

# Aplicación de nanocristales fluorescentes para el estudio de la distribución de neuropéptidos en el mosquito *Aedes aegypti*.

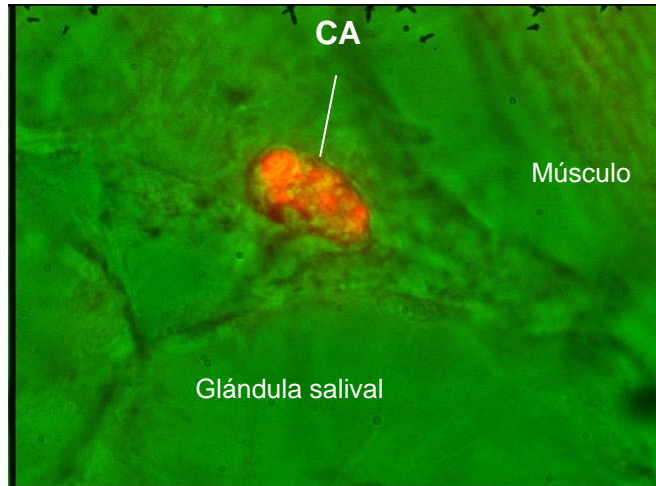
Hernandez-Martínez Salvador, Vinod Subramaniam y Fernando G. Noriega

<sup>1</sup>Centro de Investigaciones Sobre Enfermedades Infecciosas. Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca, Morelos. México. <sup>2</sup>Biophysical Engineering Department. Institute for Nanotechnology. University of Twente. Enschede, Netherlands. <sup>3</sup>Department of Biological Sciences. Florida International University. USA.

shernandez@insp.mx

**INTRODUCCION.** La malaria y dengue son enfermedades infecciosas de gran importancia en la salud pública mundial, las cuales son transmitidas al humano por mosquitos hematófagos. La malaria es causada por un protozooario del género *Plasmodium* y transmitida por mosquitos de género *Anopheles*. El dengue es causada por un virus de la familia arboviridae y transmitido por mosquitos del genero *Aedes*. No obstante el impacto económico y de salud en la población a nivel mundial, es poca la atención que se ha dado a la investigación encaminada a clarificar la compleja interacción entre estos agentes infecciosos y sus mosquitos vectores (los cuales son indispensable por el protozooario y el virus para su desarrollo, mantenimiento y subsiguiente transmisión a humanos). El control primario de estas enfermedades se ha basado en el uso de insecticidas, sin embargo los daños ambientales y la resistencia desarrollada por los insectos a los más eficientes insecticidas químicos, ha reducido significativamente la efectividad de estos esfuerzos de control tradicional. La utilización de compuestos biológicos (por tanto biodegradables) del mismo insecto con efectos específicos y efectivos que permitan un control de las poblaciones de insectos, podría ser una alternativa muy atractiva comparada con los insecticidas tradicionales. El entendimiento de la dinámica en la regulación neuroendocrina en los insectos, es un área de gran interés en la comunidad científica, principalmente en aquellos insectos vectores de enfermedades infecciosas. La hormona juvenil (JH) regula varios aspectos de la fisiología de los insectos: el proceso de muda y metamorfosis en estadios larvales y digestión de sangre, reproducción y maduración de huevos en adultos. De tal forma, la regulación de la JH es crítica para la vida del insecto. El titulo de JH en la hemolinfa es regulado por procesos de biosíntesis y degradación, y es producida en el corpus allatum (CA), el cual a su vez es regulado por neuropéptidos producidos en el cerebro. En la mariposa *Manduca sexta*, éstos neuropéptidos estimulan (allatotropina) o inhiben (allatostatina) la biosíntesis de JH en el CA. Por otra parte, las allatotropinas pueden presentar efectos cardio-aceleradores y/o estimulantes de la contracción de oviductos en mosquitos *Aedes*, lo que sugiere que estos neuropéptidos pueden presentar funciones adicionales de vital importancia para los insectos. Los nanocristales semiconductores, también conocidos como quantum dots (Qdots), son un nuevo tipo de marcadores fluorescentes que han sido utilizados en diferentes estudios que involucran tejidos de vertebrados, pero nunca antes en la investigación en insectos. Los Qdots, en su fase de integración de la nanotecnología y la biología, no presentan los aspectos negativos de las proteínas y fluoróforos orgánicos más comúnmente utilizados como marcadores: el apagamiento, el entrecruzamiento espectral y la estrecha excitación. Por ejemplo, el rojo texas o la proteína verde fluorescente requieren e una gran cantidad de energía para fluorescer, lo cual al mismo tiempo provoca un rápido apagamiento dejando poco tiempo disponible para realizar análisis. Los Qdots presentan una vida media de emisión mucho más larga que cualquier fluoróforo orgánico, mayor luminiscencia y estabilidad. Asimismo, presentan un espectro de excitación muy amplio y uno de emisión muy estrecho, lo que permite utilizar diferentes Qdots, excitarlos con una sola longitud de onda y obtener

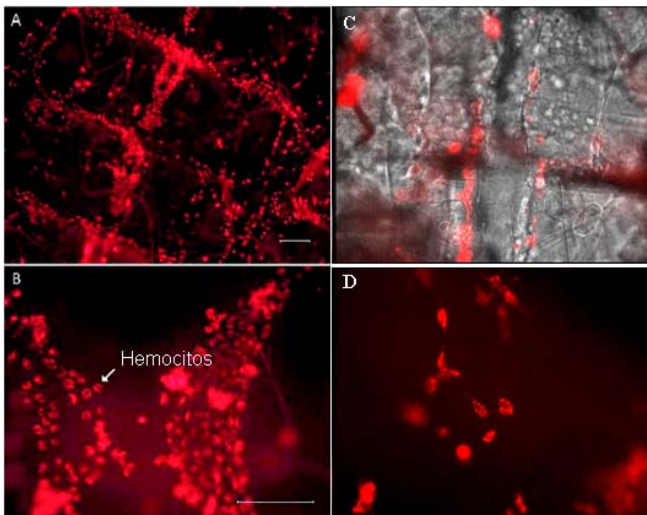
diferentes colores de emisión. Aunque los Qdots ya han sido empleados con vertebrados en diversos estudios *in vitro* e *in vivo*, a la fecha no han sido utilizados para estudios en insectos. **OBJETIVO.** Aplicar la tecnología de los Qdots, para estudiar la regulación hormonal en el mosquito *Aedes aegypti*, el vector más importante de Dengue y fiebre amarilla. **METODOLOGIA.** En nuestro grupo, actualmente contamos con péptidos sintéticos específicos de *Aedes aegypti* (allatotropinas y allatostatinas), los cuales fueron utilizados para ser conjugados con los Qdots. Los Qdots empleados para estos experimentos fueron obtenidos de Quantum Dot Corporation (Hayward, CA). Se emplearon Qdots con emisión a 605 nm (rojo) y a 565 nm (verde) a una concentración de 1µM, los cuales fueron bioconjugados a streptavidina. Los neuropéptidos (allatotropina y allatostatina) biotinilados (Biopeptide. San Diego, CA) fueron conjugados a los Qdots-streptavidina (allatostatina/verde, allatotropina/rojo). Cada Qdot presentó de 5-10 moléculas de streptavidina, dando un total de 20-40 sitios de unión a biotina. El péptido no unido fue removido y los conjugados concentrados en 100 µl de PBS y almacenados a 4°C. La confirmación de la formación de los conjugados se realizó por ensayos de dot blot. Para los ensayos *in vitro*, se realizaron disecciones de diferentes tejidos,



**Figura 1. Cricorte del tórax de *Aedes aegypti* mostrando reconocimiento específico del CA con el Qdot/allatotropina.**

incluyendo el corpus allatum y cerebro, los cuales fueron incubados con los conjugados de allatotropina o allatostatina/Qdot. Asimismo, se realizaron interacciones en cortes histológicos en parafina y en criocortes. Los ensayos *in vivo* se realizaron mediante la inoculación de los bioconjugados diluidos en PBS. Después del

tiempo de interacción, los mosquitos fueron diseccionados para su análisis. Todos los análisis fueron realizados utilizando microscopia de fluorescencia y confocal. **RESULTADOS.** Los experimentos de dot blot mostraron una buena conjugación de los neuropéptidos a los Qdots, lo cual permitió proseguir con los experimentos de interacción en tejidos. Por histología no fue posible observar reconocimiento alguno, sin embargo por la técnica de criocortes en cabeza y tórax del mosquito, se consiguió un reconocimiento muy específico en el CA con el conjugado de allatotropina (Fig. 1). La incubación con



**Figura 2. Interacción *in vivo* del conjugado Qdot/allatotropina en *Aedes aegypti*. A. Región dorsal y ventral del abdomen con intensa señal. B. Magnificación en "A". C. Combinación con contraste de fases mostrando señal en el corazón. D. Células marcadas en membrana pleural.**

los diferentes tejidos diseccionados tampoco permitió reconocimiento en el CA u otros tejidos, sin

embargo los estudios in vivo permitieron observar reconocimiento en diferentes tejidos abdominales, no así en el CA (Fig. 2). En el caso del conjugado con allatostatina, nunca fue posible observar reconocimiento específico en los tejidos. **CONCLUSIONES.** Hemos mostrado que los Qdots pueden ser utilizados en mosquitos para estudiar los sitios blanco de neuropéptidos, los cuales funcionan como reguladores de la síntesis de JH o como neurohormonas en otros tejidos. Esta es la primera vez que los Qdots son empleados para estudios en insectos. Los conjugados de Qdots reconocieron al CA únicamente cuando este se encontró preservado por congelación y en corte, lo que sugiere un recambio rápido de los receptores para los péptidos empleados y una barrera que impide la entrada de los conjugados al CA, que posiblemente sea la lamina basal que presentan todos los tejidos en insectos. Los ensayos in vivo mostraron la actividad pleiotrópica de la allatotropina, principalmente en cuerpo graso, hemocitos, membranas pleurales y corazón.

#### REFERENCIAS.

- [1] Akerman ME, Chan WCW, Laakkonen P, Bathia SN, Ruoslahti E. Nanocrystal targeting in vivo. *Applied Biological Sciences*, 99 (2002) 12617-12621.
- [2] Alivisatos AP, Gu W, Larabell C. Quantum dots as cellular probes. *Ann Rev Biom Enginn*, 7 (2005) 55-76.
- [3] Hernandez-Martinez S, Li Y, Lanz.Mendoza H, Rodriguez MH, Noriega FG. Immunostaining for allatotropin and allatostatin-A and -C in the mosquitoes *Aedes aegypti* and *Anopheles albimanus*. *Cell Tiss Res*, 321 (2005) 105-113.