J., & Rolland, N. (2002). Integral membrane proteins of the chloroplast envelope: identification and subcellular localization of new transporters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(17), 11487–11492.
- 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.
- Frodyma, M. E., & Downs, D. (1998). The *panE* Gene, Encoding Ketopantoate Reductase, Maps at 10 Minutes and Is Allelic to *apbA* in *Salmonella typhimurium*. In *Journal of Bacteriology* (Vol. 180, Issue 17, pp. 4757–4759). <https://doi.org/10.1128/jb.180.17.4757-4759.1998>
- Gaikwad, A., Long, D. J., Stringer, J. L., & Jaiswal, A. K. (2001). In Vivo Role of NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase 1 (NQO1) in the Regulation of Intracellular Redox State and Accumulation of Abdominal Adipose Tissue. In *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 276, Issue 25, pp. 22559–22564). <https://doi.org/10.1074/jbc.m101053200>
- Garavaglia, S., D'Angelo, I., Emanuelli, M., Carnevali, F., Pierella, F., Magni, G., & Rizzi, M. (2002). *Crystal structure of nuclear human nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase*. Worldwide Protein Data Bank. <https://doi.org/10.2210/pdb1kku/pdb>
- Gessert, S. F., Kim, J. H., Nargang, F. E., & Weiss, R. L. (1994). A polyprotein precursor of two mitochondrial enzymes in *Neurospora crassa*. Gene structure and precursor processing. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(11), 8189–8203.
- Gupta, R. S. (1995). Evolution of the chaperonin families (HSP60, HSP 10 and TCP-1) of proteins and the origin of eukaryotic cells. In *Molecular Microbiology* (Vol. 15, Issue 1, pp. 1–11). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.tb02216.x>

- Holt, R. A., Subramanian, G. M., Halpern, A., Sutton, G. G., Charlab, R., Nusskern, D. R., Wincker, P., Clark, A. G., Ribeiro, J. M., Wides, R., Salzberg, S. L., Loftus, B., Yandell, M., Majoros, W. H., Rusch, D. B., Lai, Z., Kraft, C. L., Abril, J. F., Anthouard, V., ... Hoffman, S. L. (2002). The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Science*, 298(October 2002), 129–149.
- Hu, C. A., Delauney, A. J., & Verma, D. P. (1992). A bifunctional enzyme (delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase) catalyzes the first two steps in proline biosynthesis in plants. In *Proceedings of the National Academy of Sciences* (Vol. 89, Issue 19, pp. 9354–9358). <https://doi.org/10.1073/pnas.89.19.9354>
- Iida, K., Cox-Foster, D. L., Yang, X., Ko, W.-Y., & Cavener, D. R. (2007). Expansion and evolution of insect GMC oxidoreductases. In *BMC Evolutionary Biology* (Vol. 7, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-75>
- Johansson, M. J. O., Esberg, A., Huang, B., Björk, G. R., & Byström, A. S. (2008). Eukaryotic wobble uridine modifications promote a functionally redundant decoding system. *Molecular and Cellular Biology*, 28(10), 3301–3312.
- Koenig, T., Menze, B. H., Kirchner, M., Monigatti, F., Parker, K. C., Patterson, T., Steen, J. J., Hamprecht, F. A., & Steen, H. (2008). Robust prediction of the MASCOT score for an improved quality assessment in mass spectrometric proteomics. *Journal of Proteome Research*, 7(9), 3708–3717.
- Ludovice, M., Martin, J. F., Carrachas, P., & Liras, P. (1992). Characterization of the *Streptomyces clavuligerus* argC gene encoding N-acetylglutamyl-phosphate reductase: expression in *Streptomyces lividans* and effect on clavulanic acid production. *Journal of Bacteriology*, 174(14), 4606–4613.
- 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. *The Journal of Biological Chemistry*, *291*(38), 19746–19759.
- Lurin, C., Andreés, C., Aubourg, S., Bellaoui, M., Bitton, F., Bruyère, C., Caboche, M., Debast, C., Gualberto, J., Hoffmann, B., Lecharny, A., Le Ret, M., Martin-Magniette, M.-L., Mireau, H., Peeters, N., Renou, J.-P., Szurek, B., Tacconnat, L., & Small, I. (2004). Genome-Wide Analysis of Arabidopsis Pentatricopeptide Repeat Proteins Reveals Their Essential Role in Organelle Biogenesis[W]. In *The Plant Cell* (Vol. 16, Issue 8, pp. 2089–2103). <https://doi.org/10.1105/tpc.104.022236>
- Maguire, B. A., & Zimmermann, R. A. (2001). The ribosome in focus. *Cell*, *104*(6), 813–816.
- Morgan, B., Ang, S. K., Yan, G., & Lu, H. (2009). Zinc can play chaperone-like and inhibitor roles during import of mitochondrial small Tim proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, *284*(11), 6818–6825.
- Navarro, J. A., & Schneuwly, S. (2017). Copper and Zinc Homeostasis: Lessons from *Drosophila melanogaster*. *Frontiers in Genetics*, *8*, 223.
- Nene, V., Wortman, J. R., Lawson, D., Haas, B., Kodira, C., Tu, Z. J., 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.
- Paduan, K. dos S., & Ribolla, P. E. M. (2008). Mitochondrial DNA polymorphism and heteroplasmy in populations of *Aedes aegypti* in Brazil. *Journal of Medical Entomology*, *45*(1), 59–67.
- Pando, R. V., & Lanz, H. (2009). La importancia de la proteómica en la salud pública. *Salud*

Pública, 51(1), S386–S394.

- Pearson, B. M., Hernando, Y., Payne, J., Wolf, S. S., Kalogeropoulos, A., & Michael Schweizer. (1996). Sequencing of a 35·71 kb DNA segment on the right arm of yeast chromosome XV reveals regions of similarity to chromosomes I and XIII. In *Yeast* (Vol. 12, Issue 10B, pp. 1021–1031).[https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0061\(199609\)12:10b<1021::aid-yea981>3.0.co;2-7](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0061(199609)12:10b<1021::aid-yea981>3.0.co;2-7)
- Perrin, R., Meyer, E. H., Zaepfel, M., Kim, Y.-J., Mache, R., Grienberger, J.-M., Gualberto, J. M., & Gagliardi, D. (2004). Two Exoribonucleases Act Sequentially to Process Mature 3'-Ends of *atp9* mRNAs in Arabidopsis Mitochondria. In *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 279, Issue 24, pp. 25440–25446). <https://doi.org/10.1074/jbc.m401182200>
- Petsalaki, E. I., Bagos, P. G., Litou, Z. I., & Hamodrakas, S. J. (2006). PredSL: a tool for the N-terminal sequence-based prediction of protein subcellular localization. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 4(1), 48–55.
- Picard, M., & McEwen, B. S. (2018). Psychological Stress and Mitochondria. *Psychosomatic Medicine*, 80(2), 141–153.
- Popow, J., Schleiffer, A., & Martinez, J. (2012). Diversity and roles of (t)RNA ligases. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 69(16), 2657–2670.
- Posey, A. D., Jr, Pytel, P., Gardikiotes, K., Demonbreun, A. R., Rainey, M., George, M., Band, H., & McNally, E. M. (2011). Endocytic recycling proteins EHD1 and EHD2 interact with fer-1-like-5 (Fer1L5) and mediate myoblast fusion. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(9), 7379–7388.
- Quel, N. G., Pinheiro, G. M. S., Rodrigues, L. F. de C., Barbosa, L. R. S., Houry, W. A., & Ramos, C. H. I. (2020). Heat shock protein 90 kDa (Hsp90) from *Aedes aegypti* has an open conformation and is expressed under heat stress. *International Journal of Biological*

Macromolecules, 156, 522–530.

Ramachandran, R., Hartmann, C., Song, H. K., Huber, R., & Bochtler, M. (2002). Functional interactions of HslV (ClpQ) with the ATPase HslU (ClpY). In *Proceedings of the National Academy of Sciences* (Vol. 99, Issue 11, pp. 7396–7401). <https://doi.org/10.1073/pnas.102188799>

Ramakrishnan, V., & Moore, P. B. (2001). Atomic structures at last: the ribosome in 2000. *Current Opinion in Structural Biology*, 11(2), 144–154.

Rodríguez Cruz, R. (2002). Estrategias para el control del dengue y del *Aedes aegypti* en las Américas. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602002000300004

Rodríguez Cubillos, A. E., Perlaza-Jiménez, L., & Bernal Giraldo, A. J. (2014). RNA-Seq Data Analysis in Prokaryotes: A Review for Non-experts. *Acta Biológica Colombiana*, 19(2), 131.

Rodriguez-Morales, A. (2015a). Aedes: un eficiente vector de viejos y nuevos arbovirus (dengue, chikungunya y zika) en las Americas. *Rev. Cuerpo Med.*, 8(2), 50–52.

Rodriguez-Morales, A. (2015b). No era suficiente con dengue y chikungunya: llegó también Zika. *iMedPub Journals*, 11(2-3), 1–4.

Sánchez-Vásquez, L., & González-Halphen, D. (2017). Topología y función de las subunidades intrínsecas de la membrana de la *f1fo1*-atp sintasa mitocondriales. In *TIP* (Vol. 20, Issue 2, pp. 29–47). <https://doi.org/10.1016/j.recqb.2017.04.004>

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.

Schaffrath, R., & Leidel, S. A. (2017). Wobble uridine modifications—a reason to live, a reason to

die?! *RNA Biology*, 14(9), 1209–1222.

Sharma, M., Naslavsky, N., & Caplan, S. (2008). A Role for EHD4 in the Regulation of Early Endosomal Transport. In *Traffic* (Vol. 9, Issue 6, pp. 995–1018). <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2008.00732.x>

Sinkins, S. P. (2010). Europe PMC Funders Group Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector. *Science*, 316(5832), 1718–1723.

Symmons, M. F., Jones, G. H., & Luisi, B. F. (2000). A Duplicated Fold Is the Structural Basis for Polynucleotide Phosphorylase Catalytic Activity, Processivity, and Regulation. In *Structure* (Vol. 8, Issue 11, pp. 1215–1226). [https://doi.org/10.1016/s0969-2126\(00\)00521-9](https://doi.org/10.1016/s0969-2126(00)00521-9)

Szklarczyk, D., Gable, A. L., Nastou, K. C., Lyon, D., Kirsch, R., Pyysalo, S., Doncheva, N. T., Legeay, M., Fang, T., Bork, P., Jensen, L. J., & von Mering, C. (2020). The STRING database in 2021: customizable protein–protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D605–D612.

Timoshevskiy, V. A., Severson, D. W., DeBruyn, B. S., Black, W. C., Sharakhov, I. V., & Sharakhova, M. V. (2013). An Integrated Linkage, Chromosome, and Genome Map for the Yellow Fever Mosquito *Aedes aegypti*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002052>

Tsujimoto, H., Anderson, M. A. E., Myles, K. M., & Adelman, Z. N. (2018). Identification of Candidate Iron Transporters From the ZIP/ZnT Gene Families in the Mosquito *Aedes aegypti*. *Frontiers in Physiology*, 9, 380.

Villavicencio-Queijeiro, A. (2012). La mitocondria como fábrica de cofactores: biosíntesis de grupo hemo, centros Fe-S y nucleótidos de flavina (FMN/FAD). *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 15(2), 116–132.

Warren, A. M., & Crampton, J. M. (1991). The *Aedes aegypti* genome: complexity and

organization. *Genetical Research*, 58(3), 225–232.

Weaver, S., & Lecuit, M. (2015). Chikungunya Virus and the Global Spread of a Mosquito-Borne Disease. *The New England Journal of Medicine*, 372, 1231–1239.

White, W. H., Hunter White, W., Gunyuzlu, P. L., & Toyn, J. H. (2001). *Saccharomyces cerevisiae* is capable of de novo pantothenic acid biosynthesis involving a novel pathway of β -Alanine production from spermine. In *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 276, Issue 14, pp. 10794–10800). <https://doi.org/10.1074/jbc.m009804200>

Xu, T., Department of Biochemistry and Molecular Biology, The Chicago Medical School, Rosalind Franklin University of Medicine and Science, Road, 3333 Green Bay, Chicago, N., IL, Pagadala, V., Mueller, D., Department of Chemical Biology and Medicinal Chemistry, Eshelman School of Pharmacy, University of North Carolina, Hill, C., & NC. (2015). Understanding structure, function, and mutations in the mitochondrial ATP synthase. In *Microbial Cell* (Vol. 2, Issue 4, pp. 105–125). <https://doi.org/10.15698/mic2015.04.197>

Yao, Z., Guo, Z., Wang, Y., Li, W., Fu, Y., Lin, Y., Lin, W., & Lin, X. (2019). Integrated succinylome and metabolome profiling reveals crucial role of s-ribosylhomocysteine lyase in quorum sensing and metabolism of *aeromonas hydrophila**[S]. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, 18(2), 200–215.

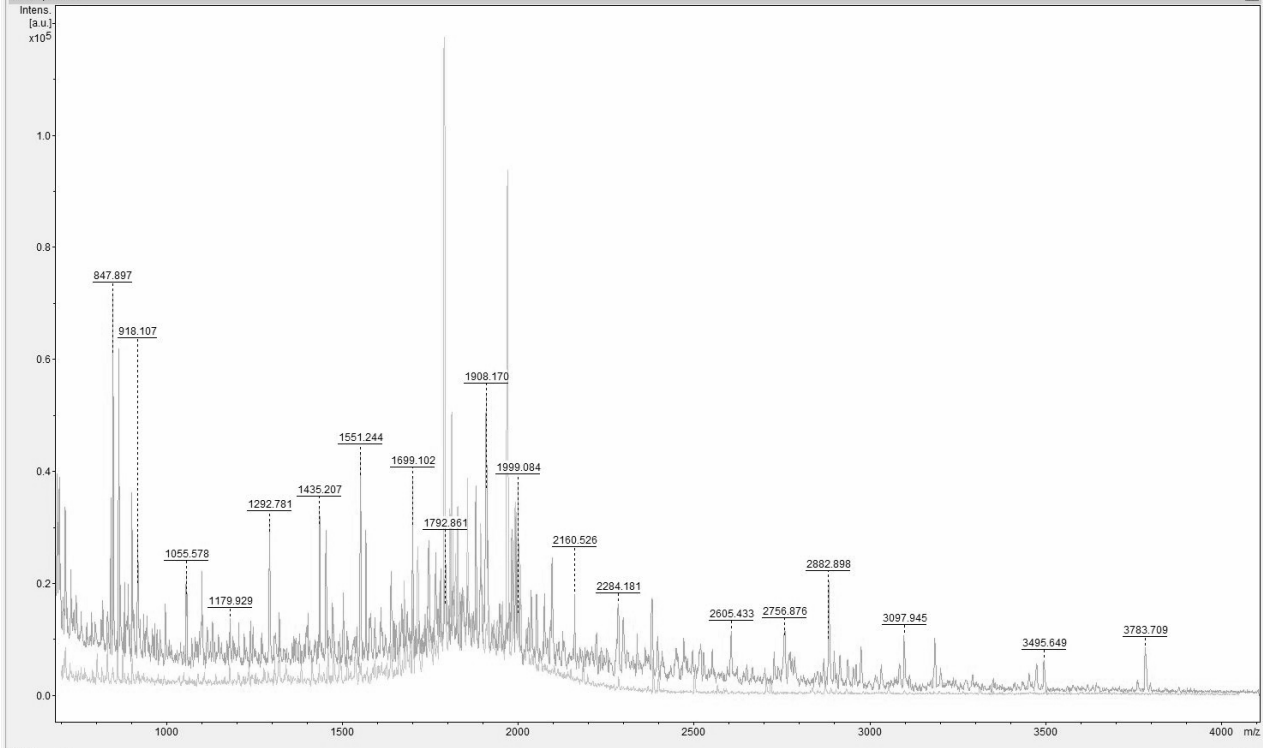
Zhang, G., Campbell, E. A., Minakhin, L., Richter, C., Severinov, K., & Darst, S. A. (1999). Crystal Structure of *Thermus aquaticus* Core RNA Polymerase at 3.3 Å Resolution. In *Cell* (Vol. 98, Issue 6, pp. 811–824). [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81515-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81515-9)

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.

Apéndices

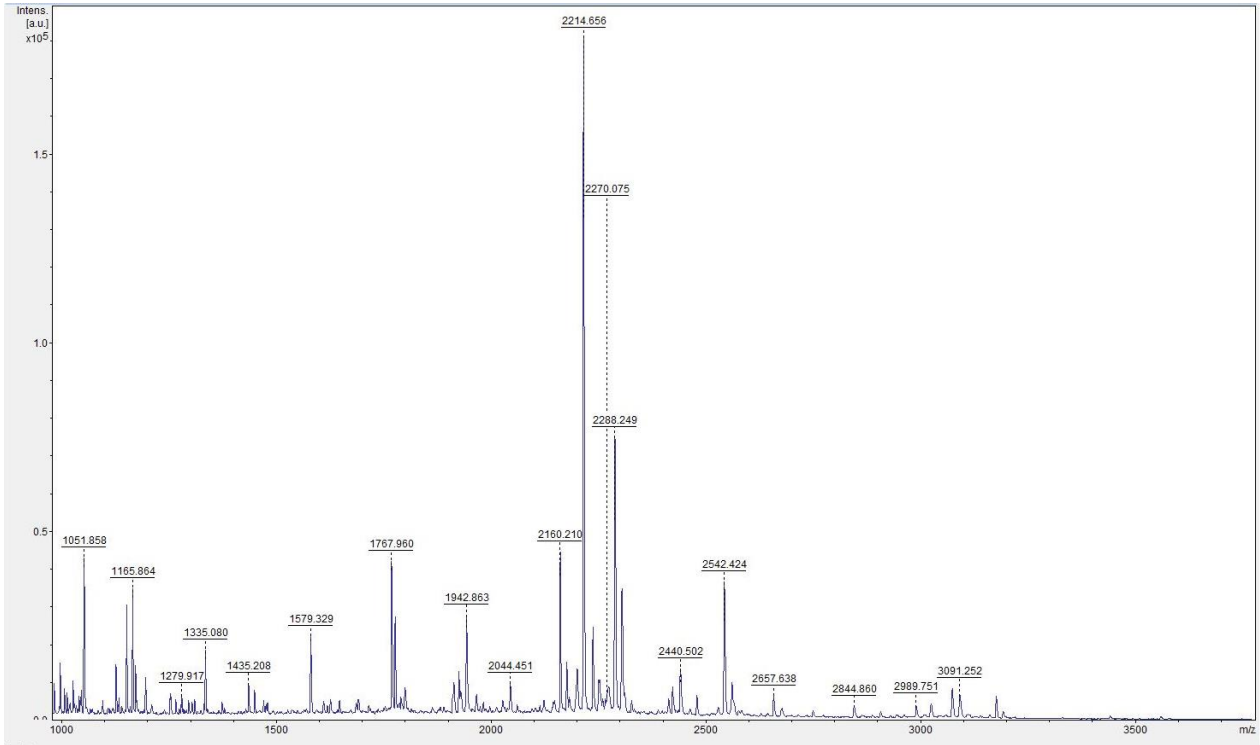
Apéndice A

Espectro de masas correspondiente a proteínas mitocondriales de larva L3-L4 de Ae. aegypti.



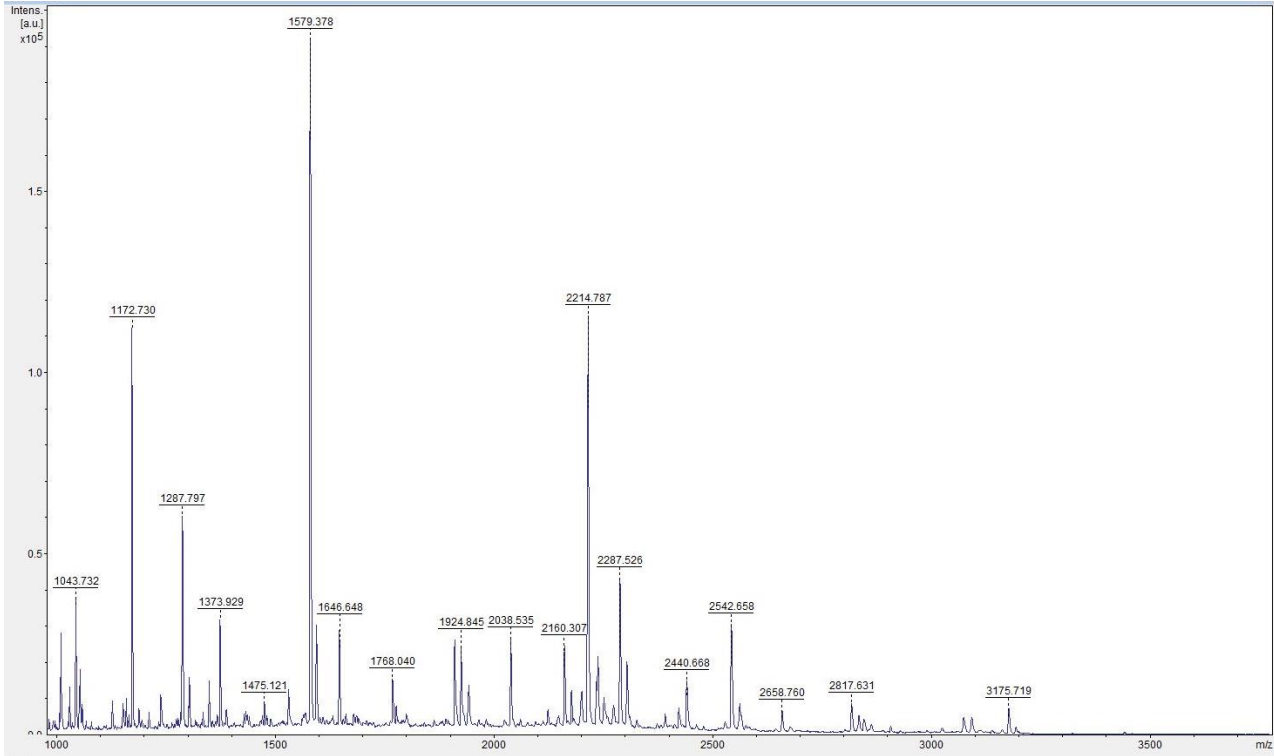
Apéndice B

Espectro de masas correspondiente a proteínas mitocondriales de pupa de Ae. aegypti.



Apéndice C

Espectro de masas correspondiente a proteínas mitocondriales de adulto de *Ae. aegypti*.



3. CONCLUSIONES GENERALES

La mitocondria constituye un organelo celular de gran importancia no solo para el funcionamiento de la célula, sino como *target* de interés en el control poblacional del mosquito *Ae. aegypti*. La comprensión del funcionamiento a nivel de parámetros respiratorios y análisis de la expresión génica (proteoma) mitocondrial contribuye a conocer aspectos fisiológicos clave en cada una de las fases del ciclo de vida del mosquito, aspectos que pueden ser empleados en el diseño de nuevas moléculas sintéticas, la evaluación de diferentes mecanismos de acción y el uso de técnicas moleculares para la disminución de mecanismos de resistencia.

Los valores obtenidos del cálculo de los valores del Coeficiente de Control Respiratorio (CCR) empleando mitocondrias aisladas y tejido permeabilizado para todas las fases de desarrollo de *Ae. aegypti* fueron menores a los reportados en literatura, con valores que oscilaron entre 1 y 1,8, sugiriendo la presencia de mitocondrias dañadas o desacopladas. Sin embargo, los resultados derivados de la medición de integridad mitocondrial al emplear citocromo c, indicaron la presencia de mitocondrias íntegras. Esta discordancia en los resultados obtenidos puede deberse a la presencia de proteínas desacopladoras como la UCP4, localizada en la membrana mitocondrial interna de invertebrados. Aunque se conoce muy poco sobre el rol de esta proteína desacopladora, entre sus principales funciones se encuentra el regular el potencial de membrana mitocondrial y los niveles de ROS, además de incrementar la síntesis de ATP mediante su interacción directa con el Complejo II. Sin embargo, esta hipótesis se corroborará con estudios a desarrollar en el CINTROP.

Con el sustrato succinato se obtuvieron los valores más altos de consumo de oxígeno tanto en mitocondrias aisladas, como en tejido permeabilizado en todas las fases de desarrollo evaluados. Para larvas L3-L4, se observó una mayor actividad de los Complejos I y II empleando como fuente

PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Ae. aegypti*

de electrones los sustratos glutamato y succinato. Para pupas la respiración se da principalmente mediante el ingreso de electrones vía Complejo II y Prolina deshidrogenasa, empleando succinato y prolina+piruvato como sustratos oxidables. Para adultos, se observó una mayor actividad del complejo II, empleando succinato como sustrato.

Los resultados obtenidos para los parámetros respiratorios y los datos de expresión proteica mitocondrial se encuentran relacionados con la actividad propia de cada fase de desarrollo evaluada. En la fase de larva L4, se observó un aumento en la expresión de proteínas relacionadas con la biosíntesis de tejidos, activación metabólica y protección frente al daño oxidativo, relacionadas con una mayor actividad respiratoria de los Complejos I y II, empleando los sustratos glutamato y succinato para la generación de ATP requerida para la formación de tejidos, almacenamiento de glucógeno y cambios hormonales propios de esta fase.

La expresión proteica en la fase de pupa se caracteriza por una actividad de biosíntesis y degradación de tejidos (Histólisis). Esta actividad se relaciona con los bajos valores respiratorios obtenidos, donde la mitocondria juega un importante papel en la activación de mecanismos de muerte celular programada. A este hecho se suma una disminución en la producción de ATP, con una actividad del complejo II y la prolina deshidrogenasa en respuesta al metabolismo basal lento característico de esta fase de desarrollo.

La fase de adulto se caracteriza por presentar un mayor ingreso de electrones con el sustrato succinato (Complejo II), seguido del sustrato G3P, así como un aumento en la producción de ATP, relacionado con la alta demanda energética en algunos tejidos como el músculo del vuelo. Frente a esta situación, se observó un aumento en la expresión de proteínas relacionadas con biosíntesis, respuesta al estrés y al daño oxidativo. Las escasas reservas de glucógeno en el musculo del vuelo durante los primeros días de vida del adulto, activan el uso de mecanismos que contrarresten la alta

demanda energética y que disminuyan la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), causantes de estrés oxidativo.

La acción de factores externos puede influir en el funcionamiento de la cadena respiratoria mitocondrial, donde la acción de diferentes proteínas contrarresta potenciales condiciones de estrés y aumento de especies reactivas de oxígeno. De esta manera, los patrones de expresión génica observados pueden contribuir a dar explicación a los valores de respiración mitocondrial, los cuales son concordantes con los requerimientos fisiológicos y metabólicos de cada fase de desarrollo.

4. CONSIDERACIONES ÉTICAS

4.1 NIVEL DE RIESGO Y BENEFICIO DEL PROYECTO

De acuerdo con la Resolución 008430 de octubre 4 de 1993, esta propuesta Doctoral se considera una investigación sin riesgo debido a que a lo largo del proyecto se trabajara con material biológico proveniente de insectos y no de mamíferos.

Las enfermedades transmitidas por vectores constituyen una gran preocupación para diferentes países ubicados en la región tropical debido a la afectación de una gran parte de la población y la inversión en diferentes estrategias de prevención y control. Considerando que las enfermedades transmitidas por el mosquito *Ae. aegypti* no cuentan con vacunas o tratamientos eficaces y que las medidas de prevención son variables en el tiempo, las medidas de control constituyen el principal medio para la disminución de las densidades poblacionales del vector.

Sin embargo, el uso intensivo de productos de origen sintético a derivado en la generación de mecanismos de resistencia en diferentes puntos blanco de acción del mosquito. Dada esta situación, en los últimos años se han dado a conocer diferentes alternativas mediante el uso de sustancias de origen natural y técnicas de modificación genética. Estas técnicas buscan principalmente la disminución de la capacidad reproductiva del vector en poblaciones silvestres. Aun cuando se ha estudiado la modificación génica a diferentes niveles, no se ha considerado la modificación del ADN mitocondrial.

Dada la importancia fisiológica de la mitocondria para el desarrollo de importantes procesos metabólicos, los resultados de la presente propuesta se encuentran encaminados brindar desde la ciencia básica el conocimiento que permita conocer a fondo tanto el funcionamiento de la fosforilación oxidativa como la expresión génica mitocondrial del mosquito *Ae. aegypti*. Conocer los valores de función mitocondrial de cada fase contribuye de manera significativa en la

comprensión del modo de acción de diferentes productos de origen natural o sintético en este orgánulo, además de proporcionar información clave para la comprensión de rutas convencionales y alternativas para la obtención de ATP.

Considerando que pequeñas variaciones en las proteínas presentes en la cadena respiratoria mitocondrial pueden alterar el funcionamiento celular, el análisis del proteoma mitocondrial de cada fase de desarrollo del mosquito permitirá conocer si existen posibles cambios estructurales y funcionales relacionados con la biología del desarrollo, y de esta manera poder diseñar métodos de modificación genética eficaces y selectivos.

4.2 USO DE ANIMALES

En relación con el uso de animales, con el fin de suministrar a las hembras de *S. aegypti* alimentación sanguínea para la obtención de huevos, se emplearán ratas albinas (*Rattus norvegicus*) de raza Winstar WI IOPS AF/Han, facilitadas por el bioterio 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. El manejo de los ejemplares de *Rattus norvegicus*, su cría, mantenimiento y sacrificio será realizado únicamente por el personal a cargo del bioterio. El personal auxiliar encargado del bioterio de la Universidad Industrial de Santander será el encargado de seleccionar los ejemplares asignados para la alimentación de las colonias y de la renovación de manera regular para garantizar la adecuada alimentación de la colonia de *Ae. aegypti*. La manipulación de los ejemplares durante la alimentación de estas estará a cargo únicamente de la estudiante de doctorado, encargada a su vez de retornar los ejemplares al bioterio.

4.3 MANEJO DE SUSTANCIAS

El Parque Tecnológico Guatiguará genera residuos en cantidades y características de interés sanitario y ambiental (biológicos, químicos y desechos sólidos, entre otros) que merecen un manejo, clasificación, almacenamiento y una disposición final adecuada. Para la gestión integral de estos residuos, se tienen en cuenta los lineamientos descritos en la normatividad legal vigente, como la Ley novena de 1979, Código Sanitario Nacional; el Decreto 4741 del 2005 por el cual se reglamenta el manejo de residuos peligrosos en Colombia y el Decreto 351 de febrero de 2014, el cual armoniza y actualiza ambiental y sanitariamente la gestión integral de los residuos generados en la atención en salud y otras actividades en Colombia. Es así como en el año 2008 se formuló y elaboró el PLAN DE GESTIÓN INTEGRAL DE RESIDUOS SÓLIDOS – PGIRS de la Sede Guatiguará, el cual fue viabilizado por la Coordinación de la Sede y por la Secretaría Departamental de Santander.

De esta manera, en los laboratorios donde se encuentra el insectario y el lugar de experimentación del CINTROP, se generan residuos como Infecciosos o de Riesgo Biológico, además de residuos Químicos (Ministerio de Medio Ambiente y Salud, 2002), discriminados de la siguiente manera:

Biosanitarios:

Son todos aquellos elementos o instrumentos utilizados durante la ejecución de los procedimientos asistenciales que tienen contacto con materia orgánica, sangre o fluidos corporales del paciente humano o animal tales como: gasas, apósitos, aplicadores, algodones, drenes, vendajes, mechas, guantes, bolsas para transfusiones sanguíneas, catéteres, sondas, material de laboratorio como tubos capilares y de ensayo, medios de cultivo, láminas porta objetos y cubre objetos, laminillas, sistemas cerrados y sellados de drenajes, ropas desechables, toallas higiénicas, pañales o cualquier otro elemento desechable.

Cortopunzantes:

Son aquellos que por sus características punzantes o cortantes pueden dar origen a un accidente percutáneo infeccioso. Dentro de éstos se encuentran: limas, lancetas, cuchillas, agujas, restos de ampollas, pipetas, láminas de bisturí o vidrio, y cualquier otro elemento que por sus características cortopunzantes pueda lesionar y ocasionar un riesgo infeccioso.

Reactivos:

Son aquellos que por sí solos y en condiciones normales, al mezclarse o al entrar en contacto con otros elementos, compuestos, sustancias o residuos, generan gases, vapores, humos tóxicos, explosión o reaccionan térmicamente colocando en riesgo la salud humana o el medio ambiente. Incluyen líquidos de revelado y fijado, de laboratorios, medios de contraste, reactivos de diagnóstico in vitro y de bancos de sangre.

El manejo adecuado del material biosanitario sigue todos los procedimientos de la normativa ambiental, sanitaria y ocupacional de residuos potencialmente peligrosos. Los desechos cortopunzantes y reactivos son separados y descartados en recipientes rotulados de acuerdo con la normativa del Parque tecnológico de Guatiguará. La gestión externa de los residuos generados en el Parque tecnológico de Guatiguará está contratada con la empresa DESCONT S.A ESP, la cual se encuentra debidamente acreditada para la actividad descrita bajo Licencia Ambiental No. 426 del 21 de mayo de 1999 otorgada por la Corporación Autónoma Regional para la defensa de la Meseta de Bucaramanga (CDMB).

Por último, durante la ejecución de las diferentes pruebas, el ser humano utilizara todos los implementos de protección personal como guantes de látex, tapa bocas, batas anti-fluido, máscaras de seguridad y campanas de extracción de gases. También, como política de todos los laboratorios ubicados en la sede Guatiguará, se hace un seguimiento estricto para que se mantengan y cumplan las normas de bioseguridad en el lugar de trabajo.

4.3.1 MANEJO DE RESIDUOS GENERADOS EN EL PROYECTO

De acuerdo con el PLAN DE GESTIÓN INTEGRAL DE RESIDUOS SÓLIDOS – PGIRS de la Sede Guatiguará, el manejo de los residuos generados a lo largo del proyecto seguirá tres fases: Segregación, Tratamiento y Disposición Final.

Fase de Segregación:

La fase de segregación contempla la plena identificación del tipo de residuo generado, así como el tipo de contenedor, recipiente o envase para el almacenamiento de residuos peligrosos dependiendo del tipo de residuo. Para biosanitarios se emplean bolsas de polietileno de alta densidad de color rojo, para cortopunzantes se emplearán recipientes herméticos con tapa de color rojo. Estas bolsas y recipientes se deben llenar hasta $\frac{3}{4}$ partes de su capacidad, cerrándose adecuadamente antes de ser transportados al sitio de almacenamiento temporal y no se deben abrir o vaciar. Las bolsas para recolección de residuos deben estar ubicadas dentro de una caneca plástica de color rojo sin aristas y con tapa fija. Los residuos cortopunzantes antes de su disposición final deben ser inactivados añadiendo una solución de hipoclorito de sodio al 0,5%, por 30 minutos y luego se descarta el líquido resultante por el desagüe con abundante agua. Las agujas se deben introducir en el recipiente sin re-enfundar; las fundas de protección se arrojan en los recipientes de residuos ordinarios siempre y cuando no estén contaminadas de sangre o fluidos corporales. Después del proceso de desinfección, se sella el recipiente y se introduce en una bolsa roja rotulada como material cortopunzante.

Con los residuos de tipo químico se deben usar contenedores de polietileno de alta densidad, el cual es resistente a la mayoría de las sustancias químicas. El volumen del recipiente depende de la cantidad de residuo que se genere. Se recomienda utilizar volúmenes pequeños no mayores a 4 litros, para facilitar el transporte de estos. El envase debe estar en perfectas condiciones, es decir

PROTEOMA MITOCONDRIAL DE *Ae. aegypti*

no debe presentar roturas o deformaciones. Los residuos líquidos se disponen en recipientes de boca angosta y los sólidos en recipientes de boca ancha. Se debe dejar aproximadamente el 10-20 % del contenedor o envase sin llenar, especialmente si las sustancias que conforman el residuo tienen una presión de vapor alta. Sólo residuos químicamente compatibles pueden ser acumulados en cada recipiente, el cual debe estar correctamente etiquetado.

Todos los envases o contenedores donde se almacenen residuos peligrosos deben tener la etiqueta que permita identificarlos y reconocer la naturaleza del peligro que representan y de esta manera alertar a las personas involucradas en su manipulación. Por ello, en las Figuras 2 y 3 se ilustran las etiquetas empleadas para la identificación de residuos, teniendo en cuenta la clasificación de los residuos peligrosos establecida en el decreto 2676 de 2000.

Figura 1

Etiqueta Residuos Infecciosos, Riesgo Biológico y biosanitarios.

Etiqueta de Residuo de Riesgo Biológico. Incluye el logo de la Universidad Industrial de Santander, el título 'RESIDUO DE RIESGO BIOLÓGICO' con el símbolo de bioseguridad, y el lema 'Manejarse con precaución'. El formulario solicita: GENERADOR, RESPONSABLE, FECHA DE INICIO DE RECOLECCIÓN, CLASIFICACIÓN (BIOSANITARIO, CORTOPUNZANTE, ANATOMOPATOLÓGICO, ANIMALES) y GENERADO EN ACTIVIDADES DE (DOCENCIA, INVESTIGACIÓN, EXTENSIÓN).

Figura 2

Etiqueta Residuos Químicos.

Etiqueta de Residuo de Riesgo Químico. Incluye el logo de la Universidad Industrial de Santander, el título 'RESIDUOS DE RIESGO QUÍMICO' con el símbolo de riesgo químico, y el lema 'MANEJARSE CON PRECAUCIÓN'. El formulario solicita: GENERADOR, RESPONSABLE, FECHA DE INICIO DE RECOLECCIÓN, FECHA DE ENTREGA DEL RESIDUO, COMPOSICIÓN DEL RESIDUO (NOMBRES DE LAS SUSTANCIAS), CLASIFICACIÓN SEGÚN PELIGROSIDAD (CORROSIVO, IRITANTE, TÓXICO, INFLAMABLE, REACTIVO, INCOMPATIBLE, EXPLOSIVO, OTROS) y GENERADO EN ACTIVIDADES DE (DOCENCIA, INVESTIGACIÓN, EXTENSIÓN).

Fase de Tratamiento

El tratamiento hace referencia a los procesos aplicables a los residuos con el fin de reducir o anular las características que le confieren peligrosidad para la salud humana y el ambiente, así como también para facilitar el transporte, almacenamiento, disposición final y aprovechamiento de las sustancias generadas. En el caso de los residuos generados a lo largo del desarrollo del proyecto, no se les realiza ningún tipo de proceso o procedimiento de tratamiento.

Disposición final

La disposición final es el proceso de aislar y confinar los residuos o desechos peligrosos, en especial los no aprovechables, en lugares especialmente seleccionados, diseñados y debidamente autorizados para evitar, la contaminación y los daños o riesgos a la salud humana y al medio ambiente. Dicha disposición será realizada mediante un gestor externo, en nuestro caso con la empresa SANDESOL S.A. E.S.P.

4.4 ACTA DE APROBACIÓN COMITÉ DE ÉTICA



4110

Bucaramanga,

Estudiante

RUTH MARIELA CASTILLO MORALES

Investigadora principal

Profesores

JONNY EDWARD DUQUE LUNA

STELIA CAROLINA MÉNDEZ

Directores trabajo de investigación

Doctorado en Ciencias Biomédicas

Escuela de Medicina

Facultad de Salud

Universidad Industrial de Santander

Presente

Asunto: Aval Comité de Ética proyecto, "Expresión génica mitocondrial de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae)".

Cordial Saludo. El Comité de Ética en Investigación Científica de la Universidad Industrial de Santander (CEINCI-UIS) en reunión realizada del día 23 de noviembre de 2018, según consta en el Acta N° 21, evaluó los ajustes realizados al proyecto del asunto y al respecto conceptúa:

En consideración a que el proyecto cumple con todos los requerimientos, el Comité de Ética acordó, por consenso, **APROBAR** el documento digital en su última versión.

De igual manera, aplicar según corresponda a la investigación, la normatividad del Sistema de Gestión Integral de la Universidad, que está disponible en el enlace: <https://www.uis.edu.co/intranet/calidad/calidad.jsp>, especialmente lo relacionado con el Manual de Gestión Integrado.

Así mismo, realizar los trámites y/o permisos necesarios para la recolección de los microorganismos o muestras requeridas para la investigación.

Finalmente, se solicita remitir al correo del Comité la información correspondiente cuando ocurra una de las circunstancias siguientes:

- Reporte de mala práctica científica por parte de cualquier miembro del equipo investigador.
- Notificación previa de las modificaciones realizadas al protocolo.
- Reporte de cualquier eventualidad que usted considera deba conocer el CEINCI-UIS.



4110

- Informe de avance sobre los aspectos éticos según guía e instructivo anexo. Este informe debe enviarse a la mitad del desarrollo de la investigación y al finalizar la misma según el cronograma establecido en el Formato FIN 65.
- El informe debe ser enviado al correo: ceinci.seguimientos@uis.edu.co

En el momento del seguimiento se verificará el cumplimiento de las consideraciones éticas.

En nombre del CEINCI-UIS le ofrecemos el apoyo que usted considere necesario, para la aplicación y salvaguarda de los asuntos éticos durante la investigación.

Atentamente.

LAURA A. RODRÍGUEZ VILLAMIZAR
Presidenta (e)
CEINCI- UIS

FRANCISCO ESPINEL CORREAL
Secretario Técnico Científico
CEINCI- UIS

Copia: Profesor Fernando Rodríguez Sanabria, Coordinador del Doctorado en Ciencias Biomédicas.
Archivo Comité de Ética en Investigación Científica.

5. DIVULGACIÓN DE LOS RESULTADOS

5.1 PARTICIPACIÓN EN EVENTOS ACADÉMICOS

- AMCA 85st Annual Meeting of mosquito. The American Mosquito Control Association. Orlando, Florida, USA. Febrero 25 a marzo 01 de 2019. Presentación oral. Mitochondrial respiratory parameters in *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae) larvae.

- LatinXChem. Congreso de Química en Twitter. Septiembre 07 de 2020. Presentación tipo poster. Mitochondrial respiratory parameters of *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae) permeabilized larvae.

- LatinXChem. Congreso de Química en Twitter. Septiembre 07 de 2020. Presentación tipo poster. Mitochondrial respiration of *Aedes aegypti* pupae.

-48 Congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología- SOCOLEN. Septiembre 01-03 de 2021 Virtual. Presentación oral. Mitoproteoma de los estados juveniles y adultos de *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae).

-34 Congreso Latinoamericano de Química CLAQ 2020. Octubre 11-15 de 2021 Cartagena, Colombia. Presentación oral. Bioenergetica mitocondrial en estadíos juveniles y adulto de *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae).

5.2 PUBLICACIONES

- Ruth M. Castillo Morales, Jonny E. Duque. Dissuasive and biocidal activity of *Salvia officinalis* (Lamiaceae) with induction of malformations in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). 2020. Revista Colombiana de Entomología, 46 (2): e7683 • <https://doi.org/10.25100/socolen.v46i2.7683>
- Ruth Mariela Castillo-Morales, Aurora L. Carreño Otero, Stelia Carolina Mendez-Sanchez, Mario Antônio Navarro Da Silva, Elena E. Stashenko, Jonny E. Duque. 2019. Mitochondrial affectation, DNA damage and AChE inhibition induced by *Salvia officinalis* essential oil on *Aedes aegypti* larvae. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C Toxicology & Pharmacology. Volume 221, July 2019, Pages 29-37. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2019.03.006> ISSN: 1532-0456.
- Ruth Mariela Castillo-Morales, Diana Lizeth Urbina-Duitama, Stelia Carolina Mendez-Sanchez, Jonny E. Duque. Perfil bioenergético mitocondrial de *Aedes aegypti* a lo largo de su ciclo de vida. En elaboración.
- Ruth Mariela Castillo-Morales, Diana Lizeth Urbina-Duitama, Stelia Carolina Mendez-Sanchez, Jonny E. Duque. Mitoproteoma de los estados juveniles y adultos de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). En elaboración.