

ARTÍCULO

**APORTACIONES DE LA ESTUDIANTE Y
LA INVESTIGADORA INDEPENDIENTES
EN LA GENÉTICA Y LA BIOLOGÍA
MOLECULAR**

Dra. María de Lourdes Muñoz

Aportaciones de la estudiante y la investigadora independientes en la genética y la biología molecular

Resumen:

Se explora en este breve ensayo la contribución de un grupo de trabajo muy extenso y dinámico que ha ido cambiando y evolucionando en el tiempo, que seguirá funcionando de una manera activa en el campo de la investigación dirigido por mí durante 26 años. Al inicio, nuestras investigaciones se dirigieron al estudio de la patogenicidad del parásito *Entamoeba histolytica*, dando un giro radical posteriormente enfocándonos al estudio del virus dengue; sabiendo que ambos patógenos se presentan en una alta frecuencia afectando la salud de muchas poblaciones humanas en el mundo incluyendo a la población Mexicana. Finalmente y en paralelo continuamos con investigaciones muy importantes en el área de la genética de poblaciones, que incluye al mosquito *Aedes aegypti* que es el mejor transmisor del virus dengue en América; y de poblaciones humanas prehispánicas y contemporáneas. Además, los estudios genéticos en poblaciones humanas ayudarán a entender el movimiento y la susceptibilidad o resistencia a varias enfermedades y a determinar marcadores genéticos de susceptibilidad o resistencia que nos permitan predecir tempranamente desordenes genéticos que puedan ser benéficos para la sociedad y la prevención del desarrollo de síntomas que resultará en la asistencia médica temprana. Todos estos estudios relativamente recientes en el laboratorio a mi cargo sobre el virus del dengue, el mosquito *Aedes aegypti* y las poblaciones humanas contemporáneas y prehispánicas contribuirán significativamente a la solución de problemas de salud en México.

Palabras clave:

Dengue, *Aedes aegypti*, genética, poblaciones, humanas, contemporáneas, prehispánicas.

Contributions of the independent student and researcher in genetics and molecular biology

Abstract:

These short essays explore the contribution of a very large and active research group that has been changing and evolving over the time and that will be functioning in a dynamic manner following lines of investigation conducted under my direction for 26 years. We started our research with the study of the pathogenesis of the parasite *Entamoeba histolytica*, later we made a radical turn focusing our studies in dengue virus; both pathogens affect many human population's health in the world including those from Mexico with a high frequency. Finally, and in parallel our investigations have continued with very important research areas in population

genetics that includes the mosquito *Aedes aegypti* the best vector for dengue virus transmission in America; and the prehispanic and contemporary human populations. The genetic studies in human populations will help to understand population movements and susceptibility or resistance to various human diseases and to determine genetic markers to predict early genetic disorders that can be beneficial to the society; so we may prevent symptom development with early medical assistance. All these studies on dengue virus, *Aedes aegypti* mosquitoes and the human contemporary and prehispanic populations will contribute to the solution of health problems in Mexico.

Key words:

Dengue, *Aedes aegypti*, genetics, populations, human, contemporary, prehispanic.

Introducción

Quiero iniciar este texto hablando sobre las contribuciones de otras mujeres científicas en la antigüedad, ya que en esos tiempos, a pesar de las restricciones que existían, hubo mujeres que de manera importante aportaron conocimientos a la ciencia y que no se les reconoce en el presente. De esta manera podremos entender más la contribución que actualmente hacemos las mujeres científicas donde de manera definitiva ya tenemos una mayor libertad para estudiar y desarrollarnos en el campo de la investigación científica. Será importante que en el futuro sigamos incrementando nuestra influencia en otras ramas como la política y la administración. Para mí es muy claro que ese futuro también está influenciado por nosotras mismas, ya que incluso en nuestro ámbito existen mujeres que apoyan a los hombres o a interés personales. De los nombres que puedo recordar de estas mujeres científicas de la antigüedad, se encuentran Hypatia de Alexandria y Miriam the Jewess, las cuales crean en ese momento la dicotomía entre los estereotipos femenino y científico. Mujeres que han participado activamente en el desarrollo de la ciencia y su divulgación, existen desde las civilizaciones egipcia, mesopotámica, griega y judía, así como en otras que no abordaremos en este trabajo, pero que pueden ser revisadas en el trabajo escrito por Muñoz-Páez en el año de 1996.

En este trabajo hablaremos de las contribuciones muy importantes que he hecho de manera corta en el inicio como estudiante de posgrado y posteriormente como investigadora independiente. Puedo decir que el éxito obtenido se debe también a la contribución y la colaboración de colegas investigadoras e investigadores, así como de una gran cantidad de estudiantes que han obtenido su grado de licenciatura, maestría o doctorado en mi grupo de investigación.

La investigadora como estudiante de posgrado

El tema inicial con el que trabajé como estudiante de posgrado fue con el parásito *Entamoeba histolytica* que en esos años así como en el presente, era de suma importancia su estudio, ya que infecta alrededor de 50 millones de personas en el mundo, incluyendo la población mexicana, produciendo gastroenteritis en su inicio e infecciones en cualquier otro tejido u órgano en los casos más graves (WHO, 1997). Colaborando con el Dr. Marcos Rojkind, quien desafortunadamente feneció el sábado pasado 10 de septiembre de este año, realizamos todos los estudios de la colagenasa, que es una enzima que le permite a la amiba invadir cualquier tejido del hospedero humano, debido a que todos los tejidos están constituidos por esta proteína, que es el sustrato de la enzima (Muñoz *et al.*, 1982a, 1982b, 1984). En la figura 1 podemos observar la digestión de un gel de colágena nativa tipo I, teñido con rojo de sirio. Después de 30 minutos de incubación se pueden observar las amibas en el centro del gel digiriendo la colágena. Después de 16 horas ya se ve prácticamente toda la colágena digerida y finalmente después de 24 horas se pueden observar los trofozoítos interaccionando con unas cuantas fibras de esta proteína.

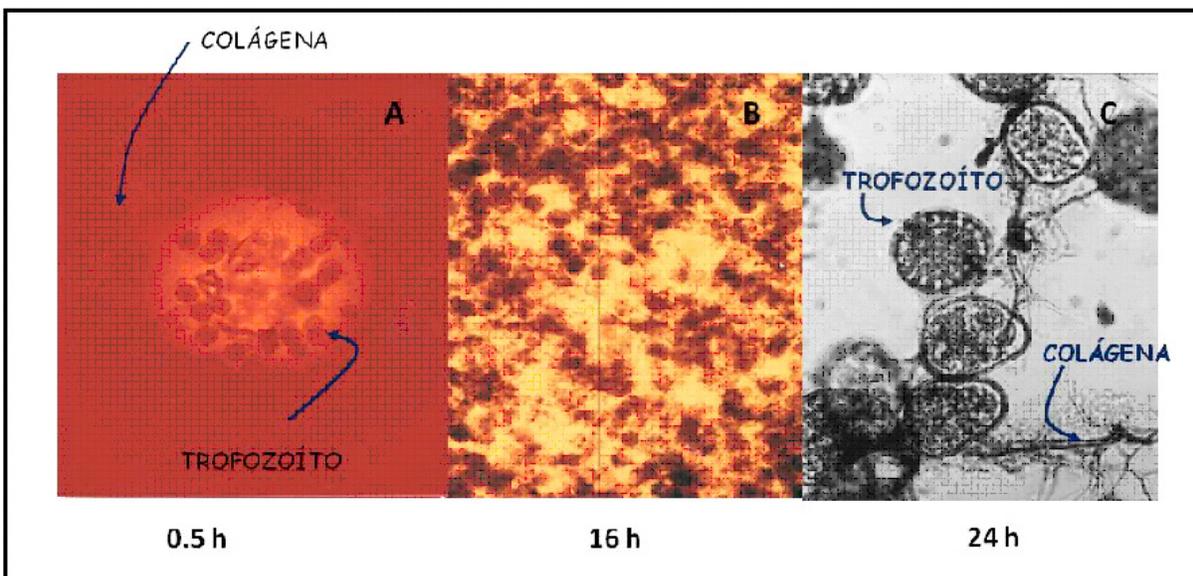


Figura 1. Digestión de un gel de colágena tipo 1 teñido con rojo de sirio por Trofozoitos de *Entamoeba Histolytica*.

De manera sorprendente también descubrimos que cuando los trofozoítos de este parásito interaccionan con la colágena y el calcio, se induce la formación de unos gránulos electrodensos (EDG por sus siglas en ingles, electron-dense granules) que contienen la actividad de colagenasa y guardan una relación con la virulencia del parásito (Muñoz *et al.*, 1984). Asimismo, durante la maestría descubrimos, trabajando con el Dr. Jesús Calderon, el “capping” que forma este

parásito cuando interacciona con anticuerpos específicos (figura 2), que sugerimos podría estar participando en la evasión de la respuesta inmune por los trofozoítos de *E. histolytica* (Muñoz et al., 1978; Calderón *et al.*, 1980). Esto apoyándonos en el hecho de que los trofozoítos después de cierto tiempo liberan al medio extracelular los "caps", llevando consigo los anticuerpos (figura 3). Como estudiante posdoctoral en el laboratorio del Dr. Eugene Weinbach en el NIH, mi trabajo experimental se enfocó al parásito protozoario *Giardia lamblia* en la detección de la proteína reguladora calmodulina dependiente de calcio (Muñoz *et al.*, 1987) y el transporte de calcio y catabolismo del adenosín trifosfato (Muñoz *et al.*, 1988). Estos estudios me permitieron realizar análisis de regulación de la calmodulina en *E. histolytica* ya como investigadora independiente y en colaboración con el Dr. Eugene Weinbach.

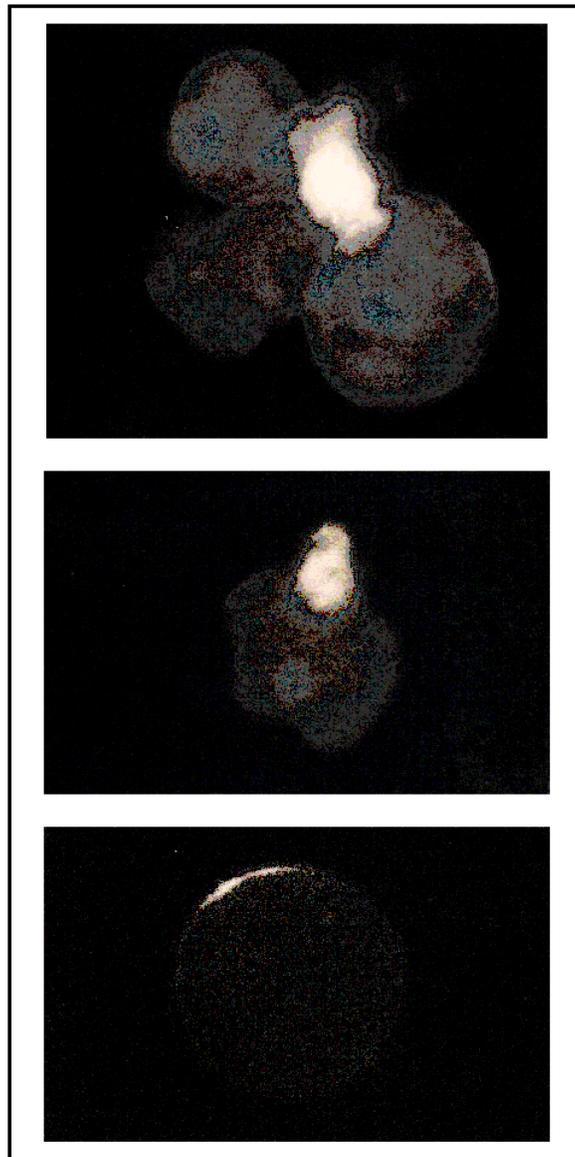


Figura 2. Caps en Trofozoítos de Entamoeba.

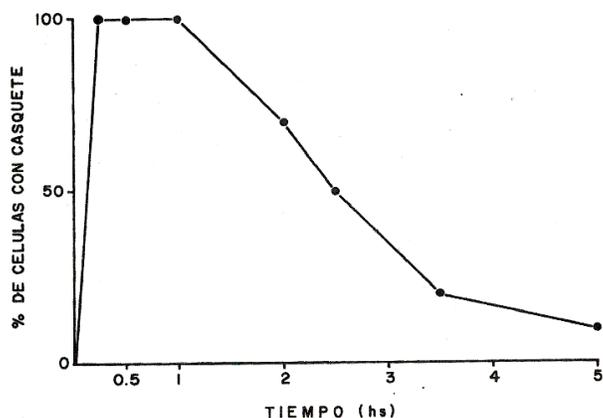


Figura 3. Liberación de los CAPs de los Trofozoítos de Entamoeba.

La investigadora independiente

Ya como investigadora independiente continuamos nuestros estudios sobre los mecanismos de regulación del proceso del desenquistamiento de *Giardia lamblia* (Bernal *et al.*, 1998) y los mecanismos de patogénesis de los trofozoítos de *E. histolytica* trabajando con la regulación de la secreción de los EDG (figura 4) que contienen a la colagenasa por la calmodulina y el papel de la clatrina (Muñoz *et al.* 1991, 1992; Arias-Negrete *et al.*, 1999; Sánchez-López *et al.*, 2007; Tovar *et al.*, 2000), así como la caracterización de estos (Leon *et al.* 1997) y su posible papel en su patogénesis (Muñoz *et al.*, 1990; Muñoz *et al.*, 1991). También determinamos la actividad de la colagenasa en cultivo monoxénico del parásito (Magos *et al.*, 1992) esto último en colaboración con la Química Margarita de la Torre, reconocida como la investigadora que contribuyó significativamente al campo de la investigación en la amibiasis. En la regulación de la secreción de los EDG también demostramos la participación del citoesqueleto mediante estudios de microscopía electrónica y confocal de fluorescencia (Muñoz *et al.*, 1997b, 2001) y la transducción de señales (Pérez *et al.*, 1996; Pérez *et al.*, 1998).

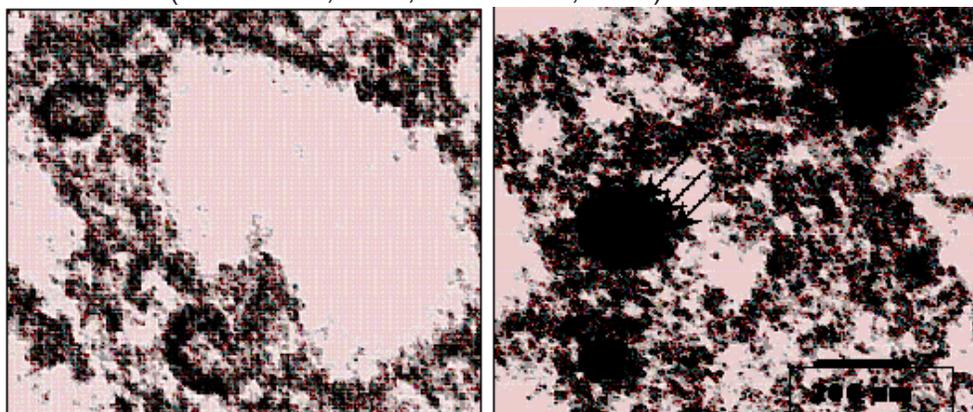


Figura 4. Microscopía electrónica de los granulos electrodensos de Entamoeba Histolytica

También demostramos la secreción de proteasas inducidas por la interacción de la ameba con la colágena tipo I y calcio y demostramos que una mutante con la virulencia alterada tenía una menor actividad de colagenasa con la consecuente disminución de los EDG al medio extracelular (Serrano *et al.*, 1994; Serrano *et al.*, 1996). La participación de estudiantes de Licenciatura, Maestría, Doctorado y la QFB Rosalinda Tovar fue esencial durante el desarrollo de este proyecto.

De estos estudios se derivó la obtención de anticuerpos monoclonales anti-EDG para el diagnóstico de los trofozoítos patógenos de *E. histolytica* (Arias-Negrete *et al.*, 2001) lo que permitió la obtención de una patente para el diagnóstico de este parásito (Muñoz, 1997a).

Genética de Poblaciones Humanas Prehispánicas y Contemporáneas

Los estudios de genética de poblaciones parece algo muy complicado, sin embargo, si lo vemos desde el punto de vista de la información que nos puede proporcionar el ocuparnos de este tema, nos daremos cuenta de que es altamente importante e interesante. La primera pregunta que nos podemos hacer es ¿y qué información me dará este tipo de estudios? La respuesta es que me permitirá determinar la migración y la dispersión de las poblaciones humanas o de cualquier otro ser vivo sobre la faz de la tierra. En el caso de los estudios en poblaciones humanas, además nos permitirá determinar marcadores genéticos de susceptibilidad o resistencia a diversas enfermedades, incluyendo por ejemplo la diabetes, la hipertensión, el envejecimiento, el dengue, entre otras, y como hablaremos posteriormente también nos permitirá saber cómo se dispersan las enfermedades virales, tales como el dengue a través de su mosquito vector transmisor, ya que este también tiene diferentes susceptibilidades a la infección por éste y otros virus.

Las investigaciones sobre poblaciones humanas incluyen aquellas que son contemporáneas o las que existieron antes de la llegada de los españoles o prehispánicas en América. Por lo tanto nuestras investigaciones en genética de poblaciones humanas son de suma importancia dentro del contexto histórico y de la herencia a la susceptibilidad o resistencia a las diversas enfermedades que nos aquejan como seres humanos.

Realizar estudios de genética de poblaciones humanas incluye la extracción del DNA tanto nuclear como el de las mitocondrias (figura 5) a partir de muestras de saliva, de sangre, de cabello, etcétera, de individuos pertenecientes a diversas poblaciones contemporáneas (indígenas, africanas, europeas y todas aquellas que surgen de la mezcla de éstas), lo que es relativamente sencillo, ya que la extracción del DNA se facilita por encontrarse íntegro.

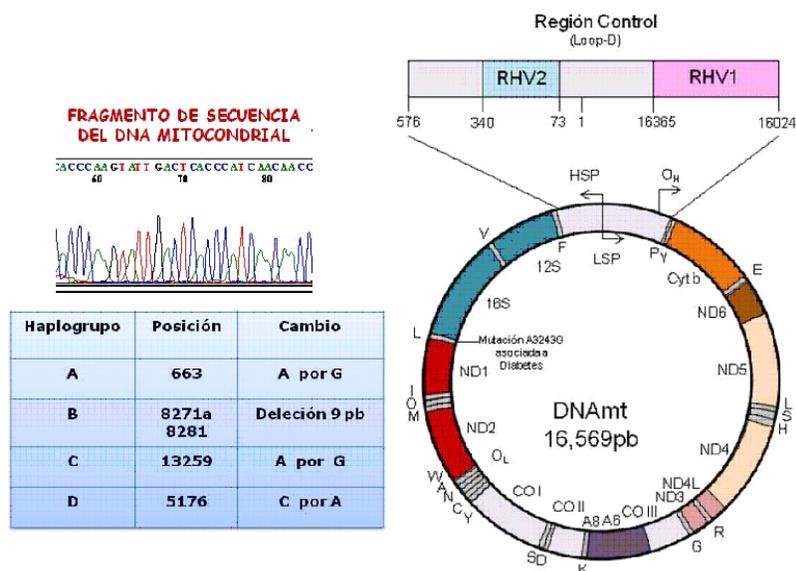
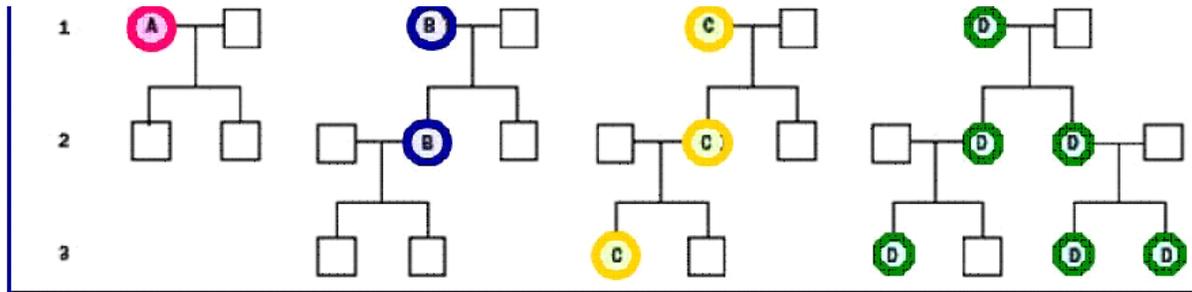


Figura 5. Localización de los polimorfismos que determinan los cuatro Haplogrupos Amerindios

Sin embargo, cuando queremos extraer DNA de muestras de poblaciones prehispanicas, se complica su extracción debido a que éste se encuentra degradado. Y de ahí que prácticamente en todos los estudios que existen de muestras antiguas se prefiere realizar las investigaciones con el DNA mitocondrial (mtDNA), ya que éste se encuentra en múltiples copias dentro de cada célula y es circular, lo que lo protege más de la degradación, incrementando la posibilidad de estudiarlo mediante técnicas de biología molecular. Adicionalmente, el mtDNA no recombina y se hereda exclusivamente por la vía materna (figura 6), lo que se conoce como herencia matrilineal. Esto quiere decir que las mujeres son las únicas que heredan de manera integra su genoma del mtDNA a toda su descendencia. En la figura 6 podemos seguir la línea materna por los círculos que representa a la mamá y los cuadros que representan a los padres masculinos podemos ver que no heredan a su descendencia su DNA mitocondrial. Heredan solamente el genoma del cromosoma Y, que sería la manera de darle seguimiento a la herencia por vía paterna. Este hecho también nos permite seguir la migración de las poblaciones desde el origen de la humanidad hasta nuestros tiempos (Behar, *et al.*, 2007; Pereira *et al.*, 2009). Actualmente apoyados en los estudios de genética de poblaciones, es aceptado que los humanos modernos comparten un ancestro que vivió en África hace aproximadamente 60,000 años (Ingman *et al.*, 2000)



***Los círculos de colores representan los individuos femeninos, cada círculo representa un haplotipo mitocondrial (secuencia específica) que se va heredando de un individuo femenino al siguiente y así sucesivamente. Cuando el DNA mitocondrial es heredado a un individuo masculino entonces se pierde ese haplotipo.**

Figura 6. Herencia del DNA mitocondrial

En América, por las secuencias específicas del mtDNA de cada grupo poblacional, se han descrito cuatro haplogrupos principales, que son el A, B, C, y D. Existe un quinto haplogrupo llamado X, pero que se encuentra en una frecuencia muy baja. Estos haplogrupos nos permiten separar a las poblaciones amerindias y han permitido determinar que el origen de las poblaciones indígenas es de Asia (<http://www.scs.illinois.edu/~mcdonald/worldmtnamap.pdf>).

Los estudios de genética de mi grupo de investigación han contemplado a las poblaciones prehispánicas de Monte Albán, Teotihuacán, Tenochtitlán, Palenque, Bonampak, Toluquilla, Sierra Gorda en Altamira (Muñoz *et al.*, 2010), entre otras (figura 7). Todos estos estudios se han realizado en colaboración con investigadores en antropología, arqueología, clínica y genética.

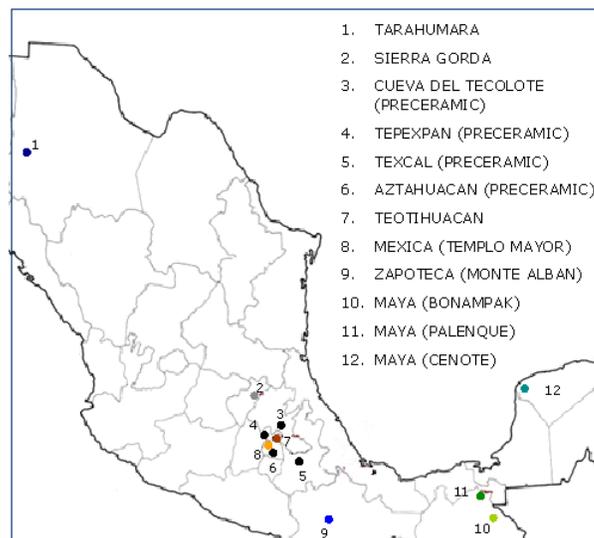


Figura 7. Poblaciones prehispánicas en estudio

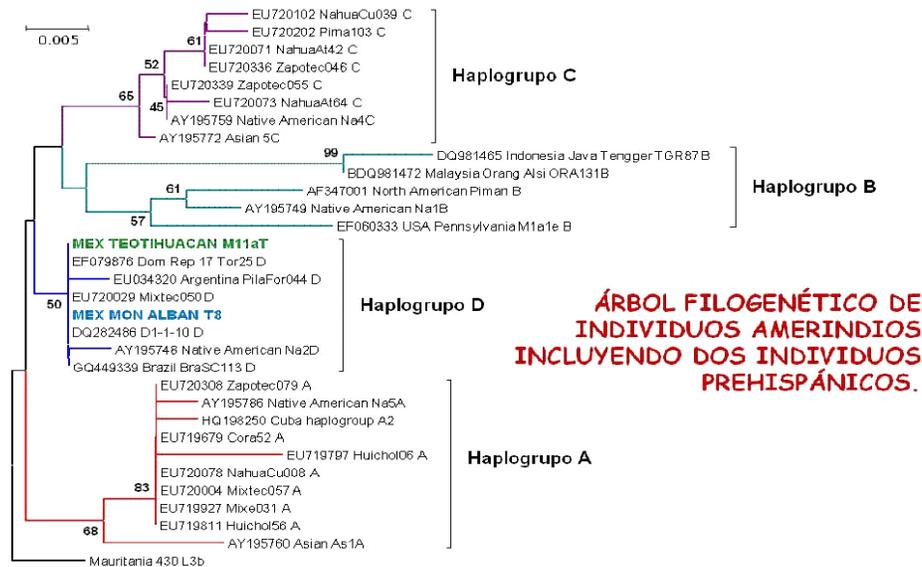
Dentro de las muestras estudiadas se incluyen restos óseos precerámicos cuya edad es mayor a los 10,000 años. La extracción del DNA total se hace en condiciones de esterilidad y usando cubreboca y guantes para maniular las muestras (Figura 8) con el objetivo de no contaminarlas con nuestro propio DNA. Dentro de los encuentros importantes que hemos hecho está el haber determinado que el hombre de Tepexpan es una mujer (Martínez-Meza *et al.*, 2005). También hicimos estudios en algunos restos de momias distribuidas a lo largo de la Republica Mexicana y una muy especial llamada Pepita encontrada en una cueva en la Sierra Gorda Queretana por la Dra. Elizabeth Mejía y que tiene una antigüedad de aproximadamente 2,000 años (Bustos-Ríos *et al.*, 2008; Herrera-Salazar *et al.*, 2008; López-Armenta *et al.*, 2008). En este momento es la momia más antigua encontrada en México.



*Las fotografías fueron tomadas del laboratorio 1 del Departamento de Genética y Biología Molecular por López-Armenta Mauro.

Figura 8. Purificación del DNA de muestras prehispánicas

Con las secuencias que hemos obtenido estamos haciendo los análisis de filogenia y redes para la caracterización de las poblaciones y la determinación de los haplotipos ya desaparecidos. Un ejemplo de este análisis lo podemos ver en la figura 9. Cada rama del árbol representa un haplotipo y cada grupo de muestras dentro de una rama mayor representa un haplogrupo. En este árbol tenemos separada cada rama mayor con un color para distinguir los haplogrupos amerindios A, B, C, D. Las muestras prehispánicas dentro del árbol filogenético en verde es del Barrio de Monte Albán en Teotihuacán y la que está en azul es de Monte Albán. Aquí lo que podemos observar es que los individuos pertenecientes a las muestras de Teotihuacán del Barrio de Oaxaca tienen haplogrupo D (figura 9). Dentro de este análisis incluimos las secuencias de individuos pertenecientes a poblaciones contemporáneas indicados en la misma figura 9, así como secuencias representativas de cada haplogrupo reportadas en el GenBank del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/>).



Muñoz et al., 2011

Figura 9. Árbol filogenético de individuos amerindios, incluyendo dos individuos prehispánicos

La importancia de estudiar la secuencia del mtDNA radica en el hecho de que cuando existen mutaciones o deleciones dentro de su secuencia, se manifiestan diversas enfermedades que son muy graves, ya que esto provoca el mal funcionamiento de las mitocondrias que son las responsables de proveer a las células de la energía necesaria para su buen funcionamiento. Por esto el otro objetivo de nuestro trabajo en este momento es determinar mutaciones específicas en las poblaciones mexicanas contemporáneas y prehispánicas para determinar su frecuencia en ambas poblaciones y hacer estudios de asociación con enfermedades que aquejan a los mexicanos, como lo es la diabetes (proyecto apoyado por el Instituto de Ciencia y Tecnología de la Ciudad de México).

Recientemente y en colaboración con la Dra. Rocío Gómez, que es la experta en el análisis de estructuración de poblaciones, analizamos poblaciones contemporáneas mestizas mediante el uso de marcadores STR (Noris *et al.*, 2011). Este proyecto fue apoyado por el Instituto de Ciencia y Tecnología de la Ciudad de México.

Genética de Poblaciones de los mosquitos *Aedes aegypti*

Los mosquitos *Ae. aegypti* son los transmisores de flavivirus, dentro de los cuales se encuentra el dengue y la fiebre amarilla (Gubler, 2011). En los setenta se hizo una campaña en México para erradicar al mosquito y con esto las epidemias de la fiebre amarilla. Sin embargo, conforme pasó el tiempo, el mosquito nuevamente se propagó debido a la ausencia de campañas de control del mosquito y a que el mosquito no fue erradicado en otros países del continente Americano (Tapia-Conyer *et al.*, 2009), de ahí surgió el incremento paulatino de la enfermedad del dengue.

Esto quiere decir que si nosotros eliminamos al mosquito vector, entonces seremos capaces de eliminar no sólo a la enfermedad del dengue, sino también a otras enfermedades. De ahí surgió la idea de estudiar al mosquito y determinar cuántas diferentes poblaciones de mosquitos existían en México y cómo era la competencia vectorial (CV) del mosquito para transmitir al virus. Entendiéndose como competencia vectorial a la permisividad del artrópodo vector a infectarse, replicarse y transmitir al virus (Hardy 1988, Woodring et al. 1996). La transmisión de los virus dengue (DENV) involucra la interacción de éste (serotipos 1-4) con el mosquito *Ae. aegypti* que es el más prevalente en el ciclo humano-mosquito (figura 10).

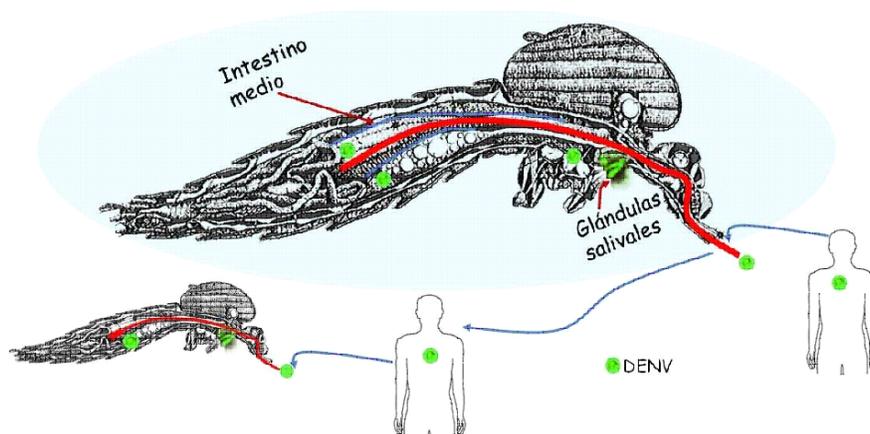


Figura 10. Ciclo del DENV en el humano y en el mosquito *Aedes aegypti*

Cuando este mosquito ingesta sangre virémica, el virus tiene que pasar varias barreras antes de que pueda ser transmitido al nuevo hospedero vertebrado. Primero el virus encuentra la barrera del intestino medio (MIB) del mosquito que debe de ser sobrepasada para que el virus infecte exitosamente las células del epitelio del intestino medio. Si la infección del intestino medio (MI) es establecida, entonces ahora el virus debe de ser capaz de escapar de las células epiteliales para esparcirse al resto de los tejidos del mosquito para establecer la infección diseminada (DI). Si el virus no puede escapar del intestino medio del mosquito entonces este tiene la barrera de escape en el intestino medio (MEB). Finalmente, el virus debe de infectar a las glándulas salivales y ser liberado en la saliva para que ocurra la transmisión al siguiente hospedero (Black *et al.*, 2002). La genética de la CV para flavivirus ha sido estudiada extensivamente en *Ae. aegypti* seleccionando cepas con diferente susceptibilidad y resistencia a la infección o diseminación del virus (Bennet *et al.*, 2002; Gómez-Machorro *et al.*, 2004). La determinación de la viremia se hace después de catorce días de que el mosquito toma la sangre virémica, para lo cual los mosquitos son congelados. Se determina la infección en la cabezas de los mosquitos por inmunofluorescencia con anticuerpos anti-dengue (Bennett *et al.*, 2002); si la reacción es positiva entonces nos indica ID. Cuando el antígeno viral no se detecta en el tejido de la cabeza, entonces

se busca al virus en los abdómenes correspondientes. La detección del virus en el abdomen revela MI. Mediante este procedimiento se obtuvieron las cepas de *Ae. aegypti* con diferente susceptibilidad a la infección por dengue, DS3 (altamente susceptible a la infección), DMEB (barrera de escape), y *Ae. aegypti formosus* que fue resistente a la infección (Bennett *et al.*, 2005).

Los estudios de genética de poblaciones se desarrollaron en colaboración con los doctores Barry Beaty, William Black y Ken Olson de la Universidad de Colorado en Fort Collins, con el apoyo muy importante de un donativo otorgado por el NIH (National Institute of Health), la participación substancial del Dr. Idefonso Fernández de la UANL y un gran número de estudiantes. Las investigaciones se hicieron mediante la amplificación, secuenciación y alineamiento de una región de 387-pb de la NADH 4 (Adenine Dinucleotide Deshidrogenasa subunidad 4), que es una enzima codificada por el mtDNA de los mosquitos (Gorrochotegui-Escalante *et al.*, 2000; Gorrochotegui-Escalante *et al.*, 2002; García-Franco *et al.*, 2002). Después de coleccionar larvas de este mosquito en toda la República Mexicana y llevarlas a adultos, determinamos que en México existen al menos 21 diferentes haplotipos. Asimismo, encontramos que los mosquitos coleccionados tienen diferente susceptibilidad a ser infectados por los virus, esto es, tienen diferente competencia vectorial. Por ejemplo los mosquitos coleccionados en Moloacán, Veracruz, tienen una baja competencia vectorial comparados con por ejemplo los de Monterrey (Bennet *et al.*, 2002). Esto dio como resultado la generación de nuevos estudios en el área geográfica de Moloacán, Veracruz, que han sido publicados recientemente para determinar la susceptibilidad de los mosquitos *Ae. aegypti* a ser infectados en esa región; observamos que en esa área geográfica existe un gradiente de susceptibilidad de los mosquitos a ser infectados por el virus (Lozano Fuentes *et al.*, 2009).

El Dengue

El Dengue es una enfermedad producida por el virus dengue (DENV), que es un flavivirus de RNA de cadena sencilla de polaridad positiva que codifica para una poliproteína constituida por tres proteínas estructurales y 7 no-estructurales (Whitehorn *et al.*, 2011). Las proteínas estructurales forman la partícula viral, mientras que las proteínas no estructurales participan en la replicación del genoma de RNA, ensamblaje del virión y la evasión de la respuesta inmune innata (Noble *et al.*, 2010; Rodenhuis-Zybert *et al.*, 2010).

Por ser un virus de RNA, éste evoluciona muy rápidamente y está constituido por cuatro serotipos y cada serotipo se forma por diversos genotipos (tabla 1). Cuando una persona es infectada por un serotipo y posteriormente por otro, está bajo el riesgo de sufrir lo que se conoce como fiebre hemorrágica y cuando el paciente no es atendido puede inclusive llegar a la muerte por el shock de dengue. La enfermedad febril, conocida como dengue clásico, en muchas ocasiones puede

confundirse con otras enfermedades con síntomas similares y de ahí la importancia del desarrollo de métodos de diagnóstico. La otra causa del dengue hemorrágico es cuando una persona es infectada por el DENV-2, genotipo asiático, ya que se sabe que en América se empezaron a presentar los casos de dengue hemorrágico cuando se introdujo el DENV-2 genotipo asiático.

	DENV-1	DENV-2	DENV-3	DENV-4
Genotipos	I	Asiático I	I	I
	II	Asiático II	II	II
	III	Asiático/Americano	III	III
	IV	Cosmopolita	IV	IV
	V	Americano Selvático		

Tabla 1. Serotipos y genotipos del virus Dengue

El DENV, para entrar a la célula e infectarla, necesita primero interaccionar con las proteínas de la superficie de ésta, para posteriormente internalizarse y replicarse dentro de ésta. Por lo cual requiere de receptores específicos, los cuales ya han sido descritos en células de vertebrados (Guzman et al., 2010).

En el caso de la desregulación de la respuesta inmune originada por células T, la cascada de reacciones inicia con la infección por DENV de células dendríticas inmaduras, cuyo receptor putativo y blanco inicial es la molécula de adhesión DC-SIGN (Tassaneeritthep *et al.*, 2003). En el caso de los mosquitos en el laboratorio hemos determinado que el intestino medio de éstos tiene un receptor principal con un peso molecular de aproximadamente 67 kDa, ya que anticuerpos específicos por esta proteína bloquean la infección de las células de mosquitos C6/36 (Mercado-Curiel *et al.*, 2006).

En los últimos años, muchos otros receptores candidatos para unirse a DENV han sido identificados no sólo en células del hospedero humano (Guzman *et al.*, 2010; Moreno-Altamirano *et al.*, 2002), sino también en el mosquito vector *Ae. aegypti* (Muñoz *et al.*, 1998; Mercado-Curiel *et al.*, 2006, 2008). En la figura 11 se puede observar el reconocimiento de los anticuerpos anti la proteína de 67 kDa (panel superior) y anti la proteína E del DENV (panel inferior) hacia las células del intestino medio de los mosquitos de las diferentes cepas con diferente susceptibilidad mencionadas en el párrafo anterior. Es muy clara la ausencia de fluorescencia en la cepa de mosquitos con resistencia a la infección por el virus, así como el bajo reconocimiento del receptor putativo al DENV. Lo anterior hace pensar que el DENV puede utilizar diversas moléculas para ingresar a la célula (Rodenhuis-Zybert *et al.*, 2010). Muñoz *et al.* (1998) encontraron dos polipéptidos de 67 y 80 kDa que interactúan con DENV-2 en un estudio realizado en células C6/36 de *Ae. albopictus*. Enseguida Moreno-Altamirano *et al.* (2002) en la línea celular de monocitos U-937 determinaron dos receptores putativos a DENV-2 con masa molecular de 45 y 67 kDa, respectivamente.

Asimismo, Mercado-Curiel *et al.* (2006) confirmaron que todos los serotipos del DENV interactúan con las proteínas de 67 y 80k kDa descritas previamente por Muñoz *et al.* (1998). Mientras que Mercado-Curiel *et al.* (2008) encontraron que la proteína de 67/64 kDa podría incluso ser usada como marcador de competencia vectorial.

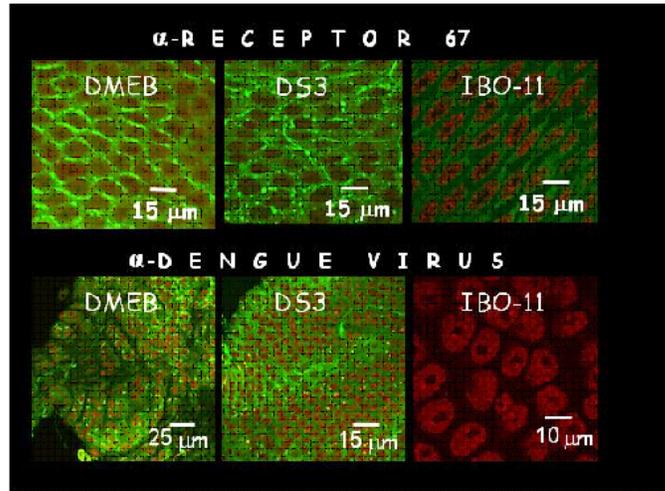


Figura 11. Inmunofluorescencia confocal de intestinos medios de mosquitos *Ae. Aegypti* infectados con DENV-2 e incubados con anticuerpos anti-proteína-67 o anti-proteína E de DENV.

Estudios de genética de los diferentes aislados de las epidemias de dengue del 2000-2001 (Cisneros-Solano *et al.*, 2004) nos permitieron determinar que éstos tienen aminoácidos específicos característicos en los virus que pueden servir como marcadores de genotipo, así como determinar cómo el virus va evolucionando en cada región geográfica, en este caso específico en Oaxaca y Veracruz, México (Cisneros *et al.*, 2006; Gardella-García *et al.*, 2006). En estos trabajos determinamos cómo aislados de la epidemia del 2005-2006 de Oaxaca y Veracruz presentaron un DENV-2 que se separó en una rama diferente a la de la epidemia del 2000-2001 (figura 12).

LAS SECUENCIAS DEL ESTADO DE OAXACA Y VERACRUZ DEL 2005-2006 SE AGRUPAN EN UNA MISMA RAMA CON LAS SECUENCIAS DE LAS CEPAS PROVENIENTES DE LAS ISLAS DEL CARIBE A PARTIR DE 1997. MIENTRAS QUE LAS SECUENCIAS DEL BROTE DEL 2001 SE AGRUPAN CON SECUENCIAS DEL BROTE DE JAMAICA DE 1983.

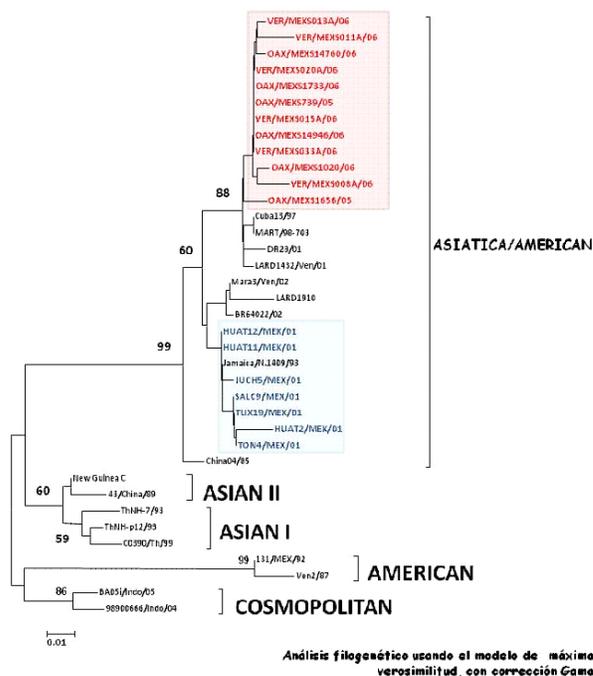


Figura 12. Filogenia de genes C-PrM del dengue serotipo 2

Otro fenómeno importante que ocurre en los virus de RNA es la recombinación, que es un proceso que resulta en la producción de un nuevo genoma, derivado de dos genomas parentales. Para el caso de los virus la recombinación ocurre cuando una célula es infectada con dos virus relacionados. El nuevo virus derivado de esta manera es llamado virus recombinante. La recombinación genética que involucra el intercambio de secuencias entre dos RNAs genómicos no segmentados, fue descrito por primera vez para el poliovirus en la década de 1960. Tanto en los virus de DNA como de RNA puede llevarse a cabo la recombinación. La primeras evidencias de recombinación se mostraron con el virus de la influenza por Burnet y Lind (1951).

Se han reportado casos de recombinación en virus de RNA, tales como el virus de la Hepatitis (Belalov *et al.*, 2011), la rubeola (Adams *et al.*, 2002), la poliomielitis (Korsun, *et al.*, 2009) entre otros. Para el caso del DENV, uno de los primeros reportes de recombinación fue hecho por Worobey *et al.* (1999). En dicho reporte se desarrolló un análisis “in silico” para la detección de recombinantes naturales en secuencias publicadas de todos los serotipos del DENV, utilizando principalmente los genes C, prM, E y NS1.

En México, Perez-Ramirez *et al.* (2009) reportaron por primera vez recombinantes en el DENV-2 en aislados de pacientes del estado de Oaxaca, pertenecientes al brote de dengue del 2005-

2006. En dicho trabajo se encontraron dos aislados recombinantes conteniendo uno y dos puntos de rompimiento en las regiones que codifican para las proteínas estructurales prM y E, respectivamente. Además, se encontraron secuencias virales parentales y recombinantes de la proteína E en un solo individuo, siendo ésta la primera observación en un caso proveniente de sueros de pacientes infectados con DENV. El estudio de la recombinación en virus es muy importante, no solamente para quienes estudian su evolución, sino también en el desarrollo de vacunas, ya que la recombinación de una cepa vacunal atenuada puede dar como resultado una cepa infectiva por su recombinación con una cepa silvestre infectiva que se encuentre en la naturaleza. Esto ya se ha documentado por ejemplo en los poliovirus que producen la poliomielitis, donde se han reportado casos de niños que después de haber sido vacunados han presentado la enfermedad y donde se ha encontrado que esto se debió a la recombinación de la cepa vacunal con una cepa silvestre (Korsun *et al.*, 2009).

Conclusiones

Hemos contribuido a diferentes ramas de la investigación, incluyendo patógenos como la *Entamoeba histolytica* y las virales como el Dengue y a la genética de poblaciones humanas prehispánicas y contemporáneas. Asimismo, se ha hecho una contribución importante a la genética de poblaciones del mosquito *Ae. aegypti* y a la susceptibilidad que tiene para ser infectado y para transmitir el virus del dengue. En el caso del virus del dengue, además de estudiar la parte molecular en cuanto al reconocimiento del receptor específico en el intestino medio del mosquito, también hemos estudiado su genética para determinar marcadores de genotipo y su relación con el incremento en los casos de dengue hemorrágico. Es muy importante mencionar que en la actualidad los estudios de genética molecular están y resolverán muchas preguntas que se tienen acerca de las enfermedades que nos aquejan como población humana y en otros organismos que favorecerán la salud en el mundo.

Referencias

Arias-Negrete S, Muñoz ML, Murillo-Jaso F. Expression of in vitro virulence by *Entamoeba histolytica*: effect of calmodulin inhibitors. *APMIS*. 1999;107:875-881.

Arias-Negrete S, León G, Anaya-Velázquez F, Tovar R, Moreno MA, Hernández JM, Muñoz ML. Recognition of carbohydrate epitopes specific for electron-dense granule antigens from *Entamoeba histolytica* by monoclonal antibodies in the cecal content of infected hamsters. *Curr Microbiol*. 2001;43(6):403-7.

Behar DM, Rosset S, Blue-Smith J, Balanovsky O, Tzur S, Comas D, Mitchell RJ, Quintana-Murci L, Tyler-Smith C, Wells RS; Genographic Consortium. The Genographic Project public participation mitochondrial DNA database. *PLoS Genet*. 2007;3(6):e104.

Belalov IS, Isaeva OV, Lukashev AN. Recombination in hepatitis A virus: evidence for reproductive isolation of genotypes. *J Gen Virol.* 2011;92(Pt 4):860-72.

Bennett KE, Beaty BJ, Black IV WC. Selection of D2S3, an *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) strain with high oral susceptibility to Dengue 2 virus and D2MEB, a strain with a midgut barrier to Dengue 2 escape. *J Med Entomol.* 2005;42(2):110-119.

Bennett KE, Olson KE, Muñoz Mde L, Fernandez-Salas I, Farfan-Ale JA, Higgs S, Black WC 4th, Beaty BJ. Variation in vector competence for dengue 2 virus among 24 collections of *Aedes aegypti* from Mexico and the United States. *Am J Trop Med Hyg.* 2002;67(1):85-92.

Bernal RM, Tovar R, Santos JI, Muñoz ML. Possible role of calmodulin in excystation of *Giardia lamblia*. *Parasitol Res.* 1998;84(9):687-93.

Black WC 4th, Bennett KE, Gorrochótegui-Escalante N, Barillas-Mury CV, Fernández-Salas I, de Lourdes Muñoz M, Farfán-Alé JA, Olson KE, Beaty BJ. Flavivirus susceptibility in *Aedes aegypti*. *Arch Med Res.* 2002;33(4):379-88.

Burnet FM, Lind PE. A genetic approach to variation in influenza viruses; recombination of characters in influenza virus strains used in mixed infections. *J Gen Microbiol.* 1951;5(1):59-66.

Bustos-Ríos D, López-Armenta M, Moreno-Galeana MA, Herrera-Salazar A, Pérez-Campos EM, Chávez-Balderas X, Muñoz ML. Purification of DNA from an ancient child mummy from Sierra Gorda, Queretaro. *Mummies and Science. Worl Mummies Research/Proceediñgs of the VI World Congress on Mummy Studies (Teguise, Lanzarote=; Pablo Atoche, Conrado Rodríguez and Ma. Angeles Ramírez (eds.) Santa Cruz de Tenerife: Academia Canaria de la Historia (etc.), 2008. p 700. ISBN: 978-84-612-5647-1. 2008 de esta edición: Academia Canaria de la Historia, Ayuntamiento de Teguise, Cabildo Insular de Lanzarote, Caja Canarias, Fundación Canaria Mapfre Guanarteme, Universidad de las Palmas de Gran Canaria. Primera Edición, 2008. Pp. 259-266.*

Calderón J, de Lourdes Muñoz M, Acosta HM. Surface redistribution and release of antibody-induced caps in *Entamoebae*. *J Exp Med.* 1980;151(1):184-93.

Cisneros-Solano A, Moreno-Altamirano, MMB, Martínez-Soriano U, Jiménez-Rojas F, Díaz-Badillo A, Muñoz ML. Sero-epidemiological and virological investigation of dengue infection in Oaxaca, México, during 2000-2001. *WHO/SEARO Dengue Bulletin.* 2004;28: 28-33.

Cisneros A, Díaz-Badillo A, Cruz-Martínez G, Tovar R, Ramírez-Palacios LR, Jiménez-Rojas F, Beaty B, Black WC 4th, de Lourdes Muñoz M. Dengue 2 genotypes in the state of Oaxaca, Mexico. *Arch Virol.* 2006;151(1):113-25.

Gubler DJ. Emerging vector-borne flavivirus diseases: are vaccines the solution? *Expert Rev Vaccines.* 2011;10(5):563-5.

Gardella-Garcia CE, Perez-Ramirez G, Navarrete-Espinosa J, Cisneros A, Jimenez-Rojas F, Ramírez-Palacios LR, Rosado-Leon R, Camacho-Nuez M, Muñoz Mde L. Specific genetic markers for detecting subtypes of dengue virus serotype-2 in isolates from the states of Oaxaca and Veracruz, Mexico. *BMC Microbiol.* 2008;8:117.

Gomez-Machorro C, Bennett KE, del Lourdes Muñoz M, Black WC 4th. Quantitative trait loci affecting dengue midgut infection barriers in an advanced intercross line of *Aedes aegypti*. *Insect Mol Biol.* 2004;13(6):637-48.

Gorrochotegui-Escalante N, Gomez-Machorro C, Lozano-Fuentes S, Fernandez-Salas L, De Lourdes Muñoz M, Farfan-Ale JA, Garcia-Rejon J, Beaty BJ, Black WC 4th. Breeding structure of *Aedes aegypti* populations in Mexico varies by region. *Am J Trop Med Hyg.* 2002;66(2):213-22.

Gorrochotegui-Escalante N, Muñoz ML, Fernandez-Salas I, Beaty BJ, Black WC 4th. Genetic isolation by distance among *Aedes aegypti* populations along the northeastern coast of Mexico. *Am J Trop Med Hyg.* 2000;62(2):200-9.

García-Franco F, Muñoz Mde L, Lozano-Fuentes S, Fernandez-Salas I, Garcia-Rejon J, Beaty BJ, Black WC 4th. Large genetic distances among *Aedes aegypti* populations along the South Pacific coast of Mexico. *Am J Trop Med Hyg.* 2002;66(5):594-8.

Guzman MG, Halstead SB, Artsob H, Buchy P, Farrar J, Gubler DJ, Hunsperger E, Kroeger A, Margolis HS, Martínez E, Nathan MB, Pelegrino JL, Simmons C, Yoksan S, Peeling RW. Dengue: a continuing global threat. *Nat Rev Microbiol.* 2010;8(12 Suppl):S7-16.

MITOCHONDRIAL DNA: WORLD HAPLOGROUP DISTRIBUTION: <http://www.scs.illinois.edu/~mcdonald/worldmtdnamap.pdf>

Herrera-Salazar A, Bustos-Ríos D, López-Armenta M, Moreno-Galeana MA, Martínez-Meza A, Muñoz ML. Mitochondrial DNA analysis of mummies from the North of México. *World Mummies Research/Proceedings of the VI World Congress on Mummy Studies* (Teguise, Lanzarote; Pablo Atoche, Conrado Rodríguez and Ma. Angeles Ramírez (eds.) Santa Cruz de Tenerife: Academia Canaria de la Historia (etc.), 2008. p 700. ISBN: 978-84-612-5647-1. 2008 de esta edición: Academia Canaria de la Historia, Ayuntamiento de Teguise, Cabildo Insular de Lanzarote, Caja Canarias, Fundación Canaria Mapfre Guanarteme, Universidad de las Palmas de Gran Canaria. Primera Edición, 2008. Pp. 417-422.

Ingman M, Kaessmann H, Pääbo S, Gyllensten U. Mitochondrial genome variation and the origin of modern humans. *Nature.* 2000;408(6813):708-13.

Korsun N, Kojouharova M, Vladimirova N, Fiore L, Litvinenko I, Buttinelli G, Fiore S, Voynova-Georgieva V, Mladenova Z, Georgieva D. Three cases of paralytic poliomyelitis associated with 20 -xx

type 3 vaccine poliovirus strains in Bulgaria. *J Med Virol.* 2009;81(9):1661-7.

León G, Fiori C, Das P, Moreno M, Tovar R, Sánchez-Salas JL, Muñoz ML. Electron probe analysis and biochemical characterization of electron-dense granules secreted by *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol.* 1997;85(2):233-42.

López-Armenta M, Bustos-Ríos D, Moreno-Galeana MA, Herrera-Salazar A, Pérez-Campos EM, Chávez-Balderas X, Muñoz ML. Genetic origin of a mummy from Queretaro (Pepita). *Mummies and Science. Worl Mummies Research/Proceedings of the VI World Congress on Mummy Studies (Teguise, Lanzarote=; Pablo Atoche, Conrado Rodríguez and Ma. Angeles Ramírez (eds.) Santa Cruz de Tenerife: Academia Canaria de la Historia (etc.), 2008. p 700. ISBN: 978-84-612-5647-1. 2008 de esta edición: Academia Canaria de la Historia, Ayuntamiento de Teguise, Cabildo Insular de Lanzarote, Caja Canarias, Fundación Canaria Mapfre Guanarteme, Universidad de las Palmas de Gran Canaria. Primera Edición, 2008. pp. 251-258.*

Lozano-Fuentes S, Fernandez-Salas I, de Lourdes Munoz M, Garcia-Rejon J, Olson KE, Beaty BJ, Black WC 4th. The Neovolcanic Axis is a Barrier to Gene Flow among *Aedes aegypti* Populations in Mexico That Differ In Vector Competence for Dengue 2 Virus. *PLoS Negl Trop Dis.* 2009;3(6):e468.

Magos MA, de la Torre M, Muñoz ML. Collagenase activity in clinical isolates of *Entamoeba histolytica* maintained in xenic cultures. *Arch Med Res.* 1992;23(2):115-8.

Martínez-Meza A, Moreno-Galeana M, Díaz-Badillo A, Maya L, Muñoz ML. Fin de la controversia: El Hombre de Tepexpan es molecularmente una mujer. *Diario del Campo.* 2005;77: 37-39.

Mercado-Curiel RF, Esquinca-Avilés HA, Tovar R, Díaz-Badillo A, Camacho-Nuez M, Muñoz Mde L. The four serotypes of dengue recognize the same putative receptors in *Aedes aegypti* midgut and *Ae. albopictus* cells. *BMC Microbiol.* 2006;6:85.

Mercado-Curiel RF, Black WC 4th, Muñoz Mde L. A dengue receptor as possible genetic marker of vector competence in *Aedes aegypti*. *BMC Microbiol.* 2008;8:118.

Moreno-Altamirano MM, Sánchez-García FJ, Muñoz ML. Non Fc receptor-mediated infection of human macrophages by dengue virus serotype 2. *J Gen Virol.* 2002;83(Pt 5):1123-30.

Muñoz ML, Acosta H and Calderón J. Distribución de antígenos superficiales en *Entamoebas* y su caracterización inmunoquímica. *Arch Invest Méd (Méx.).* 1978;9 (Supl. 1): 183-190.

Muñoz ML, Calderón J, Rojkind M. The collagenase of *Entamoeba histolytica*. *J Exp Med.* 1982a;155(1):42-51.

Muñoz ML, Calderón J, Rojkind M. Presence of collagenolytic activity in trophozoites of *Entamoeba histolytica*. *Arch Invest Med (Mex).* 1982b;13 Suppl 3:191-202.

Muñoz ML, Rojkind M, Calderón J, Tanimoto M, Arias-Negrete S, Martínez-Palomo A. *Entamoeba histolytica*: collagenolytic activity and virulence. J Protozool. 1984;31(3):468-70.

Munoz ML, Weinbach EC, Wieder SC, Claggett CE, Levenbook L. Giardia lamblia: detection and characterization of calmodulin. Exp Parasitol. 1987;63(1):42-8.

Munoz ML, Claggett CE, Weinbach EC. Calcium transport and catabolism of adenosine triphosphate in the protozoan parasite Giardia lamblia. Comp Biochem Physiol B. 1988;91(1):137-42.

Muñoz ML, Lamoyi E, León G, Tovar R, Pérez-García J, De La Torre M, Murueta E, Bernal RM. Antigens in electron-dense granules from *Entamoeba histolytica* as possible markers for pathogenicity. J Clin Microbiol. 1990;28(11):2418-24.

Muñoz Mde L, Moreno MA, Pérez-García JN, Tovar GR, Hernandez VI. Possible role of calmodulin in the secretion of *Entamoeba histolytica* electron-dense granules containing collagenase. Mol Microbiol. 1991;5(7):1707-14.

Muñoz ML, O'Shea-Alvarez MS, Pérez-García J, Weinbach EC, Moreno MA, de la Torre M, Magos MA, Tovar R. Purification and biochemical properties of calmodulin in *Entamoeba histolytica* and its distribution during secretion of electron-dense granules. Comp Biochem Physiol B. 1992;103(3):517-21.

Muñoz-Páez A. Historia y Epistemología de las Ciencias: Algunas contribuciones de la mujer a las ciencias experimentales. Enseñanza de las Ciencias. 1996; 14(2), 233-237.

Muñoz ML. Patente Extranjera. Process to obtain monoclonal and polyclonal antibodies useful to identify pathogenic amebiasis and pathogenic *Entamoeba histolytica* trophozoites. Issued as No. 5,661,010. Agosto 16, 1997a.

Muñoz ML, Das P, Tovar R. The cytoskeleton in *Entamoeba histolytica* during EDG secretion. Arch Med Res. 1997b;28 Spec No:193-4.

Muñoz ML, Cisneros A, Cruz J, Das P, Tovar R, Ortega A. Putative dengue virus receptors from mosquito cells. FEMS Microbiol Lett. 1998;168(2):251-8.

de Lourdes Muñoz M, Das P, Tovar R. *Entamoeba histolytica* trophozoites activated by collagen type I and Ca(2+) have a structured cytoskeleton during collagenase secretion. Cell Motil Cytoskeleton. 2001;50(1):45-54.

Muñoz ML, Pérez-Ramírez G, Díaz-Badillo A y Morales-Gómez MC. La genética de poblaciones prehispánicas mexicanas y su importancia. Editores: G. Álvarez, I. Bus, C. Castañeda, J. Guevara, I. Romero, H. Vázquez. Mensaje Bioquímico, Vol. XXXIV, pg. 31-42, 2010.

Noris G, Santana C, Munoz M.L, Castaneda-Montes F, Majluft-Cruz A., Meraz-Ríos MA, Revilla MC, Magana JJ, Martínez-Salas S, Lucio-Monter PF, Xihuitl S, Martínez de la Escalera G, Díaz-22 -xx

Badillo A. and Gómez R. Sub-structure effect on genetic and forensic statistical parameters in Mexican mestizos. *Molecular Biology Methods* 2011. Enviado.

Pereira L, Freitas F, Fernandes V, Pereira JB, Costa MD, Costa S, Máximo V, Macaulay V, Rocha R, Samuels DC. The diversity present in 5140 human mitochondrial genomes. *Am J Hum Genet.* 2009;84(5):628-40.

Pérez E, Muñoz ML, Ortega A. *Entamoeba histolytica*: involvement of pp125FAK in collagen-induced signal transduction. *Exp Parasitol.* 1996;82(2):164-70.

Pérez E, Muñoz ML, Ortega A. *Entamoeba histolytica*: collagen-induced AP-1 DNA binding activity. *FEMS Microbiol Lett.* 1998;159(2):187-92.

Perez-Ramirez G, Diaz-Badillo A, Camacho-Nuez M, Cisneros A, Munoz Mde L. Multiple recombinants in two dengue virus, serotype-2 isolates from patients from Oaxaca, Mexico. *BMC Microbiol.* 2009;9:260.

Rodenhuis-Zybert IA, Wilschut J, Smit JM. Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. *Cell Mol Life Sci.* 2010;67(16):2773-86. Review.

Sánchez-López KB, López-Pérez MI, Tovar-Gallegos R and Muñoz M.L. Distribution of clathrin during electron dense granule secretion of *Entamoeba histolytica* trophozoites. Pp. 13-19. Editor: Boeree M. J. 2007.

Serrano JJ, de la Garza M, Moreno MA, Tovar R, León G, Tsutsumi V, Muñoz ML. *Entamoeba histolytica*: electron-dense granule secretion, collagenase activity and virulence are altered in the cytoskeleton mutant BG-3. *Mol Microbiol.* 1994;11(4):787-92.

Serrano JJ, de la Garza M, Reyes M, León G, Tovar R, Muñoz MK. *Entamoeba histolytica*: proteinase secretion induced by collagen type I is dependent on cytoskeleton integrity. *Parasitol Res.* 1996;82(3):200-5.

Tapia-Conyer R, Méndez-Galván JF, Gallardo-Rincón H. The growing burden of dengue in Latin America. *J Clin Virol.* 2009;46 Suppl 2:S3-6.

Tassaneeritthep B, Burgess TH, Granelli-Piperno A, Trumpfheller C, Finke J, Sun W, Eller MA, Pattanapanyasat K, Sarasombath S, Birx DL, Steinman RM, Schlesinger S, Marovich MA. DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J Exp Med.* 2003;197(7):823-9.

Tovar R, Murguía-López ML, de Lourdes Muñoz M. Immunolocalization of clathrin during electron-dense granule secretion in *Entamoeba histolytica*. *Arch Med Res.* 2000 Jul-Aug;31(4 Suppl):S143-4.

Whitehorn J, Simmons CP. The pathogenesis of dengue. *Vaccine.* 2011;29(42):7221-8.

World Health Organization (WHO). A consultation with experts on amebiasis. *Epidem Bull PAHO* 1997; 18:13-14.

Worobey M, Rambaut A, Holmes EC. Widespread intra-serotype recombination in natural populations of dengue virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(13):7352-7.

Yap LJ, Luo D, Chung KY, Lim SP, Bodenreider C, Noble C, Shi PY, Lescar J. Crystal structure of the dengue virus methyltransferase bound to a 5'-capped octameric RNA. *PLoS One*. 2010;5(9).