

Estudio Bioenergético y Análisis Proteómico de Mitocondrias de Larvas (14) de *aedes aegypti* (linnaeus, 1762) (diptera: culicidae).

Diana Lizeth Urbina Duitama

Trabajo de grado para optar el título de Química

Director

Stelia Carolina Méndez Sánchez

Doctora en Ciencias Bioquímicas

Codirectores

Jonny Edward Duque Luna

Doctor en Ciencias Biológicas Enfoque en Entomología Médica

Ruth Mariela Castillo Morales

Magíster en Ciencias Básicas Biomédicas

Universidad Industrial de Santander

Facultad de ciencias

Escuela de química

Bucaramanga

2018

### **Agradecimientos**

Podría agradecer únicamente a Dios, pues el dispuso la idea de este trabajo de grado y su infinita misericordia me brindó las capacidades y herramientas necesarias para ejecutarlo. Además, me rodeó de un equipo de trabajo maravilloso, a quienes debo dar gracias también pues fueron reflejo de las bondades de Dios, inicio por agradecer a mis directores Stelia Méndez y Jonny Duque, quienes no solo guiaron sabiamente este trabajo, sino fueron ejemplo de familia.

A mi codirectora Ruth Mariela Castillo por su paciencia en el proceso de enseñanza, sus correcciones que realmente construyen estudiantes y el amor con el que realiza su trabajo.

A los demás integrantes del laboratorio de entomología médica y GIBIM, quienes me compartieron sus conocimientos, necesarios para el desarrollo del trabajo.

Especialmente a mi familia, quienes me han brindado lo mejor para construir bases sólidas sobre las cuales edifico mi vida. Agradezco su ejemplo de persistencia, pues sin esta cualidad muy difícilmente se lleva a cabo cualquier proyecto en la vida.

A Andrés Felipe Villamizar, en quien puedo ver claramente el amor de Dios, un amor sin medida y comprometido, el cual me acompañó para motivarme durante esta etapa de mi vida.

A mis amigos, algunos quienes me acompañaron y apoyaron durante todo este proceso, otros quienes me vieron iniciar este camino, pero no terminarlo, y otros solo estuvieron junto a mi, en la recta final, pero todos realmente valiosos, Nathalia Martinez, Alejandra Payán, Silvia Pedraza, Juan David Sánchez y Laura Díaz.

**Tabla de contenido**

	Pág.
Introducción .....	12
1. Objetivos .....	14
1.1 Objetivo General .....	14
1.2 Objetivos Específicos.....	14
2. Marco referencial .....	15
2.1 Mitochondria.....	15
2.1.1 Cadena respiratoria y fosforilación oxidativa.....	16
2.1.1.2 Complejo II.....	18
2.1.1.3 Complejo III.....	19
2.1.1.4 Complejo IV.....	20
2.1.1.5 Complejo V.....	20
2.1.2 Medición de la respiración mitocondrial.....	21
2.2. Estudios mitocondriales en <i>Aedes aegypti</i> .....	26
2.2.1. <i>Aedes aegypti</i> .....	26
2.2.2 Estudios mitocondriales en <i>Aedes aegypti</i> .....	27
2.2.3. Proteómica mitocondrial en <i>Aedes aegypti</i> .....	28

3. Metodología .....	29
3.1 Obtención de larvas (L4) de <i>Aedes aegypti</i> .....	29
3.2 Aislamiento de mitocondrias de larvas (L4) de <i>Aedes aegypti</i> . ....	30
3.3 Cuantificación de proteínas totales. ....	31
3.4 Medición de coeficiente de control respiratorio de mitocondrias aisladas de larvas (L4).....	31
3.5 Medición de coeficiente de control respiratorio de larvas permeabilizadas. ....	31
3.6 Cuantificación del coeficiente de control respiratorio .....	32
3.7 Análisis estadístico del CCR larval y mitocondrial. ....	32
3.8 Aislamiento de proteínas solubles y de membrana de mitocondrias de larvas (L4) .....	33
3.9 Separación de proteínas mitocondriales por SDS-PAGE. ....	33
3.10 Preparación de la muestra para análisis por espectrometría de masas.....	34
3.11 Análisis de los péptidos por espectrometría de masas MALDI-TOF.....	35
4. Resultados .....	35
4.1 Aislamiento de mitocondrias de larvas (L4) de <i>Aedes aegypti</i> .....	35
4.2 Cuantificación del CCR de mitocondrias aisladas y larvas permeabilizadas. ....	36
4.3 Obtención del perfil proteico de mitocondrias aisladas de larvas (L4) .....	39
4.4 Identificación de las proteínas mitocondriales.....	41
5. Discusión.....	41
5.1 Aislamiento de mitocondrias. ....	41
5.2 Cuantificación del CCR de mitocondrias aisladas y larvas permeabilizadas. ....	45
5.3 Obtención del perfil proteico de mitocondrias aisladas de larvas (L4). ....	47

6. Conclusiones .....	51
7. Recomendaciones .....	52
Referencias bibliográficas.....	53

### Lista de tablas

Tabla 1. Parámetros de consumo de oxígeno de mitocondrias aisladas de larvas (L4) de <i>Ae. aegypti</i> , empleando glutamato y prolina piruvato como sustratos oxidables. ....	37
Tabla 2. Parámetros de consumo de oxígeno de 1 y 5 larvas (L4) de <i>Ae. aegypti</i> , empleando glutamato y prolina piruvato como sustratos oxidables. Los valores de los estados respiratorios se expresan en pmol de oxígeno/(s*mL). *Diferencias estadísticas significativas entre 1 y 5 larvas para cada sustrato empleado en cada uno de sus estados respiratorios y CCR. <sup>a,b,c,d,e,f</sup> Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre sustratos para cada medición (1 y 5 larvas) en cada uno de sus estados respiratorios y CCR. ....	37
Tabla 3. Pesos aproximados en KDa de proteínas solubles y de membrana de mitocondrias de larvas (L4) de <i>Ae. aegypti</i> . ....	40
Tabla 4. Resultados de la identificación de las proteínas mitocondriales de larvas L4 de <i>Ae. aegypti</i> , de lo cual, cada banda analizada se identificó con el nombre de la proteína, el código de la base de datos SwissProt, el organismo en el que se reporta dicha proteína, el peso molecular (KDa) y el puntaje de Score (Coincidencia) entre los datos ingresados y la base de datos. ....	41
Tabla 5. Condiciones de los protocolos para el aislamiento de mitocondrias de larvas de <i>Ae. aegypti</i> empleados en el laboratorio de entomología médica y GIBIM, y los protocolos reportados en literatura para el aislamiento de mitocondrias de adultos de <i>Ae. aegypti</i> (músculo de vuelo) y <i>D. melanogaster</i> . ....	43
Tabla 6. Comparación de los valores de CCR obtenidos a partir de mitocondrias aisladas de larvas (L4) y de musculo del vuelo (Goncalves et al., 2009) de <i>Ae. aegypti</i> hembra. ....	46

**Lista de figuras**

Figura 1. Cadena respiratoria mitocondrial, ilustrando los complejos I, II, III, IV y V. ....	16
Figura 2. Ruta de oxidación del glutamato. Fuente: Modificado de (Lehninger & Cox, 2006)...	22
Figura 3. Ruta de oxidación del piruvato. Fuente: Modificado de (Lehninger & Cox, 2006) .....	23
Figura 4. Vista transversal del electrodo de Clark. Fuente: Autor.....	24
Figura 5. Grafica de medición de control respiratorio en una suspensión de mitocondrias integras. Fuente: modificado de (González-Calvar & Corini, 2004).....	25
Figura 6. Bandas de proteínas mitocondriales de larvas de <i>Ae. aegypti</i> en SDS-PAGUE.....	39
Figura 7. Subunidades del dominio F1 de la ATP sintasa. Fuente: modificado de (Lehninger & Cox, 2006).....	49

### Resumen

**TÍTULO:** ESTUDIO BIOENERGÉTICO Y ANÁLISIS PROTEÓMICO DE MITOCONDRIAS DE LARVAS (L4) DE *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (DIPTERA: CULICIDAE)\*

**AUTOR:** Diana Lizeth Urbina Duitama\*\*

**PALABRAS CLAVE:** Cadena respiratoria, fosforilación oxidativa, control respiratorio, proteínas mitocondriales, SDS-PAGUE.

### DESCRIPCIÓN:

La mitocondria es una organela implicada en la producción de ATP mediante la fosforilación oxidativa, la cual está acoplada a la actividad de la cadena respiratoria. El estudio de los parámetros de respiración mitocondrial en insectos de importancia médica ofrece información importante para la comprensión de los diferentes procesos fundamentales del metabolismo energético de insectos vectores. El objetivo principal de este trabajo fue analizar la bioenergética mitocondrial y el proteoma de mitocondrias de larvas (L4) de *Aedes aegypti*. Se estandarizó un protocolo de aislamiento de mitocondrias de larvas L4, para la posterior medición de la respiración mitocondrial empleando un oxígrafo de alta resolución (Oroboros) en presencia de sustratos oxidables, fosfato inorgánico y ADP. Los mismos parámetros de medición de consumo de oxígeno fueron considerados en larvas permeabilizadas. Adicionalmente, se realizó la separación de proteínas mitocondriales (solubles y de membrana) mediante SDS-PAGUE para su posterior análisis por espectrometría de masas por MALDI-TOF y el software Mascot 2.1. Para mitocondrias aisladas el mayor valor de Coeficiente de control respiratorio (CCR) se obtuvo empleando prolina + piruvato como sustrato ( $1.14 \pm 0.04$ ), con un CCR inducido por oligomicina de  $1.35 \pm 0.10$ . Para larvas permeabilizadas se obtuvo un valor de CCR entre 1.2 a 1.3. En el análisis de los geles SDS se logró diferenciar un total de 6 bandas de proteínas solubles y 21 de proteínas de membrana, de las cuales se identificaron 6. Finalmente, de la medición de consumo de oxígeno, tanto en mitocondrias aisladas, como en larvas permeabilizadas, se obtuvieron valores cercanos, por ello se pudo afirmar que es posible la medición del CCR en larvas permeabilizadas, además que de esta manera resulta más práctica la medición en términos experimentales. Fueron identificadas 6 proteínas mitocondriales: Piruvato deshidrogenasa quinasa, PP2C-CG9801, ATP sintasa (sub  $\alpha$  y  $\gamma$ ), succinil-CoA sintetasa y chaperona HSP60. Esta información representa un conocimiento de base de las proteínas mitocondriales de larvas (L4) de *Ae. aegypti*.

---

\*Trabajo de grado

\*\*Facultad de Ciencias, Escuela de Química, Directora: Dra. Stelia Carolina Méndez Sánchez, Co-directores: Dr. Jonny Edward Duque Luna, MSc. Ruth Mariela Castillo Morales.

### Abstract

**TITLE:** BIOENERGETIC STUDY AND PROTEOMIC ANALYSIS OF MITOCHONDRIAS OF LARVAE (L4) OF *Aedes aegypti*

**AUTHOR:** Diana Lizeth Urbina Duitama

**KEY WORDS:** Respiratory chain, oxidative phosphorylation, respiratory control, mitochondrial proteins, SDS-PAGE.

### DESCRIPTION:

The mitochondria is an organelle involved in the production of ATP through oxidative phosphorylation, which is coupled to the activity of the respiratory chain. The study of parameters of mitochondrial respiration in insects of medical importance offers important information for the understanding of the different fundamental processes of the energy metabolism of insect vectors. The main objective of this work was to analyze the mitochondrial bioenergetics and mitochondrial proteome of larvae (L4) of *Aedes aegypti*. A protocol for the isolation of mitochondria from L4 larvae was standardized for the subsequent measurement of mitochondrial respiration using a high resolution respirometer (Oroboros) in the presence of oxidizable substrates, inorganic phosphate and ADP. The same measurement parameters of oxygen consumption were considered in permeabilized larvae. In addition, mitochondrial proteins (soluble and membrane proteins) were separated by SDS-PAGE for further analysis by mass spectrometry by MALDI-TOF and Mascot 2.1 software. For isolated mitochondria, the highest value of the respiratory control coefficient (RCC) was obtained using proline + pyruvate as substrate ( $1.14 \pm 0.04$ ), with an induced CCR status of  $1.35 \pm 0.10$ . For permeabilized larvae, a CCR value between 1.2 and 1.3 was obtained. In the analysis of the SDS gels, a total of 6 bands of soluble proteins and 21 of membrane proteins could be differentiated, of which 6. Finally, the measurement of oxygen consumption in both isolated mitochondria and larvae was identified. permeabilized, close values were obtained, for that reason it was possible to affirm that it is possible the measurement of the CCR in permeabilized larvae, besides that in this way the measurement in experimental terms is more practical. Six mitochondrial proteins were identified: Pyruvate dehydrogenase kinase, PP2C-CG9801, ATP synthase (sub  $\alpha$  and  $\gamma$ ), succinyl-CoA synthetase and chaperone HSP60. This information represents a basic knowledge of the larval mitochondrial proteins (L4) of *Ae. aegypti*.

---

\*Bachelor Thesis

\*\*Facultad de Ciencias, Escuela de Química, Directora: Dra. Stelia Carolina Méndez Sánchez, Co-directores: Dr. Jonny Edward Duque Luna, MSc. Ruth Mariela Castillo Morales.

## Introducción

Gran parte de la energía producida a nivel celular es proporcionada por la mitocondria, una organela compuesta por dos membranas, una externa que la recubre completamente y una interna que contiene la matriz mitocondrial. En la membrana interna se encuentran una serie de complejos proteicos que conforman la cadena transportadora de electrones. La importancia de esta cadena reside en la generación de un potencial electroquímico transmembrana que promueve la síntesis de ATP a través de la fosforilación oxidativa (Lehninger & Cox, 2006). Dada la importancia de la mitocondria para el funcionamiento celular de la mayoría de seres vivos, el estudio de su función se ha convertido en el foco de investigaciones en ciencias básicas (Friedman & Nunnari, 2014; Picard, Taivassalo, Gousspillou, & Hepple, 2011).

Uno de los principales desafíos para estudiar la respiración mitocondrial, es la heterogeneidad de los protocolos de aislamiento, debido a que no es posible emplear el mismo método para diferentes tipos de tejidos (blandos o duros) en diferentes organismos. La estandarización de procedimientos que permiten aislamientos selectivos, se han desarrollado junto con equipos que poseen la capacidad de medir con alta sensibilidad la respiración mitocondrial, a esto se le conoce como respirometría de alta resolución (Gnaiger, 2008; Picard, Taivassalo, Ritchie, et al., 2011). El uso de estas tecnologías ha impulsado el estudio de los parámetros de respiración mitocondrial en diferentes modelos biológicos, incluyendo insectos de importancia médica. Al respecto, en la literatura se reporta solo una publicación que describe la respiración de mitocondrias de músculo de vuelo de adultos de *Aedes aegypti*, principal transmisor de enfermedades como Dengue, Zika y Chikunguya. El objetivo de este estudio es conocer la fisiología de la mitocondria y su rol en la capacidad de dispersión del vector, mediante la

medición del coeficiente de control respiratorio (CCR), un parámetro que indica el acoplamiento entre la respiración y la fosforilación oxidativa (Gonçalves et al., 2009). El valor que determina el acoplamiento se ha descrito para mitocondrias de tejidos de mamíferos, para lo cual el CCR debe ser  $\geq 3$ , sin embargo, en el artículo de mitocondrias de músculo de vuelo de *Ae. aegypti*, se reportaron  $CCR < 3$  y los autores no asumen el resultado como un desacoplamiento, lo que puede indicar que el valor de este parámetro no está estrictamente estandarizado para *Ae. aegypti*.

Desde las ciencias básicas resulta relevante describir la composición proteica de la mitocondria. Parte del proteoma mitocondrial en artrópodos se ha descrito en *Drosophila melanogaster*, un organismo de referencia de estudios para diferentes aspectos de la biología molecular, celular y bioquímica (Alonso, Rodriguez, Baena-López, & Santarén, 2005). Sin embargo, la información de *D. melanogaster* no siempre puede ser extrapolada a otros organismos, debido a las capacidades de adaptación que tiene esta organela, las cuales pueden generar cambios significativos en la fisiología mitocondrial de otros organismos (Scaraffia & Wells, 2003)

Considerando que hasta el momento no existen reportes de la respiración de mitocondrias íntegras, ni del proteoma mitocondrial en etapas juveniles del zancudo *Ae. aegypti*, el Laboratorio de Entomología Medica adscrito al Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales (CINTROP) en conjunto con el grupo de investigación en bioquímica y microbiología (GIBIM), se han interesado en conocer el funcionamiento de mitocondrias de larvas (L4) de *Ae. aegypti*, mediante la evaluación de su respiración y la descripción de su proteoma mitocondrial.

## 1. Objetivos

### 1.1 Objetivo General

Analizar la bioenergética mitocondrial y el proteoma de mitocondrias de larvas (L4) de *Aedes aegypti*.

### 1.2 Objetivos Específicos

- Estandarizar un protocolo de aislamiento de mitocondrias íntegras de larvas (L4) de *Aedes aegypti*.
- Cuantificar el coeficiente de respiración *in vivo* y de mitocondrias aisladas de larvas (L4) en *Aedes aegypti*.
- Obtener el perfil proteico bidimensional de proteínas solubles y de membrana de mitocondrias de larvas (L4) de *Aedes aegypti*.
- Identificar las proteínas obtenidas en los perfiles proteicos de mitocondrias de larvas (L4) de *Aedes aegypti*.

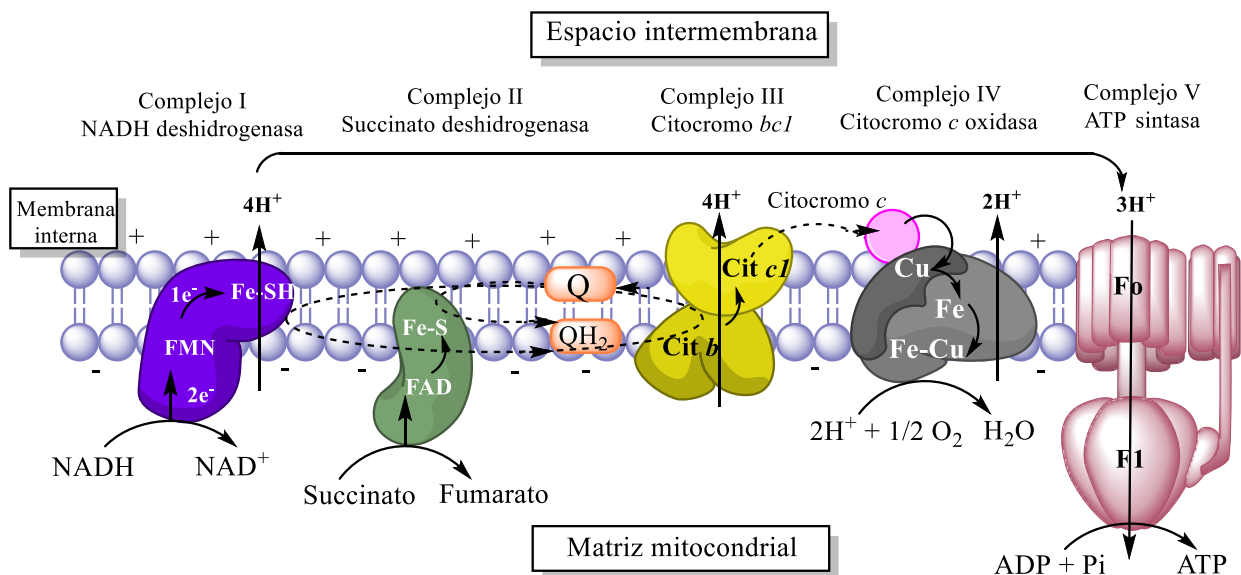
## 2. Marco referencial

### 2.1 Mitocondria

La mitocondria (del griego *mitos*: hilo y *chondros*: gránulo) es una organela celular que puede tener diferentes formas como la cilíndrica, esférica o filamentosa. Morfológicamente está compuesta por dos compartimientos claramente definidos (matriz y el espacio intermembrana) delimitados por la membrana interna y externa (Ernster & Schatz, 1981). Cada membrana está compuesta por una bicapa de varios tipos de fosfolípidos incluyendo fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, cardiolipina y ácido fosfatídico. Sin embargo, la membrana interna tiene una permeabilidad mucho más selectiva comparada con la externa, debido a cambios en la composición de la misma (Bruce et al., 2007; Lehninger & Cox, 2006).

La membrana externa está compuesta en un 60-70% por proteínas integrales llamadas porinas. Estas se caracterizan por poseer una estructura de barril  $\beta$  que permiten el paso de moléculas con una masa inferior a 1500 Da. Adicionalmente, esta membrana contiene un 30-40% de fosfolípidos, como fosfatidilcolina. Por el contrario, la membrana interna contiene una mayor proporción de cardiolipinas, las cuales le confieren impermeabilidad a la mayoría de moléculas. Por ello, la membrana interna posee transportadores específicos que permiten el paso de las sustancias necesarias para llevar a cabo el ciclo del ácido cítrico, la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos y la oxidación de los aminoácidos en la matriz mitocondrial. Además, la membrana interna contiene un 80% de proteínas, representadas en complejos enzimáticos implicados en la respiración y la fosforilación oxidativa (Basu Ball, Neff, & Gohil, 2018; Bruce et al., 2007; Devlin, 2004; Lehninger & Cox, 2006).

**2.1.1 Cadena respiratoria y fosforilación oxidativa.** La cadena respiratoria consiste en un sistema de transportadores electrónicos situados en la membrana interna mitocondrial, compuestos principalmente por complejos proteicos con dominios transmembrana. En este sistema se genera una cascada de reacciones químicas conocida como fosforilación oxidativa, donde los electrones provenientes de diferentes rutas metabólicas son transportados a través de los diferentes complejos, generando un gradiente de protones que se usa como fuerza motriz para la síntesis de ATP y la reducción de oxígeno molecular en agua (Lehninger & Cox, 2006).



*Figura 1.* Cadena respiratoria mitocondrial, ilustrando los complejos I, II, III, IV y V. Fuente: modificado de (Lehninger & Cox, 2006).

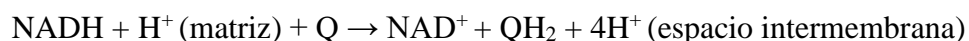
El ingreso de electrones a la cadena respiratoria se da principalmente a través de la oxidación de NADH y succinato quienes ceden sus electrones al complejo I y II respectivamente. Estos electrones se transfieren a través de cada uno de los complejos hasta el aceptor final, el oxígeno, quien se reduce a agua (Figura 1). Simultáneamente, los complejos I, III y IV, bombean protones

hacia el espacio intermembrana generando un gradiente electroquímico que proporciona la energía necesaria para la fosforilación oxidativa, proceso donde se sintetiza ATP (Bothman & Mayer, 2016; Lehninger & Cox, 2006).

**2.1.1.1 Complejo I.** El complejo I, también llamado NADH ubiquinona oxidoreductasa o NADH deshidrogenasa, es el complejo más grande de la cadena transportadora de electrones. Compuesto de 42 subunidades, posee un dominio hidrofílico dirigido hacia la matriz mitocondrial y uno hidrofóbico que se extiende a través de la membrana interna (Hassinen, 2014; Lehninger & Cox, 2006).

La principal función de este complejo es oxidar el NADH proveniente de los procesos de glucólisis, oxidación de ácidos grasos y ciclo del ácido cítrico, y transferir los electrones a la ubiquinona (Q), una coenzima transportadora de electrones liposoluble. Este proceso inicia con la transferencia de dos electrones y dos protones desde el NADH a la riboflavina 5-fosfato también llamada flavina mononucleótido (FMN). Los electrones son transportados a través de una secuencia de nueve centros de hierro-azufre, hasta llegar a la ubiquinona (Q) quien se reduce a ubiquinol (QH<sub>2</sub>), desplazándose hasta el complejo III. Durante el proceso de transferencia de electrones se generan cambios conformacionales que provocan el desplazamiento de las hélices en el espacio transmembrana, liberando la energía necesaria para el transporte de 4 H<sup>+</sup> desde la matriz hacia el espacio intermembrana. (Devlin, 2004; Hassinen, 2014).

Los procesos de oxidación del NADH, la reducción de la ubiquinona y el bombeo de protones en el complejo I, se condensan en la siguiente reacción:

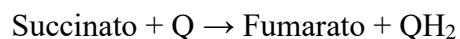


La actividad de este complejo puede afectarse en presencia de algunas sustancias químicas como, rotenona, amital y pierdicina A. Estas dos últimas moléculas presentan una inhibición competitiva, al unirse directamente en el mismo sitio de unión del sustrato; mientras que la rotenona lo hace de manera no competitiva, al unirse a uno de los centros Fe-S (Devlin, 2004; González-Calvar & Corini, 2004).

**2.1.1.2 Complejo II.** El complejo II, también llamado succinato ubiquinona oxidorreductasa o succinato deshidrogenasa, no solo hace parte de la cadena respiratoria mitocondrial sino además es un complejo enzimático del ciclo del ácido cítrico. Posee cuatro subunidades diferentes, dos de ellas (A y B) se extienden hacia la matriz mitocondrial y contienen centros de hierro-azufre (Fe-S). Mientras que las subunidades C (SdhC) y D (SdhD) son proteínas que contienen un grupo hemo y un sitio de unión para la ubiquinona (el aceptor final de los electrones), el cual se reduce a ubiquinol (Lehninger & Cox, 2006; Rich & Maréchal, 2010).

La transferencia de electrones a través de este complejo inicia con la oxidación del succinato a fumarato en el ciclo del ácido cítrico en donde del cofactor FAD, unido covalentemente al complejo II, se reduce a FADH<sub>2</sub>. Posteriormente, los electrones son transferidos a lo largo de los centros Fe-S hasta llegar al sitio de unión con la ubiquinona, quien se reduce a ubiquinol, mediante la captación de protones desde la matriz mitocondrial (Rich & Maréchal, 2010).

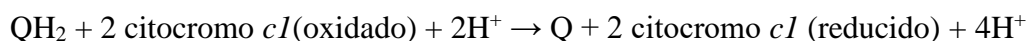
La reacción global que cataliza el complejo II se puede resumir de la siguiente manera:



Un inhibidor competitivo de la succinato deshidrogenasa es el malonato, el cual se une al sitio de unión del succinato en el complejo II, impidiendo la transferencia de electrones (González-Calvar & Corini, 2004)

**2.1.1.3 Complejo III.** El complejo III, también denominado citocromo bc1 o ubiquinona citocromo-c oxidoreductasa, está compuesto por 11 a 12 subunidades, encargadas de acoplar la transferencia de electrones provenientes del ubiquinol (QH<sub>2</sub>) al citocromo *c*, al tiempo que bombea 4H<sup>+</sup> por cada 2e<sup>-</sup> transferidos (Hassinen, 2014). Este mecanismo de bombeo se denomina ciclo Q y consiste en la oxidación del ubiquinol al tiempo que se reducen dos moléculas de citocromo *c*. El citocromo *c*, es una proteína monomérica presente en el espacio intermembrana con un grupo hemo en su centro. Su principal función es transferir los electrones a lo largo de la superficie de la membrana interna, desplazándose hasta interactuar con una subunidad del complejo IV (Devlin, 2004; Lehninger & Cox, 2006).

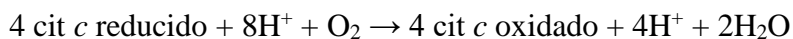
El proceso que se efectúa en el complejo III puede condensarse en la siguiente reacción:



Algunas sustancias químicas, como la antimicina A, se une al sitio Q<sub>i</sub> del citocromo *c* inhibiendo la oxidación de la ubiquinona y como consecuencia se impide la generación del gradiente de protones a través de la membrana (González-Calvar & Corini, 2004).

**2.1.1.4 Complejo IV.** El complejo IV o citocromo c oxidasa, está compuesto por 13 subunidades proteicas, de las cuales 2 son importantes componentes redox: la subunidad 1 que contiene un centro hemo y la subunidad 2 que se encuentra en la superficie externa de la membrana interna y posee un centro de cobre (Hassinen, 2014).

La transferencia electrónica ocurre desde el citocromo *c* reducido proveniente del complejo III, al centro de cobre de la subunidad 2, donde los electrones son transferidos al grupo hemo de la subunidad 1, luego pasan al centro cobre-hierro, y finalmente son cedidos al aceptor final, el oxígeno, formando un derivado peroxi ( $O_2^{2-}$ ). Este intermediario se mantiene unido al centro hierro-azufre hasta que se transfieren otros 2 electrones y conjuntamente se captan 4 protones desde la matriz mitocondrial para formar agua (Devlin, 2004; Lehninger & Cox, 2006). La reacción global se puede describir así:



El flujo de electrones a través de este complejo se puede bloquear en presencia de cianuro ( $CN^-$ ), monóxido de carbono (CO) y azida ( $N_3^-$ ). El  $CN^-$  y la  $N_3^-$  reaccionan con el centro hemo, mientras que el CO se une al centro cobre-hierro generando una inhibición competitiva con el  $O_2$  (González-Calvar & Corini, 2004).

**2.1.1.5 Complejo V.** El complejo V o ATP sintasa, se encarga de sintetizar ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico (Pi) aprovechando la energía del gradiente electroquímico. Su estructura contiene dos dominios  $F_1$  y  $F_0$  (Devlin, 2004; Hassinen, 2014).

El dominio  $F_1$  se localiza en la matriz mitocondrial y está compuesto por cinco subunidades ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ) de las cuales  $\alpha$  y  $\beta$  poseen los sitios de unión para el ATP y ADP. La reacción, ADP

+ Pi  $\rightleftharpoons$  ATP, se encuentra en equilibrio y su  $\Delta G$  es aproximadamente cero, indicando que la producción de ATP ocurre fácilmente sin necesitar el flujo de protones. Sin embargo, el ATP producido queda anclado a la superficie del complejo hasta su liberación por acción del paso de los protones (Hassinen, 2014).

El dominio  $F_0$ , está ubicado en la membrana interna y se caracteriza por su funcionamiento similar al de un rotor, el cual está acoplado con el flujo de protones desde el espacio intermembrana hacia la matriz. Esta acción de rotación genera un giro en la subunidad  $\gamma$ , produciendo un cambio conformacional en las demás subunidades del dominio  $F_1$  y de esta manera finalmente se libera la molécula de ATP (Devlin, 2004; Hassinen, 2014).

La ATP sintasa puede inhibirse en presencia de oligomicina, la cual actúa sobre el dominio  $F_0$  evitando la entrada de protones y la producción de ATP. Este proceso también se ve afectado cuando se inhiben los complejos de la cadena respiratoria, pues estos dos procesos se encuentran fuertemente acoplados (González-Calvar & Corini, 2004).

**2.1.2 Medición de la respiración mitocondrial.** El acoplamiento de la respiración y fosforilación oxidativa, se describe mediante un “control respiratorio” mitocondrial, en el cual los niveles de ADP regulan la fosforilación oxidativa. Cuando hay demanda de ATP, aumentan los niveles de ADP, incrementando la velocidad de la síntesis de ATP y en consecuencia aumenta el flujo de electrones a través de la cadena respiratoria y el consumo de oxígeno (González-Calvar & Corini, 2004).

Las técnicas para la medición del control respiratorio consisten en la suspensión de un extracto de mitocondrias aisladas en un tampón que contenga oxígeno disuelto, un sustrato

oxidable, Pi y ADP. Generalmente los sustratos oxidables empleados para medición de la respiración son glutamato, piruvato y succinato (González-Calvar & Corini, 2004).

Para dar inicio al transporte electrónico vía complejo I se emplean los sustratos glutamato y piruvato. El glutamato es transportado por el antiportador glutamato<sup>-</sup> /OH<sup>-</sup>, presente en la membrana interna, hacia la matriz mitocondria y allí se oxida por la acción de glutamato deshidrogenasa, entrando al ciclo del ácido cítrico como  $\alpha$ -cetoglutarato en el cual se producen moléculas de NADH, Figura 2 (Gnaiger, 2014). Este aminoácido no esencial en condiciones naturales, se sintetiza en la mayoría de organismos a partir de la transaminación del  $\alpha$ -cetoglutarato durante el catabolismo de los aminoácidos, aunque también puede formarse por la acción del glutamato deshidrogenasa que cataliza la formación de glutamato a partir del  $\alpha$ -cetoglutarato y el NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (Lehninger & Cox, 2006).

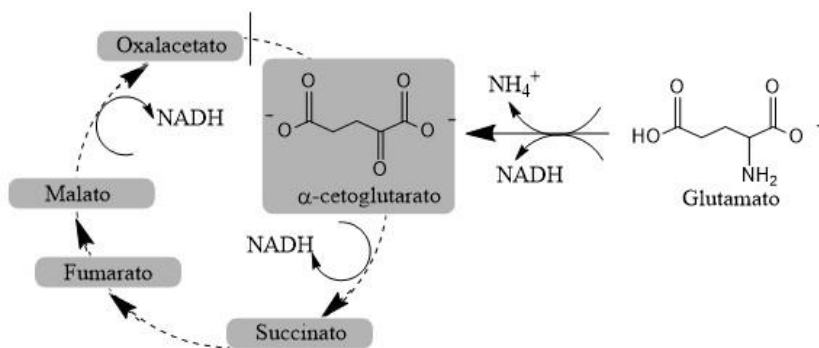


Figura 2. Ruta de oxidación del glutamato. Fuente: Modificado de (Lehninger & Cox, 2006)

El piruvato pasa a través de la membrana interna mitocondrial mediante un simportador de piruvato y protones. Una vez en la matriz, por acción del piruvato deshidrogenasa se produce acetyl-CoA, que mediante una condensación catalizada por la citrato sintasa produce citrato, ingresando este último al ciclo del ácido cítrico donde se producen moléculas de NADH que

ceden sus electrones al complejo I (Figura 3). Este proceso se da en todos los organismos vivos, debido a que el piruvato es producto de la glucólisis (Gnaiger, 2014).

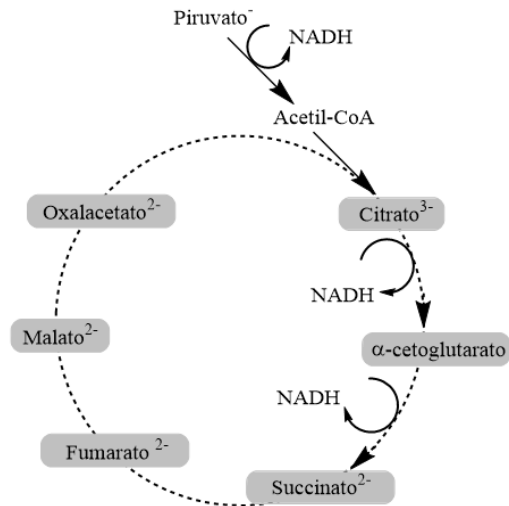


Figura 3. Ruta de oxidación del piruvato. Fuente: Modificado de (Lehninger & Cox, 2006)

Para la evaluación del transporte electrónico iniciando en el complejo II, promovido por succinato, se hace necesario inhibir el ingreso de electrones vía complejo I mediante la adición de rotenona. Bajo estas condiciones el succinato se oxida a fumarato por acción del FAD del complejo II (Gnaiger, 2014).

Bajo las condiciones adecuadas (presencia de sustrato oxidable, Pi y ADP) se activa la respiración y fosforilación oxidativa, evidenciándose una tasa de consumo de oxígeno en el medio. Esta variación en la concentración de oxígeno es posible medirla con un electrodo sensible al oxígeno, tipo Clark (González-Calvar & Corini, 2004; Lehninger & Cox, 2006).

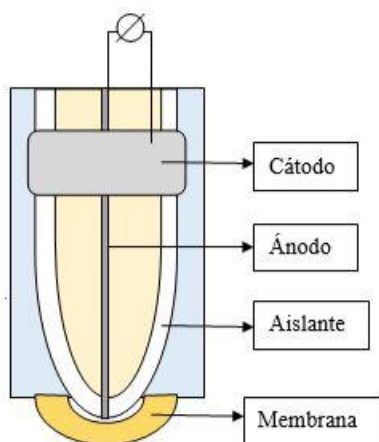


Figura 4. Vista transversal del electrodo de Clark. Fuente: Autor

El electrodo de Clark se compone de un cátodo de oro o platino y un ánodo de plata (Ag/AgCl), cubiertos por un material aislante excepto en uno de sus extremos, donde se ubica una membrana permeable al oxígeno, la cual entra en contacto directo con la muestra (Figura 4). El oxígeno disuelto se difunde a través de la membrana y se reduce a iones hidroxilo por acción del cátodo:  $O_2 + H_2O + 4e^- \rightarrow 4OH^-$ , mientras que el ánodo proporciona estos cuatro electrones a través de la oxidación:  $Ag \rightarrow Ag^+ + e^-$ . Estas reacciones producen una corriente eléctrica entre el cátodo y ánodo, cuya intensidad depende de la concentración de oxígeno en la muestra (Gnaiger, 2008).

Los cambios en la concentración de oxígeno en una suspensión mitocondrial en función de los niveles de ADP y del sustrato se visualizan en gráficas en función del tiempo (Figura 5) (Gnaiger, 2008). La visualización de estas graficas permite identificar diferentes pendientes a lo largo de la recta: **el estado 1**, correspondiente a un estado inicial donde las mitocondrias se encuentran suspendidas en un medio con presencia de oxígeno, pero baja concentración de sustrato oxidable y ADP. En ese estado la respiración se da mediante los sustratos endógenos

presentes en la mitocondria. **El estado 2**, en el cual aumenta levemente el consumo de oxígeno debido a la adición de un sustrato oxidable (glutamato, piruvato o succinato). **El estado 3**, correspondiente a la respiración con alta concentración de sustrato oxidable y ADP, por lo que la velocidad de fosforilación y el consumo de oxígeno aumentan. Y, por último, **el estado 4**, donde el sustrato y el ADP se van agotando, por lo que, la respiración desciende hasta llegar a un estado de reposo (Figura 5).

La relación entre la respiración del estado 3 y el estado 4 se denomina “coeficiente de control respiratorio (CCR)” el cual permite identificar el acoplamiento entre la respiración y la fosforilación oxidativa de las mitocondrias en estudio, para garantizar el acoplamiento el CCR debe ser  $\geq 3$ . Este valor se ha establecido para mitocondrias de tejidos de mamíferos, sin embargo es el valor generalmente aceptada para otras clases de organismos (Gnaiger, 2014; González-Calvar & Corini, 2004).

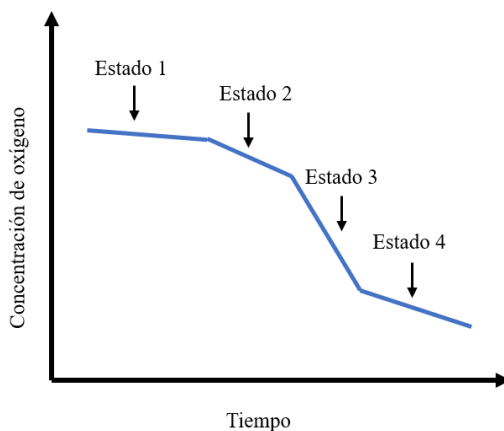


Figura 5. Gráfica de medición de control respiratorio en una suspensión de mitocondrias íntegras.

Fuente: modificado de González-Calvar & Corini (2004)

Teniendo en cuenta el fundamento de medición de concentración de oxígeno en un medio, se ha desarrollado la respirometría de alta resolución (O2k, OROBOROS INSTRUMENTS, Innsbruck, Austria), la cual ofrece un límite de detección de concentración de oxígeno de 0,005  $\mu\text{M}$  y una medición del flujo respiratorio con un límite de detección de 1  $\text{pmol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{cm}^{-3}$ , permitiendo hacer mediciones con una pequeña cantidad de muestra.

## **2.2. Estudios mitocondriales en *Aedes aegypti***

**2.2.1. *Aedes aegypti*.** El zancudo *Aedes aegypti* es el principal vector de los arbovirus causantes de Chikungunya, zika y dengue. Esta especie se encuentra distribuida en la mayoría de las regiones tropicales y subtropicales del mundo, de preferencia en áreas domésticas y peri-domésticas (Clemons et al., 2013; Garcia-rejon et al., 2008).

El ciclo de vida de *Ae. aegypti* se lleva a cabo entre 7 a 10 días. Una vez la hembra adulta pone los huevos en un ambiente acuático, estos eclosionan y emergen las larvas, las cuales se desarrollan en cuatro estadios (L1, L2, L3 y L4). La duración de los estadios larvales puede tardar entre 5 a 7 días dependiendo de condiciones como temperatura y disponibilidad de alimento. Posteriormente, los individuos pasan a estadio de pupa, la cual presenta una duración de 1 a 2 días, dando paso a la emergencia del zancudo adulto. Los zancudos macho se alimentan de néctar y exudados de las plantas, mientras que las hembras necesitan ingerir sangre para la formación adecuada de los huevos una vez fecundados. Una hembra adulta puede llegar a ovipositar entre 100 a 200 huevos por postura, y llegan a tener hasta 5 posturas durante su vida (Clemons et al., 2013; Patterson, Sammon, & Garg, 2016; World Health Organization, 2014).

**2.2.2 Estudios mitocondriales en *Aedes aegypti*.** Teniendo en cuenta el importante papel de la mitocondria en diferentes procesos fisiológicos y metabólicos a nivel celular, el estudio de su actividad fosforilativa ha generado un gran interés en varios grupos de organismos, entre ellos los insectos de importancia médica. El estudio de diferentes parámetros de la bioenergética mitocondrial ha permitido describir su actividad y relacionarla con diferentes condiciones de vida (Correa Soares, Gaviraghi, & Oliveira, 2015; Gonçalves et al., 2009)

Los estudios mitocondriales con insectos de importancia médica como el zancudo *Ae. aegypti*, se han centrado principalmente en el estadio adulto, evaluando la actividad del músculo de vuelo, conocido por poseer una alta demanda energética. Gonçalves *et al.* (2009) describieron el efecto de la alimentación sanguínea en la bioenergética de mitocondrias aisladas de músculo de vuelo de *Ae. aegypti* midiendo el CCR empleando como sustratos oxidables prolina+piruvato y glicerol 3-fosfato, e induciendo un estado 4 con oligomicina. El CCR medido con prolina + piruvato para zancudos alimentados con sangre fue de  $6.6 \pm 0.78$ , y para los zancudos alimentados con azúcar fue de  $9.53 \pm 1.06$ . El CCR medido con glicerol 3-fosfato para zancudos alimentados con sangre fue de  $1.73 \pm 0.37$ , y para los zancudos alimentados con azúcar fue de  $1.87 \pm 0.38$ . Con base en estas observaciones, los autores concluyen que la alimentación sanguínea provoca cambios funcionales en los complejos proteínicos de las mitocondrias, evidenciándose en la disminución de consumo de oxígeno (Gonçalves et al., 2009).

Adicionalmente, Correa *et al.*, (2015), evaluaron tres sustratos oxidables: prolina + piruvato, glicerol-3 fosfato y palmitoil carnitina + malato, en mitocondrias aisladas de zancudos macho y hembra. Los autores mencionan que la respiración promovida por la oxidación de prolina en las mitocondrias del músculo de vuelo de hembras fue más alta que en los machos, sugiriendo que la

ingesta de sangre puede haber adaptado las mitocondrias para utilizar prolina como principal fuente de electrones en la respiración mitocondrial. Además, probaron que la entrada de los electrones usando prolina como sustrato oxidable, se da principalmente por el complejo I de la cadena respiratoria y en menor proporción a través de prolina deshidrogenasa. Los mismos autores también realizaron la medición de la respiración mitocondrial *in situ*, adicionando un tórax de *Ae. aegypti* directamente en la cámara del oxígrafo Oroboros. Teniendo en cuenta que los resultados obtenidos mostraron una eficiencia bioenergética similar a la obtenida con mitocondrias aisladas, proponen el estudio de la fisiología mitocondrial del músculo de vuelo de *Ae. aegypti* sin necesidad de realizar un aislamiento de la mitocondria (Correa Soares et al., 2015).

**2.2.3. Proteómica mitocondrial en *Aedes aegypti*.** Alonso *et al.*, (2005) publican el único estudio proteómico mitocondrial de la línea celular de *Drosophila melanogaster*. Para ello, los autores emplearon electroforesis bidimensional (2-D) y espectrometría de masas para la identificación de las proteínas. De los 266 spots obtenidos, lograron identificar 66 proteínas, de las cuales 17 se encuentran implicadas en la fosforilación oxidativa, 5 en el metabolismo de los aminoácidos y 4 en el metabolismo de lípidos.

Para *Ae. aegypti* los estudios proteómicos se enfocan en la identificación de la expresión diferencial frente la acción de sustancias empleadas en el control poblacional del zancudo. En la etapa larval se ha descrito la expresión proteica en el intestino medio en presencia de la toxina Cry producida por *Bacillus thuringiensis*. Bajo diferentes dosis de toxina Cry se encontraron 18 proteínas sobre-expresadas y siete reguladas negativamente, las cuales están implicadas en la producción de energía y el mantenimiento del citoesqueleto (Cancino-Rodezno et al., 2012). De

manera similar, Bayyareddy *et al.*, (2009) identificaron tres isoformas de fosfatasa alcalina y aminopeptidasa, relacionadas con la unión específica de la toxina Cry en las membranas del intestino medio de larvas (L4) (Bayyareddy, Andacht, Amir, & Adang, 2009).

### 3. Metodología

#### 3.1 Obtención de larvas (L4) de *Aedes aegypti*.

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

Para facilitar la ovoposición de las hembras, en cada jaula de cría se ubicaron contenedores plásticos con papel filtro humedecido, los cuales fueron retirados cada 8 días. Con el fin de obtener larvas para los experimentos, periódicamente se sumergieron los huevos en agua libre de cloro. Las larvas eclosionadas fueron depositadas en bandejas plásticas y alimentadas día por medio con concentrado para peces TetraMin Tropical Flakes®. Se realizó un seguimiento diario del crecimiento de las larvas verificando cada muda mediante la presencia de las exuvias con el fin de garantizar el uso de larvas en estadio L4. Una vez las larvas alcanzaron

el estadio L4, fueron separadas empleando una pipeta Pasteur y se transfirieron a vasos plásticos para su posterior uso.

### **3.2 Aislamiento de mitocondrias de larvas (L4) de *Aedes aegypti*.**

Para la obtención de mitocondrias de larvas de *Ae. aegypti*, se modificó el protocolo descrito por (Borrero Landazabal, Carreño Otero, Kouznetsov, Duque Luna, & Mendez-Sanchez, 2018). Se seleccionaron aproximadamente 1000 larvas (L4), las cuales se filtraron con tela de tul y se depositaron en un tubo de homogenización con 10 mL de medio de aislamiento (BSA 0.1%, EGTA 1 mM, HEPES 10 mM pH 7.2, Sacarosa 250 mM). Para romper el exoesqueleto y realizar una homogenización de los tejidos se utilizó un homogeneizador tipo Van Potter hasta obtener una suspensión homogénea. El homogenato obtenido se filtró con gasa de vidrio y la muestra fue recolectada en un tubo Falcon de 50 mL para el posterior proceso de separación.

Las diferentes fracciones celulares fueron separadas empleando centrifugación diferencial. Se llevó a cabo una primera centrifugación a  $300 \times g$  durante 5 minutos con el fin de descartar residuos de exoesqueleto. El sedimento obtenido se descartó y el sobrenadante fue sometido a una segunda centrifugación a  $8000 \times g$  durante 10 minutos. El precipitado obtenido fue re-suspendido en 10 mL de medio de aislamiento, y se centrifugó a  $7000 \times g$  durante 10 minutos. El precipitado obtenido fue re-suspendido en 10 mL de medio de aislamiento sin BSA y se centrifugó nuevamente a  $7000 \times g$  durante 10 minutos. El precipitado final correspondió a mitocondrias aisladas, las cuales fueron re-suspendidas en 250  $\mu$ L de medio de aislamiento sin BSA.

### **3.3 Cuantificación de proteínas totales.**

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

### **3.4 Medición de coeficiente de control respiratorio de mitocondrias aisladas de larvas (L4).**

Las mediciones de consumo de oxígeno se realizaron en un respirómetro de alta resolución (Oxygraph-2k, Oroboros-Instruments, Innsbruck, Austria), a 28°C con una agitación de 750 rpm. Cada cámara del Oroboros contenía 2 mL de medio de incubación (EGTA 0,1 mM, HEPES 10 mM, KCl 65mM, Manitol 125 mM), al cual se le adicionó 0.1 mg/mL de proteína (mitocondrias). Una vez se estabilizaron los parámetros iniciales para la medición, se agregó el sustrato a evaluar (Glutamato 5mM, prolina 10mM + piruvato 10 mM) junto con  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.6 mM. Posteriormente, la fosforilación oxidativa fue promovida con la adición de ADP 0.6 mM. Una vez estabilizada la señal de flujo de oxígeno, se adicionó oligomocina 3.4  $\mu\text{M}$ , con el fin de inhibir la fosforilación oxidativa y así obtener un estado 4 inducido (Gnaiger, 2014).

### **3.5 Medición de coeficiente de control respiratorio de larvas permeabilizadas.**

Para la medición del coeficiente de respiración de larvas vivas, se empleó el procedimiento descrito en Mitochondrial Bioenergetics, Methods and Protocols (Pesta & Gnaiger, 2009). Cada cámara del Oroboros, contenía 2 mL de medio de incubación (EGTA 0.1 mM, HEPES, 10 mM,

KCl 65 mM, Manitol 125 mM) a 28 °C con una agitación de 750 rpm. El consumo de oxígeno fue evaluado para 1 y 5 larvas, a las cuales se les adicionó digitonina 0.05 mg/mL para la permeabilización de las membranas. Posteriormente, se adicionó el sustrato a evaluar (Glutamato 5mM, prolina 10mM + piruvato 10 mM) junto con el  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.6 mM y finalmente se adicionó ADP 0.6 mM.

### **3.6 Cuantificación del coeficiente de control respiratorio**

El valor del coeficiente de control respiratorio (CCR) se obtuvo al dividir la velocidad de respiración en el estado 3 (máxima respiración en presencia de ADP y sustratos oxidables) y el estado 4 (baja respiración debido a la ausencia de ADP). El CCR fue calculado tanto para mitocondrias aisladas, como para las larvas vivas (González-Calvar & Corini, 2004).

### **3.7 Análisis estadístico del CCR larval y mitocondrial.**

Todas las pruebas fueron realizadas por triplicado en días diferentes, y cada sustrato fue evaluado tres o cuatro veces. Los datos obtenidos fueron registrados en una hoja de datos de Excel discriminada para cada prueba. Los resultados fueron analizados usando Statistica V11. A todos los datos tabulados se les aplicó estadística descriptiva (promedio, desviación estándar, error) y fueron sujetos a test de normalidad. 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. Se estableció la significancia estadística con valores de  $p \leq 0.05$

### **3.8 Aislamiento de proteínas solubles y de membrana de mitocondrias aisladas de larvas (L4) de *Aedes aegypti*.**

Para el aislamiento de proteínas de membrana y proteínas solubles de mitocondria de larvas de *Ae. aegypti* se modificó el protocolo propuesto por *Santoni et al., (2000)*. Una vez obtenidas las mitocondrias aisladas, estas fueron re-suspendidas en 100  $\mu$ L de Buffer de lisis (Urea 7 M, Tiourea 2 M, Triton x-100 0.5%, formalitos 1.2% pH=3-10, DTT 20 mM, CHAPS 4% p/v) y se incubaron durante 15 minutos a 4 °C. Posteriormente, se realizó una centrifugación a 12000  $\times$  g por 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante obtenido, correspondiente a proteínas solubles, fue almacenado a 4 °C. El pellet obtenido, correspondiente a proteínas de membrana, fue re-suspendido en 100  $\mu$ L de Buffer de almacenamiento (Mes-Tris 10mM pH=6,5, glicerol 20%, PMSF 1 mM, DTT 1 mM) y se incubó durante 10 minutos en agitación suave manteniendo la temperatura a 4 °C. La muestra se dividió en volúmenes iguales, a la muestra 1 se le adicionó 150  $\mu$ L de una mezcla de cloroformo/metanol en relación 2:1 y a la muestra 2 se le adicionó 150  $\mu$ L de cloroformo. Las muestras permanecieron en incubación durante 24 horas a -70 °C. Posteriormente, se centrifugaron a 12000  $\times$  g durante 20 minutos a 4 °C. Se obtuvo una fracción proteica contenida en la interface del cloroformo/metanol, la cual se retiró cuidadosamente empleando una pipeta. Las proteínas obtenidas fueron suspendidas en 50  $\mu$ L de Buffer de lisis y se homogenizó la muestra mediante agitación con vórtex. Finalmente, las proteínas solubles y de membrana fueron cuantificadas por el método de Bradford.

### **3.9 Separación de proteínas mitocondriales por SDS-PAGE.**

A cada una de las muestras correspondientes a proteínas solubles y de membrana se les adicionó Buffer de carga Laemmli (SDS 4%, glicerol 20%, 2-mercaptoetanol 10%, azul de bromofenol

0,004%, Tris HCl pH 6,8) en una relación 1:1 y se calentaron a 90 °C durante cinco minutos, para garantizar la desnaturalización de las proteínas. Se sembraron 15 µL de cada muestra en un gel de poliacrilamida al 12%. Los geles se corrieron en una cámara electroforética con un voltaje de 150 V durante 1 hora y 15 minutos.

El proceso de tinción del gel se realizó con azul de Coomassie R-250 en una solución con metanol 50%, y ácido acético 10%, dejándolo durante 24 horas. Posteriormente se retiró el exceso de colorante en una solución decolorante (Metanol 5% y Ácido acético 10%).

### **3.10 Preparación de la muestra para análisis por espectrometría de masas.**

Una vez identificadas las bandas de interés en cada uno de los geles obtenidos, estos fueron lavados 3 veces con agua tipo 1 y se cortaron las bandas más intensas y definidas, las cuales fueron colectados en tubos eppendorf para su decoloración con Buffer de lavado (Bicarbonato de amonio 50 mM, acetonitrilo 50 %) durante 15 minutos. El proceso de decoloración se realizó varias veces hasta la desaparición de todo el colorante de los cortes de gel. Posteriormente, a cada *eppendorf* se le adicionó 50 µL de acetonitrilo 100% y se incubaron hasta observar que las piezas de gel tomaran una coloración blanquecina. El acetonitrilo fue removido y las muestras se dejaron secar al aire. Una vez secas, se re-suspendieron en 7 µL de tripsina 20 mg/mL y se dejaron incubando durante 30 minutos a 4 °C. Luego, se incubaron a 37 °C durante 12 horas. Al finalizar el tiempo de incubación, se adicionó 7 µL de solución de acetonitrilo 60 % y TFA 1 % y se incubaron en baño de ultrasonido durante 15 minutos. Este paso se repitió 3 veces con el fin de lograr una mayor extracción de los péptidos. Las muestras se concentraron por secado en un horno a 60 °C. Por último, fueron re-suspendidas en acetonitrilo 50 % y TFA 1 %.

### 3.11 Análisis de los péptidos por espectrometría de masas MALDI-TOF.

Las muestras se sembraron en el target para MALDI-TOF, mezclándolos en una relación 1:1 con la matriz ( $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic acid, Sigma-Aldrich), dejando caer 1  $\mu$ L de la mezcla en cada pozo. La digestión trípica fue analizada con un espectrómetro de masas MALDI-TOF/TOF Ultraflextreme (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) equipado con un láser Nd:YAG 355 nm y operado con el software FlexControl v.33.

Los espectros se grabaron en modo de ion positivo y se calibró con un patrón externo de una mezcla de péptidos (Renin substrate, Bradykinin y Bombesin) a 1 ppm y con una digestión trípica de BSA. Los espectros fueron procesados con la herramienta Flex Analysis y los valores m/z de las señales representativas se introdujeron en el programa MASCOT 2.1 para compararlos en la base de datos de Swiss-Prot.

## 4. Resultados

### 4.1 Aislamiento de mitocondrias de larvas (L4) de *Aedes aegypti*

El protocolo estandarizado en el presente trabajo, se resume en la Figura 6. Todo el proceso de aislamiento se realizó en hielo con el fin de mantener la temperatura cerca de los 4 °C. A partir de 1000 larvas (L4) de *Ae. aegypti* se obtuvo una concentración  $10.7 \pm 1.9$  mg/mL de proteína total en promedio.

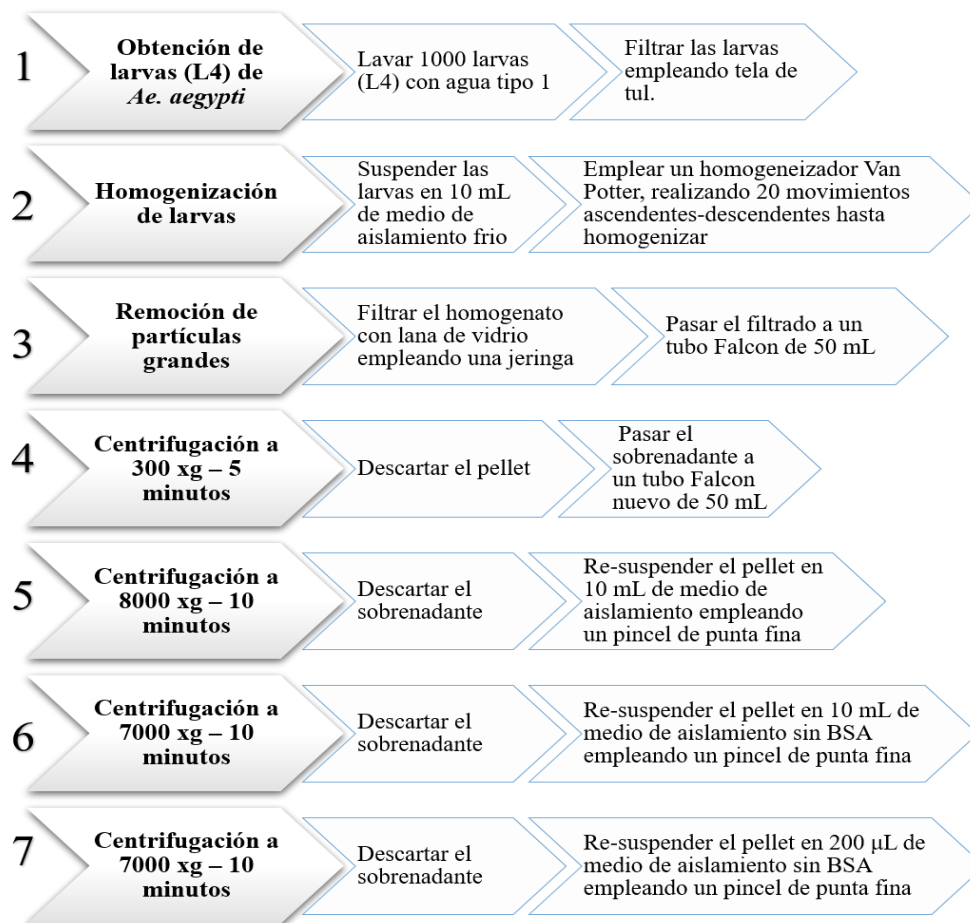


Figura 6. Protocolo de aislamiento de mitocondrias de larvas (L4) de *Aedes aegypti*.

#### 4.2 Cuantificación del CCR de mitocondrias aisladas y larvas permeabilizadas.

- **Consumo de oxígeno de mitocondrias aisladas**

El control respiratorio para mitocondria aisladas de larvas (L4) de *Ae. aegypti* se realizó empleando 0.1 mg/mL de proteína en cada ensayo. La velocidad de consumo de oxígeno en el estado 3 empleando glutamato como sustrato oxidable fue de  $33.87 \pm 1.86$  y con prolina+piruvato fue de  $36.00 \pm 2.54$ . El valor obtenido para el estado 4 empleando glutamato fue de  $31 \pm 3.40$  y con prolina+piruvato fue de  $31.58 \pm 2.46$ . De la cuantificación del CCR se obtuvo un valor de  $1.1 \pm 0.1$  empleando glutamato y  $1.14 \pm 0.04$  con prolina + piruvato. Al comparar estadísticamente

los estados respiratorios y CCR con los dos sustratos empleados, no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ; test Tukey y Kruskal-Wallis) (Tabla 1).

El valor del estado 4 inducido empleando glutamato fue de  $24.91 \pm 2.03$  y su CCR fue de  $1.43 \pm 0.14$ . Con prolina + piruvato el valor del estado 4 fue de  $26.74 \pm 1.87$  y su CCR calculado fue de  $1.35 \pm 0.10$ . Al comparar estadísticamente el estado 4 inducido y CCR con los dos sustratos empleados, no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ; test Tukey).

Tabla 1.

*Parámetros de consumo de oxígeno de mitocondrias aisladas de larvas (L4) de Ae. aegypti, empleando glutamato y prolina piruvato como sustratos oxidables.*

	<b>Estado 3</b>	<b>Estado 4</b>	<b>CCR</b>	<b>Estado 4 inducido</b>	<b>CCR inducido</b>
<b>Glutamato</b>	33.87±1.86	31.00±3.40	1.10 ± 0.10	24.91 ± 2.03	1.43 ± 0.14
<b>Prolina+piruvato</b>	36.00±2.54	31,58±2,46	1.14±0.04	26.74±187	1.35±0.10

- **Consumo de oxígeno de larvas permeabilizadas**

Empleando glutamato como sustrato oxidable, el estado 3 medido con 1 larva fue de  $10.42 \pm 0.7$  y con 5 larvas fue de  $43.65 \pm 8.26$ . El estado 4 con 1 larva fue de  $8.35 \pm 2.51$  y con 5 larvas fue de  $35.46 \pm 7.40$ . El CCR calculado para 1 larva fue  $1.25 \pm 0.13$  y con 5 larvas fue  $1.24 \pm 0.04$ . Se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los ensayos con 1 y 5 larvas para todos los parámetros respiratorios (estado 3, estado 4 y CCR) empleando el sustrato glutamato ( $p \leq 0.05$ , test U Mann-Whitney).

Tabla 2.

*Parámetros de consumo de oxígeno de 1 y 5 larvas (L4) de Ae. aegypti, empleando glutamato y prolina piruvato como sustratos oxidables. Los valores de los estados respiratorios se expresan en pmol de oxígeno/(s\*mL).*

*\*Diferencias estadísticas significativas entre 1 y 5 larvas para cada sustrato empleado en cada uno de sus estados*

respiratorios y CCR. <sup>a,b,c,d,e,f</sup> Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre sustratos para cada medición (1 y 5 larvas) en cada uno de sus estados respiratorios y CCR.

Estado respiratorio		Glutamato	Prolina + piruvato
Estado 3	1 larva	10.42 ± 0.7 <sup>*a</sup>	7.62 ± 1.64 <sup>*b</sup>
	5 larvas	43.65 ± 8.26 *	42.47 ± 13.16 *
Estado 4	1 larva	8.35 ± 2.51 <sup>*c</sup>	5.95 ± 1.28 <sup>*d</sup>
	5 larvas	35.46 ± 7.40*	32.86 ± 10.80*
CCR	1 larva	1.25 ± 0.13	1.28 ± 0.09
	5 larvas	1.24 ± 0.04 <sup>e</sup>	1.30 ± 0.04 <sup>f</sup>

Empleando prolina + piruvato como sustratos oxidables, la medición del estado 3 con 1 larva fue de 7.62±1.64 y con 5 larvas fue de 32.86±10.80. El valor para el estado 4 con 1 larva fue 5.95±1.28 y con 5 larvas fue 32.86±10.80. El CCR calculado a partir de los resultados con 1 larva fue de 1.28±0.09 y con 5 larvas fue de 1.30±0.04. Se encontraron diferencias estadísticas significativas entre 1 y 5 larvas para los estados 3 y 4 medidos con prolina + piruvato ( $p \leq 0.05$ , test U Mann-Whitney), mientras que no se presentaron diferencias estadísticas significativas para el CCR ( $p = 0.55$ ; test Tukey) (Tabla 2).

Al comparar los resultados entre sustratos para 1 larva, se encontraron diferencias significativas en los estados 3 ( $p \leq 0.03$ , test Tukey) y estado 4 ( $p = 0.0003$ , test U Mann-Whitney), pero no se encontraron diferencias entre los valores de CCR. Los resultados de 5 larvas respecto a los sustratos, solo mostraron diferencias significativas en el CCR, ( $p = 0.003$  test Tukey).

### 4.3 Obtención del perfil proteico de mitocondrias aisladas de larvas (L4)

Con el fin de corroborar la obtención efectiva de proteínas solubles y proteínas de membrana, se realizó su separación empleando electroforesis en una dimensión (según su peso). Se obtuvieron 3 geles en días diferentes, los cuales fueron analizados con el software Image Lab.

Para las proteínas solubles, se visualizaron 6 bandas, 5 de ellas en un rango de peso inferior a 35 KDa. Se sembró un carril con proteínas de membrana sin tratamiento, en el cual las bandas no se definen claramente. Solo se logra visualizar una zona oscura alrededor de los 25 KDa y otras 4 bandas entre los 45 y 70 KDa. Para las proteínas de membrana tratadas con cloroformo-metanol 2:1, se lograron reconocer 21 bandas ubicadas en un amplio rango de peso, desde 60 hasta 15 KDa. En el tratamiento correspondiente a proteínas de membrana tratadas solo con cloroformo, se visualizaron las mismas 21 bandas del tratamiento cloroformo metanol 2:1, con un leve aumento en la intensidad de las mismas (Figura 7).

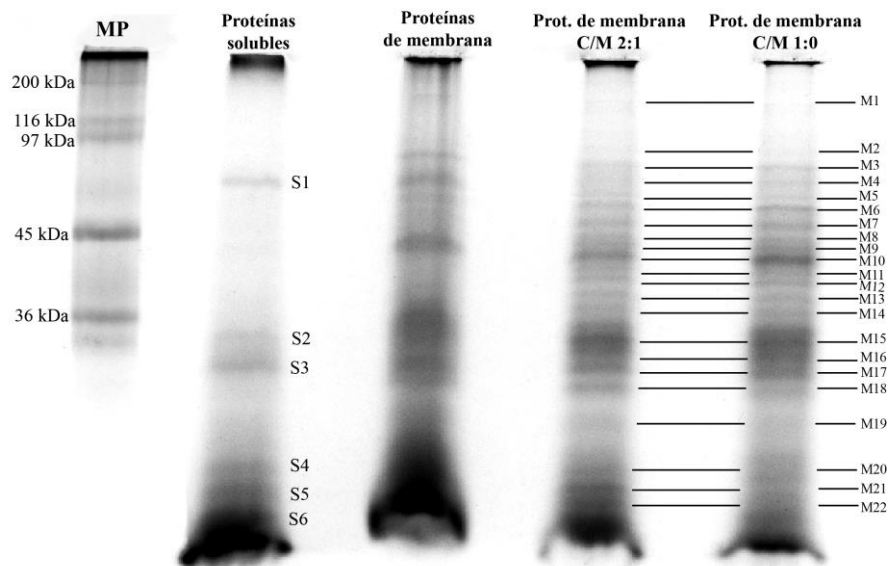


Figura 7. Bandas de proteínas mitocondriales de larvas (L4) de *Ae. aegypti* en SDS-PAGUE

Usando las bandas del marcador de peso molecular, se obtuvo un valor estimado de los pesos correspondientes a las bandas de las proteínas solubles y de membrana (Tabla 3). El peso de la mayor cantidad de bandas de proteínas solubles estuvo entre 29.2 y 14.4 y las bandas de proteínas de membrana entre 59.7 y 14.4.

Tabla 3.

*Pesos aproximados en KDa de proteínas solubles y de membrana de mitocondrias de larvas (L4) de Ae. aegypti.*

<b>Proteínas solubles</b>		<b>Proteínas de membrana</b>	
<b>Banda</b>	<b>Peso KDa</b>	<b>Banda</b>	<b>Peso KDa</b>
S1	54.0	M1	75.1
S2	29.2	M2	59.7
S3	25.4	M3	56.5
S4	18.8	M4	54.9
S5	16.1	M5	52.3
S6	14.4	M6	50.6
		M7	47.7
		M8	44.6
		M9	42.8
		M10	39.1
		M11	36.4
		M12	34.2
		M13	30.9
		M14	28.7
		M15	26.6
		M16	25.1
		M17	23.3
		M18	22.3
		M19	20.4
		M20	18.1
		M21	16.3
		M22	14.4

#### 4.4 Identificación de las proteínas mitocondriales

Al realizar el análisis de los geles, se tomaron muestras de las 5 bandas más intensas de las proteínas solubles y 10 de las proteínas de membrana. De las 15 muestras analizadas de todo el gel, se identificaron de 6 proteínas empleando la herramienta MASCOT 2.1 y la base de datos SwissProt (Tabla 4). Una vez identificadas las proteínas en la base de datos, se procedió a verificar su peso en Uniprot.

Tabla 4.

*Resultados de la identificación de las proteínas mitocondriales de larvas L4 de Ae. aegypti, de lo cual, cada banda analizada se identificó con el nombre de la proteína, el código de la base de datos SwissProt, el organismo en el que se reporta dicha proteína, el peso molecular (KDa) y el puntaje de Score (Coincidencia) entre los datos ingresados y la base de datos.*

<b>Banda</b>	<b>Nombre de la proteína</b>	<b>SwissProt AC</b>	<b>Organismo</b>	<b>Peso (KDa)</b>	<b>Score en MASCOT</b>
S1	Piruvato deshidrogenasa quinasa	PDK_DROME	<i>Cyanidium caldarium</i>	66.0	58
M1	PP2C-CG9801	Y9801_DROME	<i>Drosophila melanogaster</i>	76.7	51
M3	ATP sintasa (sub $\gamma$ )	ATPG_TRYBB	<i>Trypanosoma brucei</i>	34.3	41
M5	ATP sintasa (sub $\alpha$ )	ATPA_CYACA	<i>Cyanidium caldarium</i>	54.9	54
M6	Succinil-CoA sintetasa (sub $\beta$ )	SUCB_BLAHN	<i>Blastocystis sp.</i>	45.1	53
M7	Chaperona HSP60	CH60_LEIMA	<i>Leishmania major</i>	63.0	48

## 5. Discusión

### 5.1 Aislamiento de mitocondrias.

Considerando el escaso número de publicaciones de protocolos para el aislamiento de mitocondrias íntegras de larvas de insectos, en los laboratorios del CINTROP y GIBIM, se ha

empleado como guía el protocolo de aislamiento de mitocondrias de hígado de rata (Voss, Cowles, & Bacila, 1963). Sin embargo, teniendo en cuenta que en el procedimiento se realizan variaciones dependiendo del tejido en estudio, se han llevado a cabo diferentes modificaciones en pro de optimizar el proceso.

En general los protocolos de aislamiento de mitocondrias tienen condiciones comunes, una de las más relevantes es la ejecución del procedimiento en hielo, para evitar la proteólisis. Con respecto al medio de aislamiento, este debe contener un soporte osmótico que pueden ser sustancias no iónicas como sacarosa o manitol a 250 mM, pero también puede emplearse KCl 150 mM para algunos tejidos que tienen consistencia gelatinosa. En este medio es de importancia mantener el pH, por lo que se adiciona una sustancia con capacidad tamponante alrededor de pH 7 como: HEPES ( $pK_{a2}=7.5$ ) y Tris-HCl ( $pK_a=8.1$ ) en un intervalo de concentración de 5 a 20 mM. La adición de agentes quelantes como EDTA y EGTA, favorece la integridad de las mitocondrias, debido a que coordinan con iones de  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$ , los cuales son cofactores de fosfolipasas. La adición de BSA (0.1-1%) también protege la integridad de la organela, puesto que esta proteína se une a ácidos grasos, compuestos fenólicos y satura proteasas que se encuentren en el medio, evitando su acción sobre la mitocondria. La separación de subunidades celulares se realiza mediante centrifugación diferencial que se hace en dos etapas, la primera de baja velocidad, menor a 1000  $xg$ , donde se sedimenta la fracción más pesada correspondiente a membranas celulares y núcleo. La segunda separación se da a altas velocidades con el fin de precipitar las mitocondrias (Ikuma, 1970; Pallotti & Lenaz, 2001).

En la Tabla 5 se comparan las condiciones de los protocolos evaluados para el aislamiento de mitocondrias de larvas (L4) de *Ae. aegypti* en el laboratorio (en años anteriores) haciendo énfasis

en parámetros como la composición del medio de aislamiento, el volumen empleado del mismo y las centrifugaciones necesarias para la separación de la organela. Adicionalmente, se comparan dos protocolos de aislamiento de mitocondria en músculo de vuelo de *Ae. aegypti* y en larva de *Drosophila melanogaster* reportados en la literatura.

Tabla 5.

Condiciones de los protocolos para el aislamiento de mitocondrias de larvas de *Ae. aegypti* empleados en el laboratorio de entomología médica y GIBIM, y los protocolos reportados en literatura para el aislamiento de mitocondrias de adultos de *Ae. aegypti* (músculo de vuelo) y *D. melanogaster*.

Protocolos	Medio de aislamiento	Volumen	Centrifugaciones			
			1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>
<b>Laboratorio 2015</b>	Manitol 250 mM	3 mL	300 <i>xg</i>	1000 <i>xg</i>	300 <i>xg</i>	10000 <i>xg</i>
	HEPES 10 mM		5 min	10 min	5 min	10 min
	EGTA 1mM					
	BSA 0.1%					
<b>Laboratorio 2017</b>	Sacarosa 250 mM	3 mL	300 <i>xg</i>	1000 <i>xg</i>	300 <i>xg</i>	10000 <i>xg</i>
	HEPES 10 mM		5 min	10 min	5 min	10 min
	EGTA 1mM					
	BSA 0.1%					
<b>Laboratorio 2018</b>	Sacarosa 250 mM	10 mL	300 <i>xg</i>	8000 <i>xg</i>	7000 <i>xg</i>	7000 <i>xg</i>
	HEPES 10 mM		5 min	10 min	10 min	10 min
	EGTA 1mM					
	BSA 0.1%					
<b>Gonçalves et al (2009)</b>	Sacarosa 250 mM	10 mL	300 <i>xg</i>	10000 <i>xg</i>	-	-
	Tris-HCl 5 mM		5 min	10 min		
	EGTA 2mM					
	BSA 1%					
<b>Aw et al (2016)</b>	KCl 154 mM	10 uL	1500 <i>xg</i>	-	-	-
	EDTA 1 mM		8 min			

La fila nombrada como “Laboratorio 2018” corresponde a las condiciones que se modificaron para la estandarización del protocolo de aislamiento de mitocondrias en larvas (L4) de *Ae. aegypti* en el presente proyecto. Como primera medida, es de importancia resaltar que se

emplearon aproximadamente 1000 larvas (L4). Se escogieron en este estadio, debido a que es el último de su etapa larval, donde el insecto tiene una alta demanda energética con el fin de acumular nutrientes que se usan para sobrevivir durante el estadio de pupa, etapa en la cual el individuo no consume alimento (Arrese & Soulages, 2010; Ikuma, 1970). En cuanto al medio de aislamiento, se conservaron los reactivos y concentraciones del protocolo evaluado en el 2017, que a su vez son casi idénticos a los demás protocolos mostrados en la Tabla 5. El volumen que se adiciona de este medio depende de la cantidad de muestra inicial de larvas, pues una gran cantidad de material biológico en poco volumen de medio de aislamiento impide la rotación adecuada del émbolo del homogeneizador, que puede provocar la ruptura de las membranas mitocondriales, como era el caso de los protocolos empleados en años anteriores, donde usaban una cantidad de larvas similar pero un volumen de medio de aislamiento mucho menor. Por esta razón el volumen fue aumentado a 10 mL, para evitar los efectos perjudiciales sobre la mitocondria. Este proceso de homogenización se realizó con alrededor de 20 movimientos ascendentes-descendentes, con el fin de garantizar la ruptura del exoesqueleto de las larvas, sin perjudicar la integridad de las mitocondrias.

Las centrifugaciones empleadas para la separación de las fracciones celulares se iniciaron con la sedimentación de las partículas más pesadas a 300  $g$ , de igual manera que los demás protocolos revisados. De la Tabla 5 se diferencia el procedimiento propuesto por Aw *et al.* (2016) quienes solo realizan una centrifugación a 1500  $g$ , lo cual cuestiona la obtención únicamente de mitocondrias en este sedimento. Posteriormente se realizó la centrifugación a 8000  $g$  que precipitó las mitocondrias, contrario a los protocolos de años anteriores del GIBIM-CINTROP, en los cuales se realizaban separaciones de membranas celulares y demás organelas

más pesadas en tres etapas de centrifugación y dejaban la última centrifugación para la obtención de mitocondrias. En este caso, se realizaron dos centrifugaciones a 7000  $xg$  con el fin de purificar este precipitado y finalmente el pellet obtenido se re-suspendió en 200  $\mu L$  de medio de aislamiento sin BSA. En esta última etapa se consideró innecesaria la presencia de BSA, debido a que este extracto se consideró libre de proteasas u otros elementos perjudiciales para la integridad de la mitocondria.

## **5.2 Cuantificación del CCR de mitocondrias aisladas y larvas permeabilizadas.**

Al no evidenciarse diferencias estadísticas entre los valores de CCR para los sustratos evaluados, se puede inferir que se debe a que el glutamato y el piruvato se oxidan e ingresan al ciclo del ácido cítrico donde se genera el NADH, quien proporcionan electrones vía complejo I. En cuanto a la prolina, se puede considerar su oxidación en 4 sitios distintos, el primero corresponde a la prolina deshidrogenasa que transfiere los electrones directamente a la ubiquinona, y los otros 3 producen en la  $\Delta$ -1-pirrolina-5-carboxilato deshidrogenasa, glutamato deshidrogenasa y las enzimas del ciclo del ácido cítrico, que se acoplan a la generación de NADH, un donador de electrones al complejo I. Finalmente, se puede indicar que se evaluó la misma vía de transferencia electrónica con estos sustratos evaluados (Correa Soares et al., 2015).

Los resultados del CCR empleando prolina + piruvato, fueron comparados con los resultados de Gonçalves *et al.* (2009), quienes reportan un CCR de  $9.53 \pm 1.06$  con el mismo sustrato, y empleando glicerol 3-fosfato fue de  $1.87 \pm 0.38$ . Los autores sugieren que esta gran diferencia puede deberse a que la continua presencia de proteínas de la dieta sanguínea en el estadio adulto de las hembras, pudo haber adaptado las mitocondrias del músculo del vuelo para utilizar la prolina como fuente principal de electrones para sostener la respiración. Además, las diferencias

en los CCR de mitocondria de músculo de vuelo respecto a los sustratos evaluados permiten considerar que el valor de CCR no solo se ve afectado por la integridad de la mitocondria, sino también por el tipo de sustrato evaluado. En relación con los resultados obtenidos en el presente trabajo, la prolina + piruvato no permite obtener un valor alto de CCR en mitocondrias aisladas de larvas (L4), además se puede sugerir que la causa de obtener un bajo CCR, no necesariamente corresponde a un protocolo de aislamiento inapropiado.

Tabla 6.

*Comparación de los valores de CCR obtenidos a partir de mitocondrias aisladas de larvas (L4) y de musculo del vuelo (Goncalves et al., 2009) de Ae. aegypti hembra.*

<b>CCR</b>	<b>Laboratorio 2018</b>	<b>Gonçalves et al. (2009)</b>
<b>CCR inducido (Glutamato)</b>	1,43 ± 0,14	-
<b>CCR inducido (Prolina+piruvato)</b>	1,35 ± 0,10	9,53 ± 1,06
<b>CCR inducido (Glicerol 3- fosfato)</b>	-	1,87 ± 0,38

Con el fin de verificar si el bajo coeficiente de respiración fue ocasionado por el método de aislamiento empleado, se midió la respiración mitocondrial en larvas permeabilizadas y parcialmente homogenizadas por acción del agitador del instrumento (Oroboros).

Teniendo en cuenta que en las mediciones (mitocondrias aisladas y larvas vivas) no se encontraron diferencias estadísticas entre los valores de CCR, se puede inferir que para la medición de parámetros respiratorios mitocondriales en larvas de *Ae. aegypti* se pueden emplear larvas permeabilizadas, preferiblemente 5, pues las velocidades de consumo de oxígeno en los estados respiratorios se aproximan a los obtenidos con mitocondrias aisladas. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Correa *et al.* (2015), quienes obtuvieron resultados similares de

respiración mitocondrial medida en mitocondrias aisladas de músculo de vuelo y en músculo de vuelo permeabilizado, sin embargo, estos autores no reportan valores de CCR, que se puedan comparar con el presente trabajo.

Desde el punto de vista experimental, la medición del CCR en larvas permeabilizadas representa grandes ventajas, pues solamente se emplean 5 larvas mientras que la medición del CCR de mitocondrias aisladas requiere aproximadamente 1000 larvas y evita realizar un proceso de aislamiento que resulta extenso y en algunos casos, perjudicial para la integridad de las membranas mitocondriales.

No obstante, los valores del CCR obtenidos para mitocondrias aisladas y larvas permeabilizadas, permanecieron por debajo de 3. Teniendo en cuenta que actualmente el valor de CCR aceptado para mitocondrias acopladas debe ser  $\geq 3$ , no se puede garantizar el acoplamiento de las mitocondrias. A pesar de esto, se puede sugerir que la razón de un bajo CCR no es consecuencia exclusivamente del método de aislamiento.

### **5.3 Obtención del perfil proteico de mitocondrias aisladas de larvas (L4).**

Teniendo en cuenta que, la mayoría de proteínas de membrana mitocondriales pertenecen a la cadena respiratoria, la cual está compuesto de grandes complejos proteicos, quienes tienen pesos moleculares mayores a los de proteínas solubles que puedan encontrarse en la matriz o espacio intermembrana (Lehninger & Cox, 2006), se puede indicar que el método de separación empleado fue el adecuado. Esto se evidenció en la ausencia de bandas sobre los 45 KDa para proteínas solubles. Adicionalmente, se evidenció una mejor separación y resolución de las

bandas correspondientes a las proteínas de membrana al adicionar cloroformo en el método de separación, cuya función fue retirar los lípidos de membrana (Santoni et al., 2000).

La falta de estudios proteómicos mitocondriales en *Ae. aegypti*, dificultó el proceso de identificación de las proteínas, por lo que fue necesario realizar su confirmación a través de otros organismos de referencia encontrados en las bases de datos. Los resultados reportados por Alonso *et al.*, (2005) del proteoma mitocondrial de la línea celular de *D. melanogaster*, son comparables con los resultados del presente trabajo. La mayor cantidad de proteínas encontradas por estos autores se encontraban en el rango de peso molecular de 10 a 70 KDa, similar a los resultados obtenidos para *Ae. aegypti* (14 a 75 KDa). Sin embargo, se debe tener en cuenta que en el presente estudio no se empleó electroforesis bidimensional, la cual permite una mejor separación de proteínas de alto peso molecular, que pueden quedar en bandas poco definidas en geles de una dimensión y dificultan su posterior identificación.

La primera proteína identificada (S1) corresponde a la piruvato deshidrogenasa quinasa, una proteína que se encuentra en la matriz mitocondrial y cataliza la descarboxilación del piruvato. La actividad enzimática de esta proteína se regula en un ciclo de fosforilación/desfosforilación. La fosforilación, que conduce a la inactivación de la PDH, es catalizada por la piruvato deshidrogenasa quinasa, una proteína codificada en el genoma nuclear. En general, los productos de la reacción de la deshidrogenación del NADH, estimulan la actividad quinasa mientras que el sustrato (piruvato) y la coenzima (tiamina pirofosfato) inhiben su actividad (Katsube et al., 1997). La reacción que cataliza dicha enzima se puede expresar así:



La segunda proteína identificada pertenece a la familia de proteínas fosfatasas (PP2C), las cuales representan un elemento fundamental en la regulación de una gran cantidad de funciones biológicas, incluyendo replicación de ADN, metabolismo energético, crecimiento y diferenciación celular. Estas proteínas catalizan la eliminación de un grupo fosfato, unido a un aminoácido serina o treonina de una fosfoproteína. Para efectuar su función catalítica, esta proteína requiere la presencia de iones metálicos ( $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ) con los que coordina su sitio activo (Morrison, Murakami, & Cleghon, 2000). Se debe tener en cuenta que la proteína identificada corresponde a CG9801 y esta no ha sido descrita ni caracterizada para *Ae. aegypti*.

La ATP sintasa, tercera proteína identificada, es un complejo presente en la membrana interna mitocondrial. Las subunidades  $\alpha$  y  $\gamma$  están codificadas en el genoma mitocondrial y ya han sido secuenciadas en adultos de *Ae. aegypti*. Este complejo está formado por los dominios  $F_0$  y  $F_1$ . En el dominio  $F_1$  se encuentran las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , la cuales están conectadas a un tallo, llamado subunidad  $\gamma$  y la rotación de este promueve la hidrólisis de ATP en los tres sitios catalíticos separados en las subunidades  $\beta$  (Sánchez-Vásquez & González-Halphen, 2017).

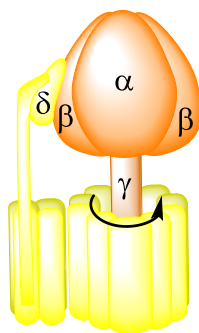


Figura 8. Subunidades de la ATP sintasa. Fuente: modificado de (Lehninger & Cox, 2006)

La succinil-CoA sintetasa, cuarta proteína identificada, es una enzima mitocondrial que acopla la hidrólisis de succinil-CoA a la síntesis de ATP en el ciclo del ácido cítrico y, por lo

tanto, representa el único paso de la fosforilación a nivel de sustrato en el TCA. La subunidad  $\beta$  (identificada en este estudio) proporciona la especificidad de nucleótido de la enzima y se une al sustrato succinato, mientras que los sitios de unión para la coenzima A y el fosfato se encuentran en la subunidad  $\alpha$  (Quan et al., 2017). La actividad catalítica de la enzima puede representarse así:



Algunas alteraciones de los niveles de succinil-CoA sintetasa en *Drosophila* fueron descritas por Quan *et al.*, (2017). La deficiencia de esta enzima alteró los niveles de varios metabolitos en el ciclo del ácido cítrico y la glucólisis, generando daños en el metabolismo energético, que a su vez desencadenó daños a nivel macro como defectos locomotores.

Finalmente, las proteínas chaperonas HSP60 están implicadas en los procesos de plegamiento, replegamiento y ensamblaje apropiado de polipéptidos generados en condiciones de estrés. Baena-López, Alonso, Rodríguez, & Santarén (2008) describieron algunos aspectos de las proteínas HSP60 en embriones de *D. melanogaster*. reportando la ubicación celular de estas proteínas en la membrana interna de las mitocondrias, cuya regulación durante el desarrollo normal del individuo depende de las actividades postranscripcionales.

La identificación de las proteínas mitocondriales en este trabajo, sirve como un estudio preliminar para la descripción del proteoma mitocondrial de larvas de *Ae. aegypti*, el cual contribuye al conocimiento de las proteínas implicadas en el metabolismo mitocondrial y, de esta manera se puede llegar a comprender la actividad de la organela.

## 6. Conclusiones

Se logró estandarizar un nuevo protocolo de aislamiento de mitocondrias de larvas (L4) de *Ae. aegypti*, que permitió la obtención de 10.7 mg/mL de proteína a partir de 1000 larvas.

El valor del coeficiente de control respiratorio en mitocondrias aisladas empleando glutamato y prolina + piruvato, fue en promedio de 1.1 y con un estado 4 inducido por oligomicina de 1.4.

Los resultados sugieren que el uso de larvas permeabilizadas podría facilitar la medición de parámetros de respiración mitocondrial, evitando el proceso de aislamiento de mitocondrias.

Del perfil proteico unidimensional de las proteínas mitocondriales, se lograron diferenciar 7 bandas de proteínas solubles y de estas se identificaron 2; Piruvato deshidrogenasa quinasa y succinil-CoA sintetasa. De proteínas de membrana se diferenciaron 22 bandas, de las cuales 4 fueron identificadas como; PP2C-CG9801, ATP sintasa (sub  $\alpha$ ), ATP sintasa (sub  $\gamma$ ), y chaperona HSP60. Estos resultados representan conocimiento de base de las proteínas mitocondriales de larvas (L4) de *Ae. aegypti*.

## 7. Recomendaciones

Para verificar la integridad de las mitocondrias, se sugiere realizar un control respiratorio adicionando citocromo *c* (un transportador electrónico situado en el espacio intermembrana), pues en el caso de que las mitocondrias no posean membrana externa, un aumento en la concentración de citocromo *c* genera un aumento significativo en la respiración.

Se recomienda emplear otros sustratos oxidables en el control respiratorio como glicerol 3-fosfato o palmitoil carnitina, con el fin de evaluar otras rutas metabólicas que puedan estar estimuladas en el estadio larval y probablemente generen valores más altos del CCR.

Con el fin de realizar una correcta separación de proteínas mitocondriales de membrana, se recomienda emplear electroforesis bidimensional y para confirmar su identificación, realizar secuenciación *de novo*.

**Referencias bibliográficas**

- Alonso, J., Rodriguez, J. M., Baena-López, L. A., & Santarén, J. F. (2005). Characterization of the *Drosophila melanogaster* mitochondrial proteome. *Journal of Proteome Research*, *4*(5), 1636–1645. <https://doi.org/10.1021/pr050130c>
- Arrese, E. L., & Soulages, J. L. (2010). Insect Fat Body: Energy, Metabolism, and Regulation. *Annual Review of Entomology*, *55*(1), 207–225. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-112408-085356>
- Baena-López, L. A., Alonso, J., Rodriguez, J., & Santarén, J. F. (2008). The expression of heat shock protein HSP60A reveals a dynamic mitochondrial pattern in *drosophila melanogaster* embryos. *Journal of Proteome Research*, *7*(7), 2780–2788. <https://doi.org/10.1021/pr800006x>
- Basu Ball, W., Neff, J. K., & Gohil, V. M. (2018). The role of nonbilayer phospholipids in mitochondrial structure and function. *FEBS Letters*, *592*(8), 1273–1290. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12887>
- Bayyareddy, K., Andacht, T. M., Amir, M., & Adang, M. J. (2009). Proteomic identification of *Bacillus thuringiensis* subsp . *israelensis* toxin Cry4Ba binding proteins in midgut membranes from *Aedes* ( *Stegomyia* ) *aegypti* Linnaeus ( *Diptera* , *Culicidae* ) larvae. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *39*(4), 279–286. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2009.01.002>
- Borrero Landazabal, M. A., Carreño Otero, A. L., Kouznetsov, V. V., Duque Luna, J. E., & Mendez-Sanchez, S. C. (2018). Alterations of mitochondrial electron transport chain and oxidative stress induced by alkaloid-like  $\alpha$ -aminonitriles on *Aedes aegypti* larvae. *Pesticide*

*Biochemistry and Physiology*, 144(June 2017), 19–26.  
<https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2017.11.006>

Bothman, K., & Mayer, P. (2016). La cadena respiratoria y fosforilación oxidativa. In V. Rodwell, D. Bender, K. Botham, P. Kennelly, & P. Weil (Eds.), *HARPER BIOQUÍMICA ILUSTRADA* (30th ed., pp. 126–135). Mexico DF.: Mc Graw Hill.

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

Bruce, A., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2007). Conversión energética: mitocondrias y cloroplastos. In *Biología molecular de la célula* (pp. 815–826). Sao Paulo: Omega.

Cancino-Rodezno, A., Lozano, L., Oppert, C., Castro, J. I., Lanz-Mendoza, H., Encarnación, S., ... Bravo, A. (2012). Comparative proteomic analysis of *Aedes aegypti* larval midgut after intoxication with Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis*. *PLoS ONE*, 7(5), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037034>

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

Correa Soares, J. B. R., Gaviraghi, A., & Oliveira, M. F. (2015). Mitochondrial physiology in the major arbovirus vector *Aedes aegypti*: Substrate preferences and sexual differences define respiratory capacity and superoxide production. *PLoS ONE*, 10(3), 1–35. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120600>

Devlin, T. (2004). Inhibición de los enzimas/Cadena de transporte electrónico. In *Bioquímica:*

- libro de texto con aplicaciones clínicas* (4th ed., pp. 147-149/564-589). Filadelfia: Reverté.
- Ernster, L., & Schatz, G. (1981). Mitochondria: A Historical Review. *The Journal of Cell Biology*, 91(December), 227–255. <https://doi.org/10.1083/jcb.91.3.227s>
- Friedman, J. R., & Nunnari, J. (2014). Mitochondrial form and function. *Nature*, 505(7483), 335–343. <https://doi.org/10.1038/nature12985>
- Garcia-rejon, J., Loroño-pino, M. A., Farfan-ale, J. A., Flores-flores, L., Rosado-paredes, E. D. P., Rivero-cardenas, N., ... Eisen, L. (2008). Dengue Virus – Infected *Aedes aegypti* in the Home Environment. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 79(6), 940–950. <https://doi.org/79/6/940> [pii]
- Gnaiger, E. (2008). POLAROGRAPHIC OXYGEN SENSORS, THE OXYGRAPH, AND HIGH-RESOLUTION RESPIROMETRY TO ASSESS MITOCHONDRIAL FUNCTION. In J. Dykens & Y. Will (Eds.), *Drug-Induced Mitochondrial Dysfunction* (1st ed., pp. 327–347). Hoboken: Wiley.
- Gnaiger, E. (2014). Respiratory states: coupling control. In *Mitochondrial Pathways and Respiratory Control An Introduction to OXPHOS* (4th ed., pp. 19–31). Innsbruck: OROBOROS MiPNet Publications.
- Gonçalves, R., Machado, A., Paiva-Silva, G., Sorgine, M., Momoli, M., Oliveira, J., ... Oliveira, M. (2009). Blood-feeding induces reversible functional changes in flight muscle mitochondria of *aedes aegypti* mosquito. *PLoS ONE*, 4(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007854>
- González-Calvar, S., & Corini, H. (2004). CONTROL RESPIRATORIO. Buenos Aires: Departamento de Bioquímica Humana. Facultad de Medicina-Universidad de Buenos Aires.
- Hassinen, I. (2014). Mitochondria and Energy Metabolism: Networks, Mechanisms, and Control.

In *Natural Biomarkers for cellular metabolism* (pp. 8–16). Natick: CRC Press.

Ikuma, H. (1970). Necessary conditions for isolation of tightly coupled higher plant mitochondria. *Plant Physiol*, 45(6), 773–781. Retrieved from [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16657390](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16657390)

Katsube, T., Nomoto, S., Togashi, S., Ueda, R., Kobayashi, M., & Takahisa, M. (1997). cDNA sequence and expression of a gene encoding a pyruvate dehydrogenase kinase homolog of *Drosophila melanogaster*. *DNA Cell Biology*, 16(3), 335–339. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9115642>

Lehninger, N., & Cox, M. (2006). Oxidative phosphorylation and photophosphorylation / Biosynthesis of aminoacids, nucleotides and related molecules. In *Principles of biochemistry* (Vol. 17, pp. 708-740 / 833-879). Madison. <https://doi.org/10.1007/s11655-011-0820-1>

Morrison, D. K., Murakami, M. S., & Cleghon, V. (2000). Analysis Protein Kinases and Phosphatases in the *Drosophila* Genome Identification and Classification of *Drosophila* Protein Kinases and Phosphatases. *The Journal of Cell Biology*, 150(2), 57–62. <https://doi.org/10.1083/jcb.150.2.F57>

Pallotti, F., & Lenaz, G. (2001). Isolation and subfraction of mitochondria from animal cells and tissue culture lines. In L. Wilson, P. Matsudaira, E. Schon, & L. Pon (Eds.), *Methods in cell biology* (pp. 2–5). New York: Elsevier.

Patterson, J., Sammon, M., & Garg, M. (2016). Dengue, Zika and Chikungunya: Emerging Arboviruses in the New World. *Western Journal of Emergency Medicine*, XVII(March), 671–679. <https://doi.org/10.5811/westjem.2016.9.30904>

- Pesta, D., & Gnaiger, E. (2009). High-Resolution Respirometry: OXPHOS Protocols for Human Cells and Permeabilized Fibers from Small Biopsies of Human Muscle. In C. Palmeira & A. Moreno (Eds.), *Mitochondrial Bioenergetics Methods and Protocols* (Vol. 531, pp. 25–57). Human Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-239-1\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-239-1_1)
- Picard, M., Taivassalo, T., Gouspillou, G., & Hepple, R. T. (2011). Mitochondria: isolation, structure and function. *The Journal of Physiology*, 589(18), 4413–4421. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.212712>
- 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. *PLoS ONE*, 6(3), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018317>
- Quan, X., Sato-Miyata, Y., Tsuda, M., Muramatsu, K., Asano, T., Takeo, S., & Aigaki, T. (2017). Deficiency of succinyl-CoA synthetase  $\alpha$  subunit delays development, impairs locomotor activity and reduces survival under starvation in *Drosophila*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 483(1), 566–571. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.12.105>
- Rich, P. R., & Maréchal, A. (2010). The mitochondrial respiratory chain. *Essays In Biochemistry*, 47, 1–23. <https://doi.org/10.1042/bse0470001>
- Sánchez-Vásquez, L., & González-Halphen, D. (2017). Topología Y Función De Las Subunidades Intrínsecas De La Membrana De Las F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-Atp Sintasa Mitocondriales. *Tip*, 20(2), 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. [https://doi.org/10.1002/1522-2683\(20001001\)21:16<3329::AID-ELPS3329>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/1522-2683(20001001)21:16<3329::AID-ELPS3329>3.0.CO;2-F)

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)

Voss, D. O., Cowles, J. C., & Bacila, M. (1963). A new oxygen electrode model for the polarographic assay of cellular and mitochondrial respiration. *Analytical Biochemistry*, 6(3), 211–222. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(63\)90128-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(63)90128-3)

World Health Organization. (2014). *A global brief on vector-borne diseases*. World Health Organization. <https://doi.org/WHO/DCO/WHD/2014.1>