



Título del artículo.

Identificación proteómica de la Paramiosina, proteína inducida por la hematofagia en el estómago de la chinche *Meccus pallidipennis*, vector de la enfermedad de Chagas.

Título del artículo en idioma Inglés.

Proteomic identification of Paramyosin, protein induced by hematophagy in the stomach of the bedbug *Meccus pallidipennis* as a vector of Chagas disease.

Autores.

Jorge Isidoro Sotelo Cano
Alejandro Millán Vega
Eduardo Castañeda Saucedo
Donaciano Flores Robles
José Lino Zumaquero Ríos
Alicia Chagolla López
Pável Sierra Martínez

Referencia bibliográfica:

MLA

Sotelo Cano, Jorge Isidoro, Alejandro Millán Vega, Eduardo Castañeda Saucedo, Donaciano Flores Robles, José Lino Zumaquero Ríos, Alicia Chagolla López y Pável Sierra Martínez. Identificación proteómica de la Paramiosina, proteína inducida por la hematofagia en el estómago de la chinche *Meccus pallidipennis*, vector de la enfermedad de Chagas. *Tlamati* 8.1, (2017): 38-41. Print.

APA

Sotelo Cano, J. I., Millán Vega, A., Castañeda Saucedo, E., Flores Robles, D., Zumaquero Ríos, J. L., Chagolla López, A. y Sierra Martínez, P. (2017). Identificación proteómica de la Paramiosina, proteína inducida por la hematofagia en el estómago de la chinche *Meccus pallidipennis*, vector de la enfermedad de Chagas. *Tlamati*, 8(1), 38-41.

ISSN: 2007-2066.

Publicado el 30 de Junio del 2017

© 2017 Universidad Autónoma de Guerrero

Dirección General de Posgrado e Investigación

Dirección de Investigación

TLAMATI, es una publicación semestral de la Dirección de Investigación de la Universidad Autónoma de Guerrero. El contenido de los artículos es responsabilidad exclusiva de los autores y no refleja de manera alguna el punto de vista de la Dirección de Investigación de la UAGro. Se autoriza la reproducción total o parcial de los artículos previa cita de nuestra publicación.



Identificación proteómica de la Paramiosina, proteína inducida por la hematófagia en el estómago de la chinche *Meccus pallidipennis*, vector de la enfermedad de Chagas.

Jorge Isidoro Sotelo Cano¹
Alejandro Millán Vega²
Eduardo Castañeda Saucedo³
Donaciano Flores Robles⁴
José Lino Zumaquero Ríos⁵
Alicia Chagolla López⁶
Pável Sierra Martínez^{1*}.

¹Universidad Autónoma de Guerrero. Unidad de Investigación Especializada en Microbiología (UIEM). Laboratorio de Control Biológico. Calle sin Nombre No. 13, Col. Las Colinas, Petaquillas, Guerrero, México. C.P. 39105. Tel: + (52) 747 1224631.

²Universidad Autónoma de Guerrero. Unidad de Investigación Especializada en Microbiología. Laboratorio de Biología Celular.

³Universidad Autónoma de Guerrero. Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas. Laboratorio de Biología Celular del Cáncer.

⁴Universidad Autónoma de Guerrero. Unidad de Investigación Especializada en Microbiología. Laboratorio de Biología Molecular.

⁵Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Laboratorio de Parásitos.

⁶Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Irapuato. Departamento de Biotecnología y Bioquímica. Unidad de Investigación Especializada en Microbiología.

*Autor de correspondencia
pavelsierra6@hotmail.com

Resumen

Meccus pallidipennis son insectos del orden Hemiptera, mismos que son vectores de la enfermedad de Chagas. Estos insectos son hematófagos estrictos y su sistema digestivo está dividido en tres regiones: anterior (estómago), media y posterior. Hasta el momento no se han identificado proteínas en el estómago de estos organismos involucradas en la digestión de la sangre que ingieren durante su alimentación. En este trabajo mediante estrategias proteómicas identificamos una proteína que mostró expresión diferencial en los diferentes tiempos analizados. Se utilizaron estómagos de machos alimentados con sangre de conejo siendo disectados a los 7, 15, 50 y 70 días postalimentación. Las proteínas totales fueron separadas por SDS-PAGE en geles al 10%. Se seleccionó una banda de ~100 kDa para su identificación por Cuadrupolo-ToF MS/MS, identificando una proteína de la familia de las miosinas, la Paramiosina, proteína que tiene actividad motora y se encuentra involucrada en procesos de contracción y relajación, hasta el momento solo se puede sugerir su función en base a la homología que presenta con las proteínas identificadas en *Sarcoptes scabiei*, *Dermatophagoides farinae* y *Boophilus microplus*, organismos que tienen contacto con sangre durante su alimentación.

Palabras clave: paramiosina, *Meccus pallidipennis*, proteómica, hematófagia

Como citar el artículo:

Sotelo Cano, J. I., Millán Vega, A., Castañeda Saucedo, E., Flores Robles, D., Zumaquero Ríos, J. L., Chagolla López, A y Sierra Martínez, P. (2017). Identificación proteómica de la Paramiosina, proteína inducida por la hematófagia en el estómago de la chinche *Meccus pallidipennis*, vector de la enfermedad de Chagas. *Tlamati*, 8(1), 38-41.

Abstract

Meccus pallidipennis are insects of order Hemiptera which are vectors of Chagas disease. These insects are strict hematophagous and their digestive system is divided into three regions: anterior (stomach), middle and posterior. So far, proteins involved in the digestion of the blood they ingest during their feeding have not been identified within the stomach of these organisms. In this study, by mean of use of proteomic strategies we identified a protein that showed differential expression in different times analyzed. Stomachs of males fed with rabbit blood were dissected at 7, 15, 50 and 70 days post-feeding. Total of proteins were separated by SDS-PAGE in 10% gels. A band of ~ 100 kDa was selected for identification by Quadrupolo-ToF MS / MS, identifying a protein of the family of myosins known as Paramiosina, a protein that has mobile activity and is involved in processes of contraction and relaxation. At this moment, we can suggest its function based on the homology that this proteint presents with proteins identified in *Sarcoptes scabiei*, *Dermatophagoides farinae* and *Boophilus microplus*, organisms that have contact with blood during their feeding.

Keywords: *Meccus pallidipennis*, proteomics, hematophagy

Introducción

La subfamilia Triatominae está organizada en 6 tribus con 19 géneros, se encuentra integrada por insectos hematófagos capaces de transmitir el parásito *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas. En México se piensa que esta enfermedad es poco común, debido a los pocos casos documentados, sin embargo es probable que al igual que en otras enfermedades exista un subregistro por falta de un diagnóstico adecuado (Rodríguez Do-

mínguez, 2002). Los triatominos presentan un desarrollo hemimetabólico con fases de huevo, cinco estadios ninfales y adulto, siendo hematófagos estrictos. A nivel de digestión se requiere de una completa serie de adaptaciones fisiológicas para los hematófagos obligados, debido a que la sangre es una fuente nutricionalmente rica, pero es altamente alcalina, y muchas de las proteínas están dentro de las células sanguíneas. La saliva de los insectos hematófagos contiene sustancias anticoagulantes, antihistamínicas, vasodilatadoras y antiplaquetarias que facilitan el proceso

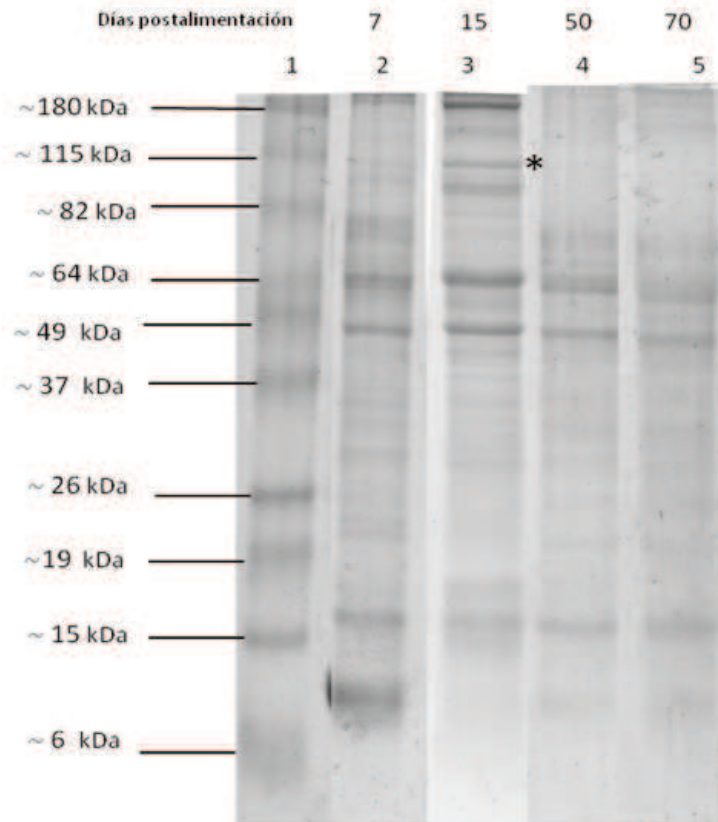


Figura 1.- Proteínas totales de los estómagos de *Meccus pallidipennis*. Carril 1.- Marcadores de peso molecular. Carril 2.- a los 7 días. Carril 3.- a los 15 días. Carril 4.- a los 50 días. Carril 5.- a los 70 días. Se señala con un asterisco la banda seleccionada para su identificación por Quadrupolo-TOF.

Tabla 1.- Identificación por Quadrupolo-TOF/MS de la proteína de interés.

Nombre	P.M* (Da)	Cobertura' (%)	Mowse score^	Organismo	Localización©	Función celular
Paramiosina¹	102.455	62	166	<i>Sarcoptes scabiei</i>	Citoplasma	Actividad motora
Paramiosina¹	81,372	62	165	<i>Dermatophagoides farinae</i>	Filamentos gruesos	Miosina Contracción/relajación muscular.
Paramiosina¹	101.992	75	143	<i>Boophilus microplus</i>		

de alimentación sobre el huésped vertebrado, que en promedio tarda entre 10 y 20 minutos, el volumen de sangre que pueden ingerir las ninfas oscila entre 8 y 9 veces su peso corporal, y en los adultos de 2 a 4 veces. Los triatominos requieren una hemolisina para lisar las células sanguíneas y un sistema para acidificar la sangre ingerida antes de poder ser digerida. Estos insectos deben hacer uso de catepsinas como proteasas, las cuales solo son activas a pH ácido (Schofield y Galvão, 2009).

Los hemípteros, no presentan una membrana peritrófica verdadera, sin embargo, su epitelio intestinal no está en contacto directo con el bolo sanguíneo, debido a la presencia de una membrana perimicrovellosa (Albuquerque-Cunha, Gonzalez, García, Mello, Azambuja, Almeida, de Souza, et al., 2009). Una vez que los Triatomas han ingerido sangre, esta permanece sin ser digerida en el estómago, como es conocida la región anterior del intestino, el cual está dividido en tres regiones: anterior, medio y posterior. Durante la ingesta se liberan hormonas diuréticas que eliminan el exceso de agua e iones los cuales son transportados a través de la membrana del estómago; la hemolinfa es conducida hacia los túbulos de Malpighi y posteriormente al recto, mientras que la sangre concentrada entra en pequeñas porciones en la región digestiva del intestino (Kollien y Billingsley, 2002).

Las nuevas técnicas de espectrometría de masas se basan en la digestión de las proteínas separadas en gel y el análisis de los péptidos para determinar con gran precisión su masa y/o obtener su secuencia de aminoácidos. La técnica más utilizada por sencillez y capacidad de procesamiento de múltiples muestras es la identificación de la huella peptídica, que se realiza por digestión con tripsina y análisis de la masa de los péptidos resultantes por espectrometría de masas MALDI-TOF. (Casado-Vela, Cebrián, Gómez del Pulgar, Sánchez-López, Vilaseca, Menchén, Diema et al., 2011).

Materiales y métodos.

Insectos

Meccus pallidipennis, fueron proporcionados por el Laboratorio de Parásitos y Vectores de la escuela de Biología dependiente de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla [BUAP]. Se utilizaron 90 machos adultos que se alimentaron con sangre de conejo durante 20 minutos al inicio del estudio, para posteriormente ser sacrificados a los 7, 15, y 70 días postalimentación, descartando los que no se alimentaron. El estómago se colocó en una caja de

Petri y se agregaron 5 mL de PBS frío 1X pH 7.4 para eliminar los restos de sangre. Los estómagos se guardaron en un tubo Eppendorf junto con 1 mL de PBS 1x pH 7.4 y se almacenaron -20 °C hasta su uso.

Extracción de proteínas.

Se agregó 1 mL de PBS frío 1X pH 7.4 junto con 5 mL de regulador de lisis frío (250 mM sacarosa, 2 mM KH₂PO₄, 8 mM K₂HPO₄, 1 mM EDTA) (Frutero, Rubiolo y Canavoso, 2009) y una solución de inhibidores de proteasas (IA 10 mM, PMSF 10mM, TLCK 10mM, NEM 10 mM; SIGMA) a los estómagos, posteriormente fueron macerados en un tubo Eppendorf con un pistilo homogenizador de plástico y estéril, dando golpes durante 5 minutos. El homogenizado celular se guardó a -20°C hasta su uso.

Cuantificación de proteínas.

Las proteínas se cuantificaron utilizando el método de Bradford (Bradford, 1976)

SDS y espectrometría de masas.

El análisis se realizó mediante la separación de las proteínas en relación a su peso molecular, utilizando geles de poliacrilamida en presencia de duodecil-sulfato de sodio (PAGE-SDS) unidimensional al 10 %. Para las proteínas de cada una de las secciones se colocó 40 µg de proteína y se tiñeron con azul de Coomassie coloidal. Para calcular el peso molecular de las proteínas se utilizó un grupo de proteínas conocidas usadas como marcadores de peso molecular (Invitrogen). Para la identificación de las proteínas de interés resueltas por PAGE-SDS, se seleccionó una banda que al ser teñida con azul de Coomassie mostró una mayor concentración y una expresión diferencial. La banda se cortó con una navaja estéril, portando guantes para evitar contaminación, y se colocó en un tubo para microcentrifuga de 1.5 mL, se etiquetó y almaceno a -20 °C. La banda se envió para su identificación por Quadrupolo-TOF MS/MS al Departamento de Biotecnología y Bioquímica del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN, Unidad Irapuato. El coeficiente carga/masa (m/z) obtenido por Quadrupolo-TOF se analizó en bases de datos accesibles en los sitios del National Center for Biotechnology Information [NCBI] (2014) y ExPASy Proteomics Server (Swiss Institute of Bioinformatics [SIB] 2014). La proteína identificada se analizó mediante el programa computacional MASCOT (Matrix Science, 2014)

Resultados

La alimentación con sangre indujo cambios en el patrón de expresión de proteínas de los estómagos de la chinche, los cuales fueron analizadas mediante SDS-PAGE al 10 % a diferentes tiempos postalimentación (véase figura 1).

En el espectro de la banda de 100 kDa se observó un patrón de 28 péptidos de los cuales 4 alinearon con los péptidos de las bases de datos identificando a una proteína de la familia de las paramiosinas, proteínas implicadas en funciones como: contracción y relajación muscular, con actividad motora y en algunos casos como un alérgeno importante (véase tabla 1), mientras que 6 péptidos no alinearon con ninguna proteína conocida.

Discusión y conclusiones

En el trabajo realizado por Silva, Mury, Oliveira, Oliveira, Silva y Dansa-Petretski en 2007, reportaron que el ciclo digestivo en estos insectos comprende aproximadamente 21 días, tiempo en el cual degradan toda la sangre ingerida. Una vez que los triatomas han ingerido alimento, la sangre permanece sin digerirse en el estómago, posteriormente la sangre concentrada entra en pequeñas porciones en la región digestiva del intestino (Kollien y Billingsley, 2002; Balczun, Siemanowski, Pausch, Helling, Marcus, Stephan, Meyer et al., 2012). Esto es lo que se ha reportado que ocurre en el estómago de los triatomas, al que únicamente se le considera como un sitio de almacenamiento, sin embargo en el presente trabajo se aporta evidencia que sugiere que en el estómago se expresan proteínas que pueden tener como finalidad la digestión del alimento ingerido. En este trabajo se reporta por primera vez, en *Meccus pallidipennis*, una proteína que pertenece a la familia de las paramiosinas, proteínas filamentosas presentes en el músculo de los invertebrados, con una estructura secundaria de α -hélice superenrollada que forma homodímeros. Es una proteína reportada en organismos como: *Sarcoptes scabiei*, *Dermatophagoides farinae*, *Boophilus microplus*, siendo los dos primeros ácaros y el último la garrapata común quienes tienen contacto con sangre durante su alimentación, sugiriendo que dicha proteína está relacionada con la digestión de la sangre ingerida, ya que hasta el momento no se han reportado trabajos que describan la expresión de proteínas en el estómago relacionadas con la hematofagia en este organismo.

Referencias

Albuquerque-Cunha, J. M., Gonzalez, M. S., García, E. S., Mello, C. B., Azambuja, P., Almeida, J. C. A., de Souza,

- W. y Nogueira, N. F. S. (2009). Cytochemical characterization of microvillar and perimicrovillar membranes in the posterior midgut epithelium of *Rhodnius prolixus*. *Arthropod Struct Dev*, 38(1): p. 31-44.
- Balczun C., Siemanowski J, Pausch JK, Helling S, Marcus K, Stephan C, Meyer HE, Schneider T, Cizmowski C, Oldenburg M, Höhn S, Meiser CK, Schuhmann W, Schaub GA. (2012). Intestinal aspartate proteases TiCatD and TiCatD2 of the hematophagous bug *Triatoma infestans* (Reduviidae): Sequence characterization, expression pattern and characterization of proteolytic activity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*; 42: 240-250.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochem*. 72:248-254.
- Casado-Vela J, Cebrián A, Gómez del Pulgar M, Sánchez-López E, Vilaseca M, Menchén L, Diema C, Sellés-Marchart S, Martínez-Esteso MJ, Yubero N, Bru-Martínez R, Lacal JC. 2011. Lights and shadows of proteomic technologies for the study of protein species including isoforms, splicing variants and protein post-translational modifications. *Proteomics*, 11, 590-603.
- Frutero Leonardo L, Edilberto R. Rubiolo, Lilia'n E. Canavoso. 2009. Biochemical and cellular characterization of lipophorin-midgut interaction in the hematophagous *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*; 39: 322-331.
- Kollien, A. H. y Billingsley, P. F. (2002). Differential display of mRNAs associated with blood feeding in the midgut of the bloodsucking bug, *Triatoma infestans*. *Parasitol Res*. 88(12): p. 1026-33.
- Matrix Science (2014). MASCOT software. Obtenido de: <http://www.matrixscience.com/>
- National Center for Biotechnology Information (2014). ANALYZE. Obtenido de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/home/analyze/>
- Rodríguez Domínguez J. 2002. Las enfermedades Transmitedas por vector en México. *Rev. Fac. Med. UNAM*; Vol 45: 126-141.
- Swiss Institute of Bioinformatics (2014). ExPASy. Obtenido de: <http://www.expasy.org/>
- Schofield C. J. y Galvão C. (2009). Classification, evolution, and species groups within the Triatominae, *Acta Tropica* 110 88-100.
- Silva, J.R., Mury FB, Oliveira MF, Oliveira PL, Silva CP. y Dansa-Petretski M. (2007). Perimicrovillar membranes promote hemozoin formation into *Rhodnius prolixus* midgut. *Insect Biochem Mol Biol*, 37(6): p. 523-31.