



Título del artículo.

Expresión diferencial de proteínas en el estómago de la chinche *Meccus pallidipennis*, vector de la enfermedad de Chagas.

Título del artículo en idioma Inglés.

Differential expression of proteins in the stomach of *Meccus pallidipennis* as vector of Chagas disease.

Autores.

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

Referencia bibliográfica:

MLA

Sotelo Cano, Jorge Isidoro. Alejandro Millán Vega, Eduardo Castañeda Saucedo, Donaciano Flores Robles, José Lino Zumaquero Ríos, José Alejandro Martínez Ibarra, Pável Sierra Martínez. "Expresión diferencial de proteínas en el estómago de la chinche *Meccus pallidipennis*, vector de la enfermedad de Chagas". *Tlamati* 8.2 (2017): 23-26. Print.

APA

Sotelo Cano, J. I., Millán Vega, A., Castañeda Saucedo, E., Flores Robles, D., Zumaquero Ríos, J. L., Martínez Ibarra, J. A. y Sierra Martínez, P. (2017). Expresión diferencial de proteínas en el estómago de la chinche *Meccus pallidipennis*, vector de la enfermedad de Chagas. *Tlamati*, 8(2), 23-26.

ISSN: 2007-2066.

Publicado el 30 de Diciembre 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.



Expresión diferencial de proteínas en el estómago de la chinche *Meccus pallidipennis*, vector de la enfermedad de Chagas

Jorge Isidoro Sotelo Cano¹
 Alejandro Millán Vega¹
 Eduardo Castañeda Saucedo¹
 Donaciano Flores Robles¹
 José Lino Zumaquero Ríos²
 José Alejandro Martínez Ibarra³
 Pável Sierra Martínez^{1*}

¹Universidad Autónoma de Guerrero. Laboratorio de Control Biológico, Unidad de Investigación Especializada en Microbiología (UIEM). Calle sin Nombre No. 13, Col. Las Colinas, C.P. 39105, Petaquillas, Guerrero. Tel: 7471224631

²Laboratorio de Parásitos y Vectores de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP). Puebla. Puebla. México.

³Universidad de Guadalajara. Área de Entomología Médica, Centro Universitario del Sur, Ciudad Guzmán, Jalisco, México.

*Autor de correspondencia
pavelierra6@hotmail.com

Resumen

Meccus pallidipennis son insectos del orden Hemiptera y 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 se identificaron un grupo de proteínas que mostraron expresión diferencial en los diferentes tiempos analizados. Se utilizaron estómagos de machos alimentados con sangre de conejo para ser analizados a los 7 y 70 días postalimentación. Las proteínas totales fueron separadas por electroforesis bidimensional en geles al 10%. Se encontraron 7 "spots" en el día 7 postalimentación que no se encuentran en el día 70 que representa el ayuno prolongado.

Palabras clave: electroforesis bidimensional, *Meccus pallidipennis*, proteómica, hematofagia

Abstract

Meccus pallidipennis are insects belonging to the Hemiptera order and they are known as vectors of Chagas disease. These insects are strictly hematophagous and their digestive system is divided into three regions: anterior (stomach), middle and posterior. So far, no proteins ingested during their feeding and involved in digestion of blood have been identified within the stomach of these organisms. In this study, by means of proteomic strategies, a group of proteins that showed differential expression were identified. Using stomachs of males that fed with rabbit blood, this group of proteins were analyzed at 7 and 70 days post-feeding. Total of proteins were separated by two-dimensional electrophoresis in 10% gels. 7 "spots" were found on day 7 of post-feeding that were not found on day 70, which represents prolonged fasting.

Keywords: two-dimensional electrophoresis, *Meccus pallidipennis*, proteomics, hematophagy

Como citar el artículo:

Sotelo Cano, J. I., Millán Vega, A., Castañeda Saucedo, E., Flores Robles, D., Zumaquero Ríos, J. L., Martínez Ibarra, J. A. y Sierra Martínez, P. (2017). Expresión diferencial de proteínas en el estómago de la chinche *Meccus pallidipennis*, vector de la enfermedad de Chagas. *Tlamati*, 8(2), 23-26.

Introducción

Los triatominos son insectos hematófagos capaces de transmitir el parásito *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas. En México se han identificado al menos 34 especies de triatominos; de estas, 6 son consideradas dentro del complejo *Phyllosoma*, que en conjunto son responsables de aproximadamente el 74% de la transmisión vectorial (Santos, Ribeiro, Lehane, Figueiredo Gontijo, Botelho Veloso, Sant'Anna, Nascimento Araujo, et al. 2007).

Estos insectos presentan un desarrollo hemimetabólico o metamorfosis incompleta con fases de huevo, cinco estadios ninfales y adulto. Todos los estadios ninfales y adultos de ambos sexos son hematófagos estrictos. A nivel de digestión se requiere de una 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, por lo que estos insectos requieren una hemolisina para lisar estas células y un sistema para acidificar la sangre ingerida antes de poder ser digerida. Estos insectos deben hacer uso de catepsinas como proteasas, las cuales generalmente solo son activas a pH ácido (Schofield, 2000). Durante la hematofagia la sangre es bombeada de los vasos sanguíneos del hospedero hacia el canal alimentario de los triatominos por medio de movimientos contráctiles de un complejo de músculos presentes en la cabeza del insecto. Parte de la saliva secretada durante la alimentación es ingerida con la sangre favoreciendo la alimentación evitando la formación de coágulos en el tracto intestinal

(Paim, Araújo, Soares, Dhom, Tanaka, Gontijo, Lehane, et al., 2011). 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.

Se han identificado proteínas implicadas en la digestión de la sangre en la porción digestiva del intestino. Sin embargo, hasta el momento no se han descrito proteínas que estén involucradas en el proceso de digestión de la sangre en el estómago de estos organismos. En este trabajo, mediante el uso de un enfoque proteómico, se identificaron proteínas que presentaron un patrón de expresión diferencial en el estómago de *Meccus pallidipennis* durante la hematofagia. Estos resultados servirán para comprender mejor el proceso de la hematofagia, así como para conocer que moléculas pueden ser utilizadas como blanco para el desarrollo de estrategias de control biológico en estos organismos.

Materiales y métodos

Insectos

M. pallidipennis fueron proporcionados por el Laboratorio de Parásitos y Vectores de la escuela de Biología dependiente de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y del Área de Entomología Médica, Centro Universitario del Sur de la Universidad de Guadalajara. 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 y 70 días postalimentación, descartando los que no se alimentaron. El estómago

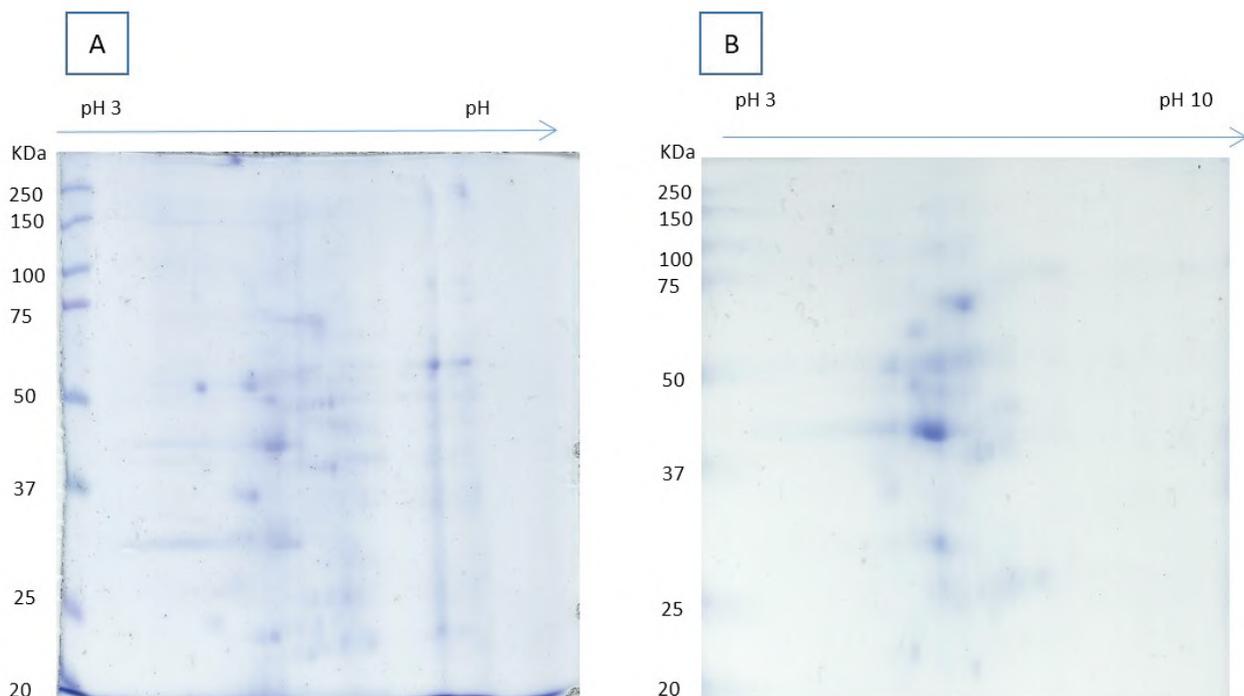


Figura 1.- Perfil proteómico de extractos de proteínas totales del estómago de *M. pallidipennis*. Electroforesis bidimensional usando un gradiente de pH lineal de 3 a 10 en geles de poliacrilamida al 10 %. A) Perfil proteómico del estómago a los 7 días postalimentación. B.- Perfil proteómico a los 70 días. Tinción Azul de Coomassie G -250.

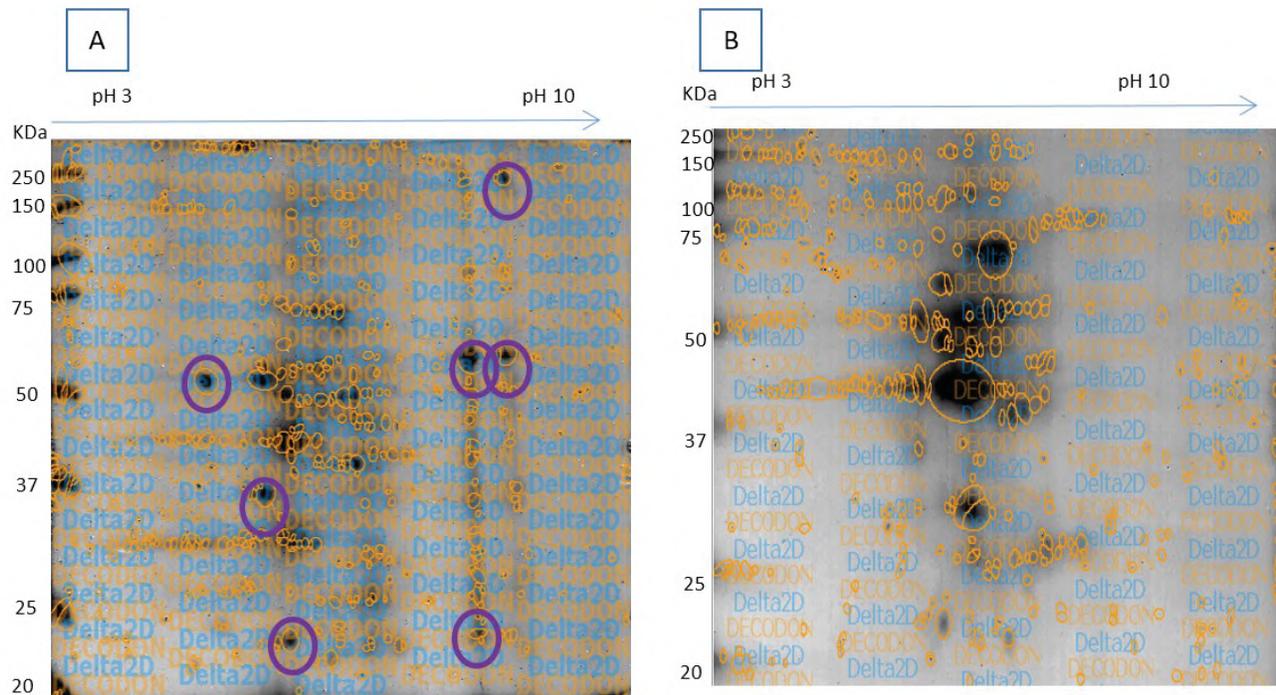


Figura 2.- Comparación de los perfiles proteómicos de extractos de proteínas totales del estómago de *M. pallidipennis* a los 7 y 70 días postalimentación realizados como se describe anteriormente. A) Perfil proteómico a los 7 días. B) Perfil proteómico a los 70 días. Se señalan con un círculo morado los spots presentes únicamente en el día 7 postalimentación.

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 KH_2PO_4 , 8 mM K_2HPO_4 , 1 mM EDTA) (Fruttero, 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)

Electroforesis 2-D en geles de poliacrilamida (PAGE-SDS).

Isoelectroenfoque

Se utilizaron 150 μg de proteína por muestra y fueron resuspendidas en 150 μL de un tampón de rehidratación compuesto de urea 9 M, 4% p/v CHAPS, Tris base 10 mM, 1,2% v/v agente reductor, 1% v/v anfolitos y trazas de azul de bromofenol. Se utilizaron tiras IPG de 7 cm con

intervalo de pH 3-10 lineal, las tiras fueron rehidratadas por 1 hora en una bandeja de cerámica, posteriormente se colocaron en una unidad "Bio-Rad PROTEAN IEF cell" donde se realizó el isoelectroenfoque a 20 °C, de acuerdo con el siguiente programa: 20 min a 250 V, 2 horas a 4000 V, y a 4000 Volts hora hasta alcanzar los 10000 V/h totales.

Equilibrio

Tras el isoelectroenfoque y previo a la separación de las proteínas mediante SDS-PAGE, las tiras IPG fueron equilibradas en un tampón compuesto de Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, urea 6 M, 30% v/v glicerol, 2% p/v SDS y trazas de azul de bromofenol, realizándose en dos pasos, empleando en cada uno 5 mL de solución de equilibrado por tira; en el primero de ellos se añade al tampón de equilibrado descrito anteriormente un 1% p/v de DTT, permaneciendo en esta solución durante 20 minutos en agitación y a temperatura ambiente. En el segundo paso se añade un 2,5% p/v de iodoacetamida al tampón de equilibrado, repitiéndose la incubación de 20 minutos en agitación a temperatura ambiente, una vez finalizado el procedimiento de equilibrado se realiza un lavado con agua bidestilada.

2a Dimensión

Una vez preparados los geles al 10%, cada tira IPG se colocó sobre la superficie de un gel. Para fijar ambos se agregó una solución de agarosa 0,5% (p/v). La electroforesis tiene lugar a 25 °C, aplicando 180 v durante 60 minutos aproximadamente. Al finalizar los geles fueron teñidos con Azul de Coomassie.

Análisis de geles SDS-PAGE en 2D

La evaluación de las diferencias en la expresión de proteínas (densidad de spots) se realizó mediante el software de análisis de imágenes: Delta 2D, versión 4.3, considerándose la expresión de proteínas significativamente diferente cuando $p < 0.05$ y los cambios en la expresión fueron $< \text{ó} >$ a 1.5 veces.

Resultados

Hasta el momento se ha reportado que en los triatomas al ingerir sangre, esta permanece sin ser digerida en el estómago, considerándose a este órgano como un sitio exclusivamente de almacenamiento (Kollien y Billingsley, 2002), en el trabajo realizado por Silva, Mury, Oliveira, Oliveira, Silva y Dansa-Petretski en 2007 en el que analizan la formación de la membrana perimicrovellosa a diferentes días después de la ingesta de sangre, reportan que el ciclo digestivo en estos insectos comprende aproximadamente 21 días, tiempo en el cual degradan toda la sangre ingerida. En la figura 1 se muestran los perfiles proteicos obtenidos a los 7 y 70 días postalimentación mediante electroforesis bidimensional.

Al realizar el empalme y análisis informático de las imágenes obtenidas de los 2 tiempos postalimentación se encontró un patrón de 7 “spots” (véase figura 2), que presentan una expresión diferencial, encontrándose únicamente en este tiempo postalimentación el cual corresponde a los días en que el estómago del insecto se encuentra abundante en contenido y procesando el alimento ingerido. No se observaron los mismos “spots” en tiempo posterior correspondiente a los 70 días, tiempo en el cual el insecto ha transcurrido por un largo periodo de ayuno y debería de carecer de proteínas relacionadas con su alimentación en el sistema digestivo.

Discusión y conclusiones

Por muchos años el control de estos organismos se ha basado en la utilización de pesticidas, lo cual ha originado que estos insectos desarrollen resistencia y aun no se ha podido evitar su proliferación, siendo lo más grave la contaminación ambiental que ha originado (Mehlhorn, Al-Rasheid, Al-Quraishy y Abdel-Ghaffar, 2011). Actualmente se necesitan realizar más estudios en áreas como son: la captación y propagación de agentes de enfermedades por parte de los vectores cuando estos ingieren o chupan sangre; investigación biológica molecular y genética sobre la relación entre las especies de vectores, así como el desarrollo de nuevos métodos de control biológico. Existen trabajos concretos relacionados con estrategias de combate en contra de algunos vectores, como la garrapata y la pulga donde se describe la posibilidad de utilizar proteínas propias del sistema digestivo del vector como inductor de la respuesta inmune en el hospedador (Loew-Baselli, Poellabauer, Pavlova, Fritsch, Firth, Petermann, Barrett y Ehrlich, 2011).

En el presente trabajo se muestra información que apoya la idea de que el estómago de *M. pallidipennis* juega un papel importante en la digestión de la sangre ingerida y no es únicamente un sitio de almacenamiento como ha sido reportado hasta el momento (Kollien y Billingsley, 2002; Balczun, Siemanowski, Pausch, Helling, Marcus, Stephan,

Meyer et al., 2012). Se observó un patrón de 7 “spots” con una expresión diferencial que representan proteínas que se están expresando únicamente en el tiempo en el que el estómago de este insecto contiene sangre. Las proteínas diferenciales posteriormente serán identificadas por espectrometría de masas. Estas moléculas podrían ser candidatas para utilizarlas como blanco para el desarrollo de estrategias de control biológico en estos organismos.

Referencias

- Balczun, C., Siemanowski, J., Pausch, J. K., Helling, S., Marcus, K., Stephan, C., Meyer, H. E., Schneider, T., Cizmowski, C., Oldenburg, M., Höhn, S., Meiser, C. K., Schuhmann, W. y Schaub, G. A. (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.
- Fruttero L. L., Rubiolo, E. R. y Canavoso, L. E. (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*. *Parasitology Research*. 88(12), 1026-33.
- Loew-Baselli, A., Poellabauer, E. M., Pavlova, B. G., Fritsch, S., Firth, C., Petermann, R., Barrett, P. N. y Ehrlich, H. J. (2011). Prevention of tick-borne encephalitis by FSME-IMMUN(®) vaccines: Review of a clinical development programme. *Vaccine*. 29(43), 7307-7319.
- Mehlhorn, H., Al-Rasheid, K., Al-Quraishy, S. y Abdel-Ghaffar, F. (2011). Research and increase of expertise in arachno-entomology are urgently needed. *Parasitology Research*. 110(1), 259-65.
- Paim, R. M., Araújo, R. N., Soares, A. C., Dhom, L. C., Tanaka, A. S., Gontijo, N. F., Lehane, M. J. y Pereira, M. H. (2011). Influence of the intestinal anticoagulant in the feeding performance of triatomine bugs (Hemiptera; Reduviidae). *International Journal for Parasitology*. 41, 765-773.
- Santos, A., Ribeiro, J. M. C., Lehane, M. J., Figueiredo Gontijo, N., Botelho Veloso, A., Sant'Anna, M. R. V., Nascimento Araujo, R., Grisard, E. C. y Pereiraa, M. H. (2007). The sialotranscriptome of the blood-sucking bug *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera, Triatominae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 37(7), 702-12.
- Schofield, C.J. (2000). *Trypanosoma cruzi*. The Vector-parasite Paradox. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 95(4), 535-544.
- Silva, J. R., Mury, F. B., Oliveira, M. F., Oliveira, P. L., Silva, C. P. y Dansa-Petretski M. (2007). Perimicrovillar membranes promote hemozoin formation into *Rhodnius prolixus* midgut. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 37(6), 523-31.