



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

“PROTEOMA DEL ESTÓMAGO DE *Meccus pallidipennis* (Reduviidae, Triatominae) ASOCIADO A LA INFECCIÓN POR *Trypanosoma cruzi*”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

Q.B.P. IVETTE NAVA MIRAFUENTES

DIRECTOR DE TESIS: Dr. PÁVEL SIERRA MARTÍNEZ
CODIRECTOR DE TESIS: Dr. DONACIANO FLORES ROBLES

CHILPANCINGO, GRO., JUNIO DE 2015.

“PROTEOMA DEL ESTÓMAGO DE *Meccus pallidipennis* (Reduviidae, Triatominae) ASOCIADO A LA INFECCIÓN POR *Trypanosoma cruzi*”



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

APROBACIÓN DE TESIS

En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 04 días del mes de diciembre de dos mil catorce, se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado de la Maestría en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada "Proteoma del estómago de *Meccus pallidipennis* (Reduviidae, Triatominae) asociado a la infección por *Trypanosoma cruzi*", presentada por la alumna Ivette Nava Mirafuentes, para obtener el Grado de Maestría en Ciencias Biomédicas. Después del análisis correspondiente, los miembros del comité manifiestan su aprobación de la tesis, autorizan la impresión final de la misma y aceptan que, cuando se satisfagan los requisitos señalados en el Reglamento General de Estudios de Posgrado e Investigación Vigente, se proceda a la presentación del examen de grado.

El Comité Tutorial


Dr. Pavel Sierra Martínez
Dirección de tesis



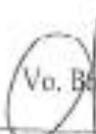
Dr. Donaciano Flores Robles
Codirección de tesis



Dr. Gerardo Huerta Beristain


Dr. Eduardo Castañeda Saucedo


Dr. José Lino Zumaquero Ríos


Vo. B.

Dra. Isela Parra Rojas

Coordinadora del Posgrado en Ciencias Biomédicas
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO



UAGro

Coordinación del Posgrado UACQB


Dra. Analle Vences Velazquez
Directora de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Control Biológico de la Unidad de Investigación Especializada en Microbiología, de la Universidad Autónoma de Guerrero. Así mismo, en el Laboratorio de Parásitos y Vectores de la Escuela de Biología, de la BUAP: Laboratorio de Entomología Molecular del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, CINVESTAV-IPN y Laboratorio de Proteómica del Centro de Ciencias Genómicas de la UNAM.

Bajo la dirección de

Dr. Pável Sierra Martínez

La codirección de

Dr. Donaciano Flores Robles

La Asesoría de

Dr. José Lino Zumaquero Ríos

Dr. Eduardo Castañeda Saucedo

Dr. Gerardo Huerta Beristáin

Durante el período en que cursó la Maestría en Ciencias Biomédicas, la C. Ivette Nava Mirafuentes recibió beca del CONACYT.

Así mismo se agradece al Banco Santander Serfin por la beca de Movilidad Santander Universia, otorgada a la C. Ivette Nava Mirafuentes durante el periodo de Agosto-Diciembre del 2013.

AGRADECIMIENTOS

Por la dedicación, apoyo para la culminación de este trabajo, por sus valiosos consejos y aprendizaje otorgado, por respetar mis ideas y sugerencias al desarrollo del proyecto, por brindarme su amistad. Gracias por la confianza hacia mi persona, desde el inicio y culminación del proyecto que bajo su dirección finalmente queda plasmado el enorme esfuerzo, dedicación y aprendizaje, por eso y más le doy las gracias **Dr. Pável Sierra Martínez**.

Por su confianza, aprendizaje y soporte brindado que permitió que mi estancia bajo su dirección fuera muy grata y productiva para el desarrollo del proyecto, gracias **Dr. José Lino Zumaquero Ríos**.

Por su valiosa codirección, comentarios, sugerencias, correcciones durante el desarrollo del proyecto, gracias **Dr. Donaciano Flores Robles**.

Por el esfuerzo como tutor durante mi estancia en la Maestría, al orientarme en situaciones de indecisión y dificultad como estudiante, por su experiencia y valiosa aportación en el proyecto, gracias **Dr. Gerardo Huerta Beristaín**.

Por la revisión cuidadosa del escrito y aportaciones que permitieron mejorar la visión y estructura del proyecto, gracias **Dr. Eduardo Castañeda Saucedo**.

Por tu amistad, apoyo incondicional y desinteresado, por compartir tu experiencia, conocimientos y compañía durante mi estancia en el laboratorio sin duda fueron muy importantes, gracias **M. C. Jorge Isidoro Sotelo Cano**.

Un trabajo de investigación es un fruto de ideas y aportaciones, en mi acaso le doy las gracias al **Dr. Fidel de la Cruz Hernández Hernández** por permitirme trabajar en su laboratorio de investigación y por las facilidades para la realización del proyecto, mismo que me dio la oportunidad de conocer a **Leticia Cortes** que sin su colaboración en este trabajo hubiese sido mucho más largo y complicado. Asimismo les doy las gracias al **Dr. Sergio Encarnación-Guevara** y **M. C**

Magdalena Hernández Ortiz por abrirme las puertas de su laboratorio de investigación, aprendizaje y la oportunidad de mejorar el análisis de los geles 2D.

DEDICATORIA

A mis **padres** Roberta y Feliciano, pilares fundamentales en mi vida, que han estado conmigo en todo momento velando mi bienestar, brindándome su pleno apoyo incondicional y desinteresado en cada decisión tomada en mi desarrollo profesional, por darme el mejor regalo que puedo recibir su pleno amor y cariño, por sus palabras de aliento en mis días difíciles, sin dudar en algún momento de mis capacidades y confiar plenamente en mí, le doy gracias a Dios por los maravillosos padres que tengo. Por eso y más siempre estaré eternamente agradecida a mis **padres**.

A mi hermosa familia. **Lizabeth**, mi gemela quien ha estado conmigo desde el vientre de nuestra mamá, desde que tengo conciencia, me has brindado tu cariño, apoyando en mis decisiones, festejando cada logro y escuchando mis malos ratos, pero siempre juntas. **Jonathan**, aunque en nuestra infancia fuiste un dolor de cabeza para mí, hoy en día eres todo un profesional y padre, gracias por tus consejos, apoyo y motivación. **Tania** una mujer admirable, entregada a su trabajo y familia, gracias hermana por preocuparte por mi bienestar y compartir mis logros, además, de darme mis **sobrinos** con quien comparto alegrías, travesuras y enseñanzas. Gracias familia por brindarme su apoyo, compartir momentos muy gratos cargados de felicidad y emociones, que me han dado fortaleza en gran manera a concluir el desarrollo de esta tesis.

A mis hermanos no sanguíneos pero sí de corazón, **Alex** y **Belen**, por estar conmigo en las buenas y en las malas, compartir metas y proyectos juntos, por brindarme su amistad sincera, por su apoyo incondicional, que estoy segura que seguiremos conservando por muchos años.

A mis amigas **Abigail** y **Zacapala**, por brindarme su valiosa amistad, ser mis confidentes, compartir noches de estudio y pláticas que en compañía de un café se volvía muy amena.

A mi amigo y novio **Hoguer**, quien me brinda su apoyo en momentos difíciles, por su enorme cariño, respeto, paciencia, comprensión, por su interés en verme y hacerme feliz cada día.

A mis compañeros, amigos, doctores que directamente me brindaron sus conocimientos, consejos y palabras de entusiasmo durante mi estancia en la MCB. **Abigail, Narayana, Ivan, Ismene, Roció, Laura, Abdiel, Teresa, Nestor, Gaby, Nadia y Marco**, con quien tuve el gusto de adquirir conocimientos, trabajar en equipo, compartir ideas, proyectos, momentos de estrés, pero también de alegrías y festejos, fue un gusto conocerlos, mucho éxito en su carrera profesional.

ÍNDICE

Página

I.	RESUMEN.....	1
II.	ABSTRACT.....	2
III.	INTRODUCCIÓN.....	3
IV.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	7
V.	RESULTADOS.....	12
VI.	DISCUSIÓN.....	21
VII.	CONCLUSIONES.....	26
VIII.	PERSPECTIVAS.....	26
IX.	REFERENCIAS.....	27

I. RESUMEN

Meccus pallidipennis (Reduviidae, Triatominae) es un hematófago estricto, vector del parásito *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico de la enfermedad de Chagas siendo esta enfermedad un problema de salud pública en Latinoamérica. Su sistema digestivo está dividido en intestino medio anterior (estómago), intestino medio posterior y recto, compartimentos esenciales para el ciclo biológico del parásito. En el estómago, ocurre la diferenciación de tripomastigote sanguíneo a epimastigote, además, los parásitos están expuestos al sistema inmune y componentes del metabolismo del insecto, sin embargo, la información sobre los mecanismos moleculares asociados con la interacción de *T. cruzi* en el estómago del vector es escasa. En este trabajo, se analizó el perfil proteico del estómago de *M. pallidipennis* infectado con *T. cruzi*. Se utilizaron hembras de *M. pallidipennis* a los 5 días postalimentación, el grupo experimental fue alimentado con sangre de ratón BALB/c infectado con *T. cruzi* (Cepa NINOA), el grupo control se alimentó con sangre libre de *T. cruzi*. Se obtuvieron extractos de proteínas totales de los estómagos de los dos grupos y fueron analizados por electroforesis bidimensional. El análisis comparativo de los geles 2D se realizó mediante el software PDQuest 2D, se evidenciaron 356 manchas proteicas que representan el mapa proteico del estómago infectado por *T. cruzi*, en contraste, el mapa proteico libre de infección reveló 295 manchas proteicas, 60 proteínas presentaron expresión diferencial ($p < 0.05$) de las cuales 5 no se encontraron en el perfil proteico del estómago infectado con *T. cruzi*, sin embargo, 23 fueron específicas para el mapa proteico experimental y 32 proteínas presentaron cambios cuantitativos en la relación de intensidad relativa. Se demostró que la presencia del parásito *T. cruzi* en el estómago de *M. pallidipennis* induce expresión diferencial de proteínas a los 5 días postinfección, modificando el proteoma del estómago.

Palabras clave: *Meccus pallidipennis*, *Trypanosoma cruzi*, Proteoma, Expresión diferencial de proteínas, Estómago.

II. ABSTRACT

Meccus pallidipennis (Reduviidae, Triatominae) is a strict hematophagous, vectors of the Chagas disease parasite *Trypanosoma cruzi* and public health problem in Latin America. Triatomine bugs digestive system is divided in anterior midgut (stomach), posterior midgut and the rectum sections essential for the life cycle of the parasite. In the stomach, blood trypomastigote differentiates into epimastigote, and parasites are exposed to the immune system and metabolism components of the insect, however, information about the molecular mechanisms associated with the interaction of *T. cruzi* in the vector's stomach is limited. In this work, we analyzed the protein profile of *M. pallidipennis* stomach infected with *T. cruzi*. Stomachs from *M. pallidipennis* females were used at 5 days after blood feeding, the experimental group was fed with the blood of BALB/c mice infected with *T. cruzi* (Ninoa strain), the control group was fed with blood free of *T. cruzi*. Total protein extracts were analyzed by two-dimensional electrophoresis and comparative analysis of 2D gels was performed using PDQuest 2D software. We found 356 protein spots representing the stomach protein map of bugs infected with *T. cruzi*. In contrast, the protein map of the stomach from infection free bugs revealed 295 protein spots, 60 proteins showed differential expression ($p < 0.05$), 5 were not found in the protein profile of infected bugs, compared with stomach from uninfected bugs, however, 23 are specific to the experimental protein map also 32 protein spots showed quantitative changes in the relative intensity ratio. It was shown that the presence of *T. cruzi* parasite in the stomach of *M. pallidipennis* induced differential expression of protein at 5 days post-infection, modifying the proteome of the stomach.

Keys words: *Meccus pallidipennis*, *Trypanosoma cruzi*, Proteome, Differential Expression of Proteins, Stomach

III. INTRODUCCIÓN

Los triatominos (Reduviidae, Triatominae), son hematófagos estrictos (Tartarotti *et al.*, 2006). *Meccus pallidipennis*, pertenece a esta familia, es responsable de aproximadamente el 74% de la transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas en México (Martínez-Ibarra *et al.*, 2012). Las 3 regiones del sistema digestivo del vector son importantes para el desarrollo de *T. cruzi*; el intestino medio anterior (estómago), es donde los tripomastigotes se diferencian a epimastigotes y esferomastigotes; en el intestino medio posterior, los epimastigotes se adhieren a la membrana perimicrovellosa (PMM) y se dividen por fisión binaria; y en el recto, los epimastigotes se adhieren a la cutícula y se diferencian en tripomastigotes metacíclicos los cuales son eliminados en las heces y la orina, siendo estos la fuente de infección para el huésped vertebrado (Azambuja *et al.*, 2005; García *et al.*, 2010a). El estudio de Henriques *et al.*, (2012) reportaron el desarrollo de *T. cruzi* en el tracto digestivo de *Rhodnius prolixus*, mediante un ensayo de bioluminiscencia, a los 7, 14, 21 y 28 días postinfección, estos resultados sugieren que a los 7 y 14 días predominan epimastigotes, localizados en el estómago e intestino medio posterior respectivamente, para el día 21 y 28 días predominan tripomastigotes metacíclicos y la infección se establece en el recto.

M. pallidipennis presenta un desarrollo hemimetabólico con fases de huevo, 5 estadios ninfales hasta llegar a adulto, su ciclo biológico se desarrolla en un periodo aproximado de 6 meses, todos los estadios ninfales y adultos de ambos sexos son hematófagos estrictos (Martínez-Ibarra *et al.*, 2014). Sin embargo, el epitelio intestinal no está en contacto directo con el bolo sanguíneo, debido a la presencia de una membrana perimicrovellosa (PMM) que recubre las microvellosidades de las células epiteliales del intestino medio, promueve la compartimentalización de los procesos enzimáticos en el microambiente intestinal, esta membrana (Albuquerque-Cunha *et al.*, 2009; Valente *et al.*, 2010). Su desarrollo y composición están relacionados con la alimentación, es más evidente a los 15 días después de haber ingerido alimento, en contraste, bajo condiciones de inanición no hay desarrollo de

PMM (Gutiérrez-Cabrera *et al.*, 2014). Después de la ingesta, la sangre permanece en el estómago, donde los eritrocitos son lisados, las hormonas diuréticas son liberadas que eliminan el exceso de iones y el agua los cuales son transportados a través de la pared del estómago; la hemolinfa es conducida hacia los túbulos de Malpighi, para pasar al recto donde inicialmente son excretados los restos de la digestión seguido de gotas de orina clara que contienen un gran número de esferas de ácido úrico (Kollien y Schaup, 2000; Silva-Neto *et al.*, 2010). Las proteínas de la sangre pasan parcialmente digeridas, mientras que las glicosidasas, fosfatasas alcalinas y ácidas, sialidasas, lipasas y amilasas (derivados de simbiosis) actúan sobre sus respectivas moléculas blanco de la sangre (Kollien y Schaup, 2000). La sangre concentrada se libera desde la parte anterior a la posterior del intestino medio, donde las proteínas son finalmente digeridas, por la secreción de catepsinas L, B y D, carboxipeptidasa lisosómica y aminopeptidasa (Sojka *et al.*, 2011; Balczun *et al.*, 2012).

La interacción de *T. cruzi* en los triatominos inicia tras la ingesta de sangre infectada, donde los parásitos se enfrentan a componentes como enzimas digestivas, hemolisinas, aglutininas, la microbiota y factores antimicrobianos (García *et al.*, 2010a). Se ha sugerido que la unión a la PMM es importante para la división del parásito. Aparentemente este proceso involucra moléculas de fosfolípidos de glicoinositol (GIPLs) que se encuentran en gran cantidad en la superficie de los epimastigotes. Nogueira *et al.*, (2007) reportaron que los GIPLs son uno de los componentes implicados en la unión de *T. cruzi* a la superficie del intestino medio posterior, observaron que tras la ingesta de sangre infectada más GIPLs en *R. prolixus*, se inhibe el desarrollo del parásito, mientras que los alimentados con sangre infectada sin GIPLs, la población de parásitos incrementa. Este mecanismo, parece ser determinante para el establecimiento del parásito en el insecto vector, por lo que se sugiere que receptores de superficie del parásito son activados por ligandos presentes en los tejidos del vector (Nogueira *et al.*, 2007; Silva-Neto *et al.*, 2010). En lo que respecta a enzimas digestivas, Borges *et al.*, (2006) destacaron que la actividad de la catepsina D, en el intestino medio posterior, es mayor entre uno tres

días después de la infección con *T. cruzi* en comparación con los insectos no infectados. En cuanto a los factores derivados de la microbiota intestinal Azambuja *et al.*, (2004) lograron aislar la bacteria *Serratia marcescens* biotipo A1a del estómago de *R. prolixus*, una bacteria con actividad hemolítica y tripanolítica productora del pigmento prodigiosina que mata epimastigotes de la cepa Y de *T. cruzi*. Otro determinante del establecimiento del parásito es el sistema inmune del vector, hasta el momento se han reportado lisozimas y defensinas (García *et al.*, 2010b). Ursic-Bedoya *et al.*, (2008) caracterizaron e identificaron 2 nuevos genes que codifican a lisozimas, A (*RpLys-A*) que se expresa en el tracto intestinal a los 7 y 14 días postinfección con *T. cruzi* y lisosima B (*RpLys-B*) que se expresa principalmente en la grasa corporal a las 8 y 24 h después de una infección bacteriana. Mientras que isoformas de defensinas se han reportado en *R. prolixus* al menos tres y *T. brasiliensis* cuatro (Lopez *et al.*, 2003; Araujo *et al.*, 2006; Waniek *et al.*, 2009). Araújo *et al.*, (2006) demostraron un incremento en la expresión de mRNA de los genes *def1* y *Lys1* en el tracto digestivo de *Triatoma brasiliensis*, a los 5 días después de la alimentación, pero la expresión fue mayor en el estómago que en el intestino medio posterior. Por el contrario, el gen *Def3* se expresa en la grasa corporal e intestino posterior pero no en el estómago, pero el gen de la *def4* se expresa en el estómago (Waniek *et al.*, 2009).

Hasta la fecha se ha publicado poca información en relación con los perfiles de expresión diferencial de genes bajo la infección por *T. cruzi* en el tracto digestivo de los principales vectores de la enfermedad de Chagas, aunado a esto, las investigaciones realizadas se dirigen a la cuantificación de mRNA y el uso de etiquetas de secuencia expresada (EST) (Whitten *et al.*, 2007; Buarque *et al.*, 2013). Sin embargo los mecanismos moleculares asociados con la interacción de *T. cruzi* en el estómago de *M. pallidipennis* no están definidos, además esta fracción del sistema digestivo constituye el primer depósito de sangre después de la ingesta de sangre, por lo tanto, los parásitos estarán expuestos al sistema inmune y componentes digestivos del insecto. En este trabajo, se realizó un análisis proteómico mediante electroforesis bidimensional (2D-PAGE) para la obtención de perfiles de expresión

diferencial de proteicas del estómago de *M. pallidipennis*, modificadas por la presencia del parásito *T. cruzi*.

El conocimiento obtenido puede aplicarse para identificar las moléculas participantes en el reconocimiento, sistema de señalización y en general para conocer las interacciones específicas parásito-vector y con ello el desarrollo de herramientas precisas y eficaces que permitan prevenir la transmisión o bien interrumpir el ciclo biológico de este parásito en el vector (López-Ordóñez *et al.*, 2009).

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

Insectos. Hembras de *Meccus pallidipennis*, su desarrollo fue monitoreado en el laboratorio de Parásitos y Vectores de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP), bajo condiciones de temperatura 27+/- 1 °C y humedad de 75 +/- 5% (Martínez-Ibarra *et al.*, 2012). Se utilizó un total de 30 triatominos en condiciones de ayuno. El grupo control (10 triatominos) se alimentó con sangre de ratón BALB/c libre de infección y el grupo experimental (10 triatominos) se alimentó con sangre de ratón BALB/c previamente infectado con *T. cruzi*, para efectuar el análisis por SDS-PAGE del estómago a las 12h, 24h, 3, 5 y 7 días postalimentación (se utilizaron 2 estómagos por tiempo). Los 10 triatominos restantes se utilizaron para el análisis de electroforesis 2D del estómago a los 5 días postalimentación con infección por *T. cruzi* (5 estómagos) y 5 días postalimentación libre de infección por *T. cruzi* (5 estómagos).

Parásitos: Se utilizó la cepa NINOA de *T. cruzi* proporcionada por el Centro Nacional de Cardiología, México, D. F. Para conservar la viabilidad de la cepa se realizaron pases mensuales en medio LIT (Infusión de Hígado y Triptosa) y se preservó a 28 °C.

Cinética de crecimiento *in vitro* de la cepa Ninoa de *Trypanosoma cruzi*. Se evaluó por triplicado el cultivo *in vitro* de la cepa Ninoa de *T. cruzi* en medio LIT, iniciando con una concentración de 5×10^5 parásitos/mL a 28°C, cada 2 días se cuantificó el número de parásitos con el uso de la cámara de Neubauer, además, se realizaron frotis teñidos con solución Giemsa, para la observación microscópica de los parásitos (Monteón *et al.*, 2009).

Infección de los ratones BALB/c con la cepa NINOA de *T. cruzi*. Se utilizaron 20 ratones BALB/c machos con un peso entre 25 a 30g de 5 semanas de edad, proporcionados por el Bioterio “Claude Bernard” de la BUAP. 10 ratones BALB/c fueron inoculados vía intraperitoneal, previo conteo y estandarización del inóculo de parásitos de *T. cruzi* en la cámara de Neubauer, se realizaron diluciones hasta

obtener 1×10^7 parásitos/mL. La parasitemia fue monitoreada para un lote de 5 ratones BALB/c, cada semana se tomó una gota de sangre periférica de la cola del ratón, seguido de frotis por deslizamiento teñidos con Giemsa y posterior observación al microscopio con el objetivo de 100X, el número de parásitos se contaron en 100 campos (Brener Z, 1962; Monteón *et al.*, 2009). 10 ratones se utilizaron para la alimentación del grupo control de triatominos libres de infección. Durante todo el proceso experimental se respetaron los principios éticos para la investigación con animales de laboratorio, establecidos en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

Infección experimental del modelo de estudio *Meccus pallidipennis*. Hembras de *Meccus pallidipennis* ($n=30$), se mantuvieron en inanición durante 21 días para mantener limpio el tracto digestivo y estimular su alimentación. Diez insectos, se infectaron por vía oral mediante la ingesta de sangre de ratón BALB/c (infectado con la cepa Ninoa de *T. cruzi*), los ratones se colocaron recipientes metálicos para facilitar la alimentación de los triatominos hasta su retiro voluntario, finalmente 2 insectos por tiempo, fueron sacrificados para la disección del estómago, para el análisis mediante SDS-PAGE. Para el grupo control ($n=10$), se repitió el mismo procedimiento con la diferencia que los triatominos fueron alimentados con sangre de ratón BALB/c libre de infección por *T. cruzi*. Para el análisis de electroforesis en 2D, se consideró el tiempo de 5 días postalimentación, se repitió el procedimiento previamente descrito de alimentación del triatolino y se consideró un “pool” de 5 estómagos por condición.

Disección del intestino medio anterior (estómago) de *Meccus pallidipennis*. Los triatominos se colocaron en cajas de Petri estéril, que contenía un algodón impregnado con acetato de etilo para su sacrificio seguido, en seguida se decapito y se agregó 5 mL de PBS 1X pH 7.4. Mediante el uso de pinzas entomológicas, bisturí y bajo la observación al microscopio estereoscópico (4X), se sujetó al insecto y se separaron ambas alas, posteriormente se retiró la cutícula abdominal dejando a la vista la capa de tejido graso que recubre el sistema digestivo, la cual es retirada y finalmente se realizaron los cortes para separar el intestino en sus diferentes secciones; intestino medio anterior, intestino medio posterior y recto, se tomó la fracción del intestino medio anterior (estómago) para realizar

una serie de lavados con 2mL de PBS 1X pH 7.4 y así eliminar los restos de sangre. Los estómagos se guardaron en un tubo “Eppendorf” con 1 mL de PBS 1X pH 7.4 a -80 °C hasta su uso.

Extracción y procesamiento de proteínas totales del estómago de *Meccus pallidipennis*. Para la extracción de proteínas totales de la fracción del estómago y análisis por SDS-PAGE a las 12h, 24h, 3, 5, y 7 días postalimentación, se utilizó 1mL de “buffer” de lisis frío (250 mM sacarosa, 2 mM KH₂PO₄, 8 mM K₂HPO₄, 1 mM EDTA) suplementado con inhibidores de proteasas (10 mM IA, 10mM PMSF, 10mM TLCK, 10mM NEM; SIGMA), cada tiempo contenía un “pool” de 2 estómagos, posteriormente, se maceró el tejido en un tubo “Eppendorf” con un pistilo de plástico estéril (Bio-Rad), durante 15 min. El extracto celular se guardó a -80 °C hasta su uso. Para el análisis de electroforesis en 2D, la extracción de proteínas totales del “pool” de 5 estómagos a los 5 días postinfección con *T. cruzi*, así como postalimentación libre de infección, se utilizaron 200 µL de “buffer” de muestra (7M Urea, 2M Tiourea, 4% (p/v) CHAPS, 40Mm DTT) suplementado con 100 µL de un “cocktail” de inhibidores de proteasas (serina, cisteína, metaloproteinasas y calpaínas: complete Mini, Roche), posteriormente se realizó una serie de 3 ciclos de congelación y descongelación de la muestra con nitrógeno líquido y se maceró el tejido en el tubo “Eppendorf” utilizando un pistilo estéril (Bio-Rad) hasta su homogenización, cada alícuota fue centrifugada (Thermo scientific Sorvall ST 16 R) a 1500 rpm durante 5 min, se utilizó el sobrenadante y la muestra finalmente fue procesada utilizando el kit 2-D Clean-Up (GE Healthcare), el “pellet” se resuspendió en 150 µL de “buffer” de hidratación para isoelectroenfoque (7M Urea, 2M Tiourea, 2% (p/v) CHAPS, 0.5% (v/v) Anfólitos 3-10 pH (GE Healthcare), 0.002% Azul de bromofenol) y suplementado con 50 µL del “cocktail” de inhibidores de proteasas (complete Mini, Roche).

Cuantificación de proteínas totales del estómago de *Meccus pallidipennis*. La cuantificación para el análisis por SDS-PAGE, se efectuó por el método de Bradford mediante el uso de un biofotómetro marca Eppendorf (Bradford, 1976). Para el

análisis de electroforesis 2D, las muestras fueron cuantificadas mediante el uso del kit 2-D Quant (GE Healthcare).

Electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE. Se utilizaron 25µg de muestra para cada tiempo postalimentación, procesada con relación 1:1 del “buffer” de muestra Laemmli (2X) y se sometió a ebullición durante 5 min. La electroforesis se realizó, en geles de poliacrilamida en presencia de duodecil-sulfato de sodio (Laemmli UK, 1970) al 10%, el corrimiento electroforético se efectuó a 100 V por 2h. Los geles se tiñeron con azul brillante de Coomassie R-250 (500 mL de metanol, 400 mL de agua desionizada, 100 mL de ácido acético y 2.5 gramos de Azul de Coomassie R-250) en agitación suave por 12h. Posteriormente se lavó, destiñó y se secó a temperatura ambiente en papel celofán. Para calcular el peso molecular se utilizó el estándar “Prestained SDS-PAGE Standards” (Bio-Rad; # 161-0318).

SDS-PAGE bidimensional (2D)

Primera dimensión isoelectroenfoque. 150 µg de proteínas totales se aplicaron en tiras de 7 cm con gradiente de pH inmovilizado de 3-10 no lineal (GE Healthcare). Las tiras se rehidrataron con “buffer” de rehidratación (7M Urea, 2M Tiourea, 2% (p/v) CHAPS, 0.5% (v/v) Anfolitos 3-10 pH (GE Healthcare), 0.002% Azul de bromofenol) en un volumen final de 140 µL durante 16 horas a temperatura ambiente. Después, se llevó a cabo el isoelectroenfoque sobre el sistema IEF Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare) a 20 °C, usando el siguiente programa: 30 minutos a 300 V seguido de 30 minutos a 1000 V, 1.5 a 2 horas hasta alcanzar 5000 V seguido de 12-30 min a 5000 V.

Segunda dimensión SDS-PAGE. Tras el isoelectroenfoque y previo a la separación de las proteínas para la segunda dimensión, las tiras IPG se sometieron a reducción (10 mg/mL de DTT) y alquilación (25 mg/mL de iodoacetamida) en 2.5 mL de un “buffer” de equilibrio (75 Mm, pH 8.8 Tris-HCl, 6M Urea , 29.3% (v/v) Glicerol, 2% SDS y azul de bromofenol 0.0002%) durante 15 min en cada paso, al finalizar las tiras fueron lavadas con “buffer” de corrida 1X Tris-glicerina-SDS.

Una vez preparados los geles de poliacrilamida al 12% de 1.5 mm de espesor, cada tira IPG se coló sobre la superficie del gel (evitando la formación de burbujas), para fijar ambos geles se agregó una solución de agarosa al 2% (p/v) disuelta con “buffer” de corrida 1X Tris-glicerina-SDS que contenía azul de bromofenol 0.0001%. La electroforesis se llevó a cabo usando el sistema Miniprotean (Bio-Rad) a un voltaje de 100 V a 25 °C. Posteriormente los geles se fijaron en una solución (30% etanol, 10% ácido acético, agua Mili-Q) por 1 h.

La visualización se realizó por tinción con azul brillante de Coomassie G-250 (Research Organics) por 5 días en agitación suave a temperatura ambiente, finalmente se documentaron los geles usando el densitómetro GS-800 (Bio-Rad).

Análisis bioinformático de los geles 2D. El análisis se realizó con la ayuda del programa bioinformático PDQuest 2D versión 8.1 (Bio-Rad). Se compararon las manchas proteicas de réplicas de geles para cada condición. La densidad de la señal se calculó teniendo en cuenta el área y la intensidad de cada mancha seguida por normalización, y se expresó como la intensidad total en pixeles de cada mancha, respecto a la intensidad total de todas las manchas presentes en el gel.

Se consideró la expresión diferencial cuando el análisis cuantitativo de la relación “ratio” de la intensidad de la mancha fue $>$ ó $<$ a 2 veces tomando como referencia el perfil proteico control libre de infección por *T. cruzi* y se realizó un análisis estadístico mediante la prueba t de Student, solo se consideraron significativas aquellas manchas con valores $p < 0.05$.

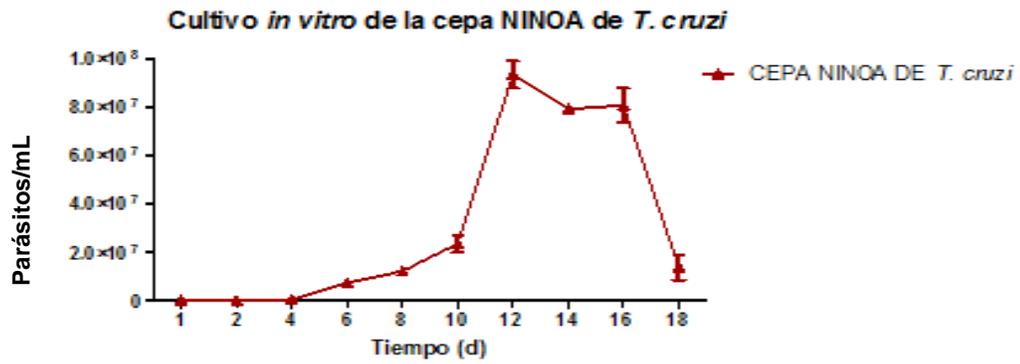
V. RESULTADOS

Cinética de crecimiento *in vitro* de la cepa NINOA de *Trypanosoma cruzi*.

El seguimiento del desarrollo *in vitro* de la cepa NINOA de *T. cruzi* en medio LIT reveló que a partir de los días 4-12 se presenta la fase de crecimiento exponencial, la fase estacionaria comprende los días 12-16 de cultivo. La mayor concentración fue de 9×10^7 parásitos/mL (Gráfica 1). El estadio infeccioso de tripomastigote metacíclico se evidenció en el día 12 de crecimiento *in vitro* y se realizaron las diluciones a 1×10^7 parásitos/mL, para la inoculación vía intraperitoneal del lote de 5 ratones BALB/c.

Infección de los ratones BALB/c con la cepa NINOA de *Trypanosoma cruzi*.

El examen microscópico de muestras frescas de sangre periférica del lote de 5 ratones BALB/c, evidenció la presencia de tripomastigotes sanguíneos (estadio infeccioso) fusiformes, núcleo central y cinetoplasto de ubicación subterminal (Figura 1), a partir del séptimo día postinoculación vía intraperitoneal, estableciéndose la parasitemia aguda a partir de la tercera semana de infección hasta la séptima semana de estudio (Gráfica 2). Los valores más altos de parasitemia, de 1649 tripomastigotes sanguíneos/100 Campos a 100X de sangre periférica, fueron observados a los 28 días post-inoculación. Con base a este antecedente, se decidió realizar la infección de los triatomíneos vía oral, mediante la ingesta de sangre infectada con el parásito tripomastigote sanguíneo, a los 28 días post inoculación de los ratones BALB/c.



Gráfica 1. Curva de crecimiento *in vitro* de la cepa NinoA de *T. cruzi* en medio LIT. Cada punto representa la media \pm ES de tres repeticiones evaluado cada 2 días.

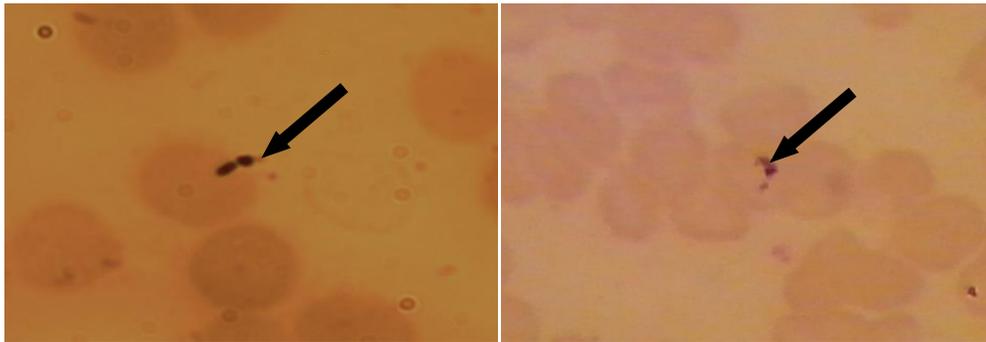
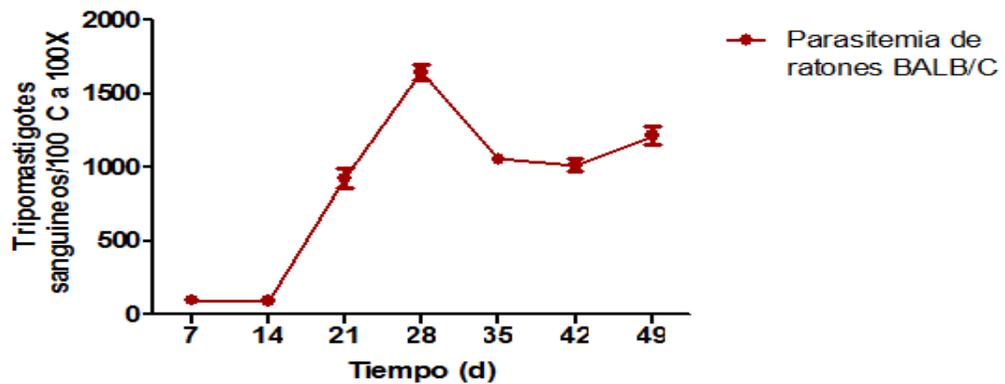


Figura 1. Frotis de sangre periférica de ratón BALB/c infectado por *T. cruzi*. La flecha negra señala el parásito *T. cruzi*. Tinción de Giemsa 100X.



Gráfica 2. Curva de parasitemia en ratones BALB/c inoculados con la cepa NinoA de *T. cruzi*. Cada punto representa la media \pm ES de 5 repeticiones evaluados cada 7 días.

SDS-PAGE de proteínas totales del estómago de *Meccus pallidipennis* inducidas o modificadas en su expresión debido a la infección por *T. cruzi*.

La ingesta de sangre infectada con *T. cruzi* indujo cambios en el patrón de expresión de proteínas totales en el estómago del triatomino. Sin embargo, el análisis electroforético sugiere que a las 12h de infección por *T. cruzi* el perfil de bandas de proteínas totales del estómago de *M. pallidipennis* no se modificó al ser comparado con el perfil del grupo control (libre de infección) (Figura 2). Pero los tiempos posteriores evidencian diferencias con respecto al perfil de bandas de proteínas de la condición control. Los asteriscos rojos, en la Figura 2, muestra un grupo de bandas de aproximadamente 124 kDa (evidente a los 5 y 7 días postinfección), de 145 kDa (evidente a las 24h), y una de 178 kDa (evidente a los 3 y 5 días) que se encuentran ausentes en el perfil de proteínas de estómago infectado por *T. cruzi*. El perfil experimental no evidenció cambios cualitativos, pero si se evidenciaron bandas de proteínas que se ven modificadas en su nivel de expresión, comparado con el perfil de proteínas de la condición libre de infección, en la figura 2 se representan con flechas negras. Estos resultados permitieron definir que el análisis de electroforesis 2D se realizaría a los 5 días postalimentación, donde se evidencian diferencias cualitativas (asteriscos rojos), así como cuantitativas en el nivel de expresión (flechas negras).

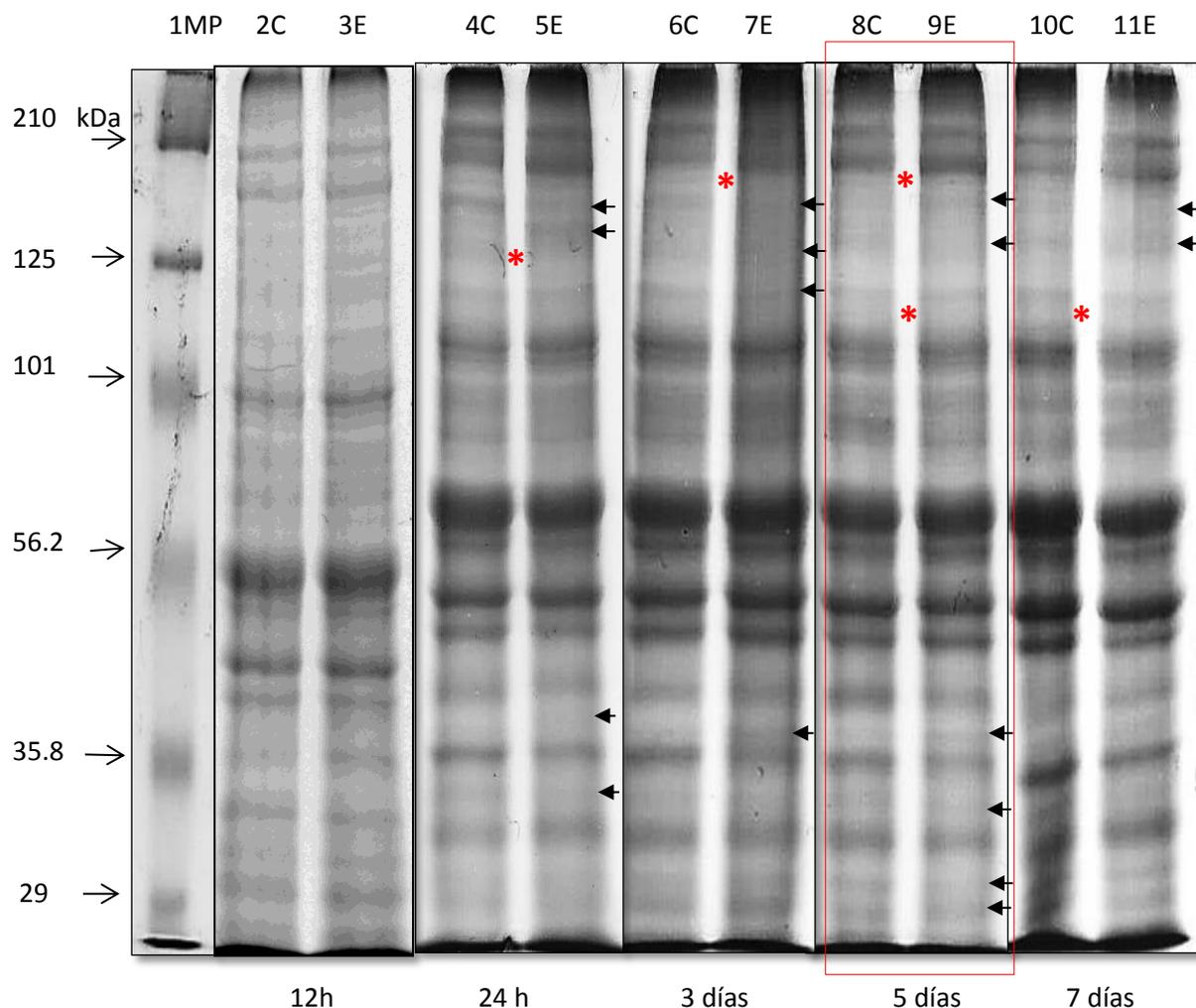


Figura 2. Perfil de proteínas totales del estómago de *Meccus pallidipennis* infectado con *T. cruzi* y estado libre de infección. Las proteínas totales del estómago (25µg) fueron analizadas por SDS-PAGE al 10% y teñidos con Azul de Coomassie R-250. Carril 1.- Marcador de peso molecular. Carriles 2C, 4C, 6C, 8C y 10C.- Proteínas totales de los estómagos libres de infección obtenidos a las 12h, 24h, 3d, 5d y 7d postalimentación. Carriles 3E, 5E, 7E, 9E y 11E.- Proteínas totales de estómagos infectados con *T. cruzi* obtenidos a las 12h, 24h, 3d, 5d y 7d postinfección. Los asteriscos indican proteínas observadas únicamente en la condición control libre de infección. Las flechas señalan las proteínas que modifican su expresión en los diferentes tiempos de estudio. Se señala con un rectángulo rojo el tiempo de 5d, donde se observan mayores diferencias en el patrón de expresión de proteínas del estómago infectado por *T. cruzi*.

Mapa proteico bidimensional del estómago de *Meccus pallidipennis* asociado a la infección por *T. cruzi*.

Se compararon los mapas proteicos de réplicas de geles para cada condición. Tras la detección automática de las manchas proteicas y el emparejamiento de las mismas en todos los geles, se realizó una revisión detallada de forma manual, esto permitió obtener perfiles reproducibles en términos del número de manchas proteicas, posiciones e intensidades relativas. El mapa proteico de la condición experimental del estómago de *M. pallidipennis* a los 5 días postinfección con *T. cruzi* evidenció un promedio de 356 manchas proteicas (Figura 3A). En contraste, el mapa proteico del estómago de *M. pallidipennis* de la condición control libre de infección por *T. cruzi* evidenció un promedio de 295 manchas proteicas, ambas condiciones enfocadas en el rango de peso molecular entre ~10-~150 kDa aproximadamente, pI entre ~4.5-10 (Figura 3B), estos datos permiten observar que entre los mapas proteicos 275 manchas empalmaron, coincidiendo en las dos condiciones control y experimental, lo que indica que el resto de las proteínas presentan expresión diferencial.

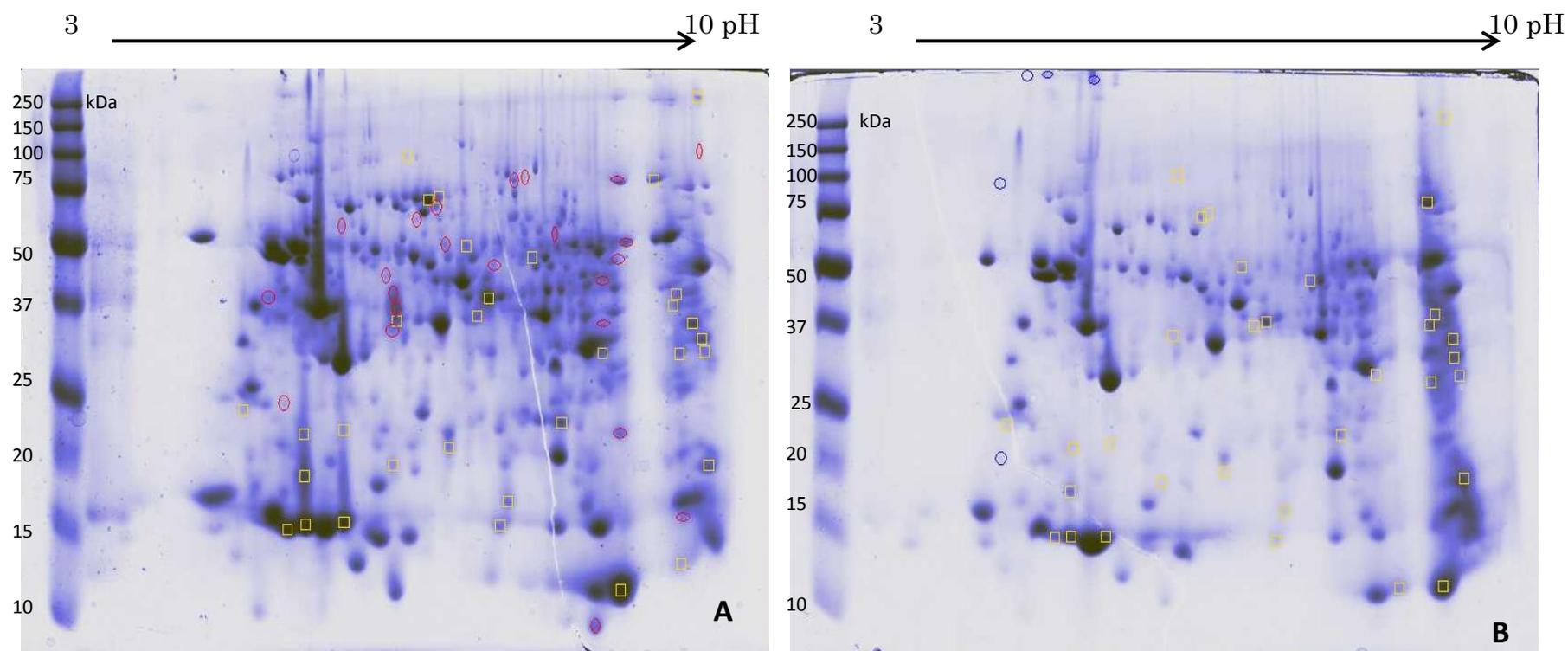


Figura 3. Perfil proteico 2D del estómago de *Meccus pallidipennis* 5 días postinfección por *T. cruzi* (A) y estado libre de infección (B). Las proteínas (150 µg) fueron separadas en geles de poliacrilamida-SDS al 12% en un rango de pH 3-10, teñidas con azul de Coomassie G-250. Manchas proteicas de la condición experimental se destacan con círculos rojos, para la condición control se indican en círculos azules y los cambios cuantitativos se muestra en cuadros amarillos.

Expresión diferencial del mapa proteico bidimensional del estómago de *Meccus pallidipennis* infectado por *T. cruzi* y estado libre de infección.

El análisis comparativo de los mapas proteicos evidenció diferencias cualitativas y cuantitativas de manchas en el perfil proteico del estómago de *Meccus pallidipennis* a los 5 días postinfección con *T. cruzi* al ser comparado con el mapa control libre de infección. Las manchas proteicas con expresión diferencial son señaladas en el gel maestro, el cual consiste en una imagen digital que determina la totalidad de manchas proteicas que constituyen el experimento (grupo control y el grupo experimental), la posición en el gel y la calidad de la mancha (Figura 4). Evidenció que 60 manchas proteicas presentaron expresión diferencial con significancia estadística con valores de $p < 0.05$.

Cinco proteínas están ausentes en el perfil proteico del estómago infectado, mientras que 23 manchas proteicas solo fueron detectadas en el mapa proteico del estómago infectados con *T. cruzi*. Además, 32 manchas proteicas presentaron cambios cuantitativos en la relación de intensidad relativa, es decir cambios + o - a 2 veces tomando como referencia el perfil proteico control (Tabla1). El análisis bioinformático de los geles 2D permitió seleccionar 23 proteínas candidatas para su análisis por espectrometría de masas resaltadas en el gel maestro (Figura 4).

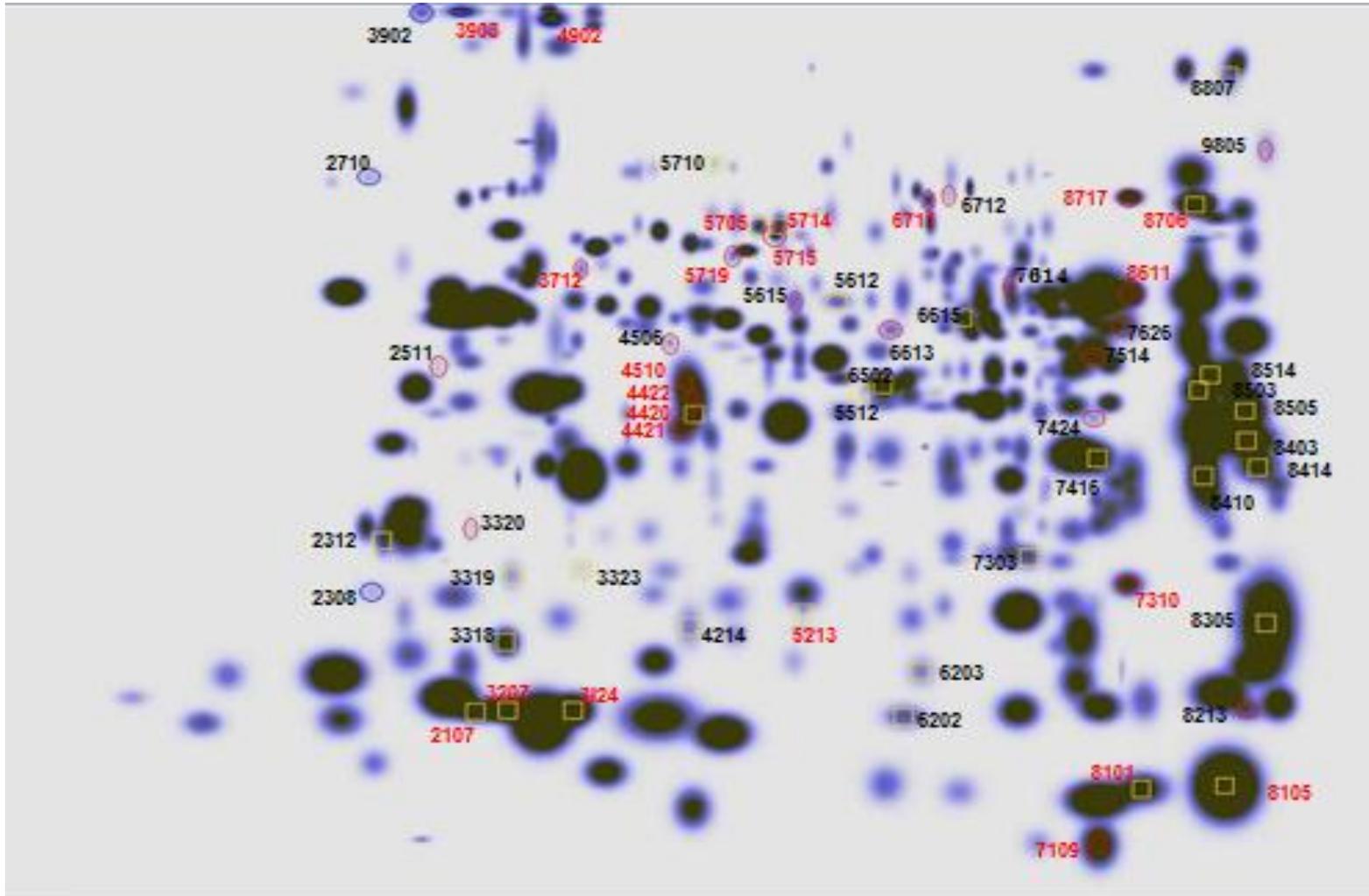


Figura 4. Gel maestro obtenido por superposición de réplicas de perfiles proteicos 2D del estómago de *Meccus pallidipennis* a los 5 días postinfección por *T. cruzi* y libre de infección. Las proteínas (150 µg) fueron separadas en geles de poliacrilamida-SDS al 12% en un rango de pH 3-10, visualizadas por tinción de azul de Coomassie G-250. Se resaltan las proteínas en color rojo, de la condición experimental con círculos rojos (11 manchas), y la condición control círculos azules (2 manchas) así como los cambios cuantitativos, en cuadros amarillos (10 manchas) que se proponen como candidatas para análisis por MALDI-ToF.

Tabla 1. Diferencias cualitativas y cuantitativas del perfil proteico del estómago de *Meccus pallidipennis* infectado con *T. cruzi*. n=3 p<0.05. En negritas se destaca las proteínas candidatas a MALDI-ToF.

Diferencias cualitativas			Diferencias cuantitativas					
Experimental			Experimental			Control		
No. Spot	Densidad	CV (%)	No. spot	Densidad	CV (%)	Densidad	CV (%)	Ratio
2511	2.32E+06	22.5	8403	1.21E+07	56.1	2.65E+08	24.1	-20
3320	2.27E+06	6.7	8706	2.04E+07	9.2	1.78E+08	3.9	-9.09
3712	2.64E+06	24.8	8105	1.08E+08	7.6	8.74E+08	27.1	-8.33
4421	5.16E+07	4.5	8414	1.53E+07	11.5	1.31E+08	22.8	-8.33
4422	1.89E+08	5.9	8807	3.54E+06	16.1	2.80E+07	19.8	-7.69
4506	2.06E+06	16.3	8305	9.58E+07	3.5	6.92E+08	18.2	-7.14
4510	4.53E+07	1.3	8503	2.66E+07	81	1.40E+08	13	-5.26
5615	9.85E+06	24.6	8505	9.06E+07	10.8	3.11E+08	16.5	-3.45
5715	3.92E+06	9.3	8514	3.10E+07	16.3	9.52E+07	6.3	-3.13
5719	2.37E+06	15.9	5710	5.44E+05	34.7	1.58E+06	11.1	-2.94
6613	6.00E+06	22.8	2312	7.78E+06	7.6	2.03E+07	13.5	-2.63
6711	9.45E+06	25.5	8410	8.80E+07	1	2.20E+08	18.6	-2.50
6712	1.92E+06	14.3	3124	4.35E+08	7.8	2.02E+08	13.2	+2.15
7109	1.29E+08	20.8	6502	2.07E+08	3.5	9.12E+07	25.9	+2.26
7310	5.13E+07	31.4	4420	1.40E+07	4.2	5.98E+06	6	+2.34
7424	5.20E+06	16	7416	7.84E+07	16.8	3.11E+07	11.1	+2.53
7514	5.00E+06	7.2	6202	8.12E+07	8.6	3.00E+07	48.6	+2.71
7614	1.02E+07	7.8	5612	4.63E+07	18.2	1.68E+07	12.1	+2.76
7626	1.26E+07	0.2	7303	7.22E+07	12.2	2.45E+07	1	+2.95
8213	3.01E+07	12.5	6615	3.67E+07	16.2	1.23E+07	0.6	+2.98
8611	3.65E+07	24.3	3318	2.83E+08	2	7.12E+07	0.5	+3.98
8717	6.00E+07	15.1	6203	6.85E+07	8.8	1.71E+07	17.7	+4.02
9805	1.06E+07	21.7	4214	1.90E+07	12.9	4.66E+06	49.8	+4.08
	Control		3207	8.50E+08	12	2.05E+08	29.6	+4.14
			2107	3.16E+08	12.2	6.84E+07	11	+4.63
2308	8.61E+06	18.7	5213	2.99E+07	13.8	4.26E+06	10.7	+7.02
2710	4.87E+06	19.8	8101	1.06E+09	12.5	1.47E+08	11	+7.25
3902	1.35E+07	17.9	3319	9.67E+07	26	1.27E+07	9.6	+7.59
3903	3.75E+07	18.6	5705	1.45E+08	2	1.55E+07	5	+9.35
4902	4.15E+07	25.6	3323	2.29E+07	19	1.92E+06	10.6	+11.93
			5714	2.00E+07	5.1	1.20E+06	10.6	+16.68
			5512	1.96E+07	7.5	8.24E+05	62.8	+23.80

VI. DISCUSIÓN

El intestino medio anterior (estómago) de *Meccus pallidipennis*, es el primer depósito de sangre después de la ingesta, por lo tanto, representa el primer sitio de respuesta en contra del parásito *T. cruzi*. El análisis proteómico constituye una herramienta fundamental para la obtención de perfiles de expresión diferencial de proteínas, modificadas diferencialmente por la presencia del parásito *T. cruzi* o proteínas que desempeñen un papel importante en el mecanismo de digestión de la sangre (Berth *et al.*, 2007; Dowsey *et al.*, 2010).

En el trabajo realizado por Henriques *et al.*, (2012) evaluaron el ciclo biológico del parásito y la progresión de la infección por *T. cruzi* en las diferentes fracciones del tracto intestinal de *Rhodnius prolixus*, evidenciando que a los 7 y 14 días predominan epimastigotes, alojados en el estómago (intestino medio anterior) e intestino medio posterior respectivamente, para el día 21 y 28 la infección se establece en el recto, predominando tripomastigotes metacíclicos que constituyen la forma infecciosa, concluyendo el ciclo biológico del parásito en el vector.

Con base en estos hallazgos se programó realizar el análisis electroforético de proteínas totales del estómago a las 12h, 24h, 3, 5 y 7 días postinfección (periodo durante el cual se encuentra el parásito en el estómago de este vector). Los resultados sugieren que a las 12h no hay diferencias en los perfiles de proteínas de ambas condiciones (Figura 2). Sin embargo en los tiempos posteriores fue posible observar diferencias de los 2 grupos analizados, se destacan algunas bandas que no fueron observadas en la condición experimental (representadas con asteriscos) proteínas de aproximadamente 124 kDa (evidente a los 5 y 7 días postinfección), 145 kDa (evidente a las 24h), y una de 178 kDa (evidente a los 3 y 5 días). Sin embargo se evidenciaron bandas de proteínas que se ven modificadas en su nivel de expresión en el perfil experimental en comparación con el control (Figura 2). Este primer análisis evidenció que la presencia del parásito *T. cruzi* en el estómago modifica el perfil de proteínas, principalmente a los 5 días postinfección, lo que parece estar relacionado con los antecedentes que proponen que la dinámica de interacción de *T. cruzi* en triatominos comienza tras la ingesta de sangre infectada,

donde los parásitos se enfrentan a componentes como enzimas digestivas, hemolisinas, aglutininas, la microbiota y factores antimicrobianos presentes en el tracto digestivo del insecto vector, por lo que este insecto no actúa como un anfitrión pasivo (García *et al.*, 2010a). Además, se ha reportado que el tracto digestivo de los triatominos constituye un tejido inmune competente (Ursic-Bedoya y Lowenberger, 2007). Destacando que el contenido del estómago posee actividad antibacteriana superior en comparación con el intestino medio posterior (Castro *et al.*, 2012; Vieira *et al.*, 2014). Castro *et al.*, (2012) observaron un aumento significativo de la actividad antibacteriana a los 9 días en comparación con los 5 y 16 días postinfección por *T. cruzi* en el estómago de *R. prolixus*, además, del aumento de la activación de fenoloxidasa (PO) y la reducción de óxido nítrico (NO), relacionado con la disminución de la microbiota y el aumento de la población de *T. cruzi* en el tracto digestivo. Por su parte Whitten *et al.*, (2007) sugieren que la expresión del gen NO sintetasa y la producción de NO puede ser modulada de manera diferencial y patógeno específico en diversos tejidos de *R. prolixus*. Sus hallazgos mostraron que a los 1-2 días postinfección por *T. cruzi* en el estómago se incrementa la expresión del gen NO sintetasa y la producción de NO.

Uno de los principales componentes de la inmunidad innata en estos insectos, es la síntesis de péptidos antimicrobianos (AMP), expresados en respuesta a diferentes tipos de infección en el tracto digestivo (Boulanger *et al.*, 2006). Vieira *et al.*, (2014) revelaron que la infección oral con bacterias Gram-positivas (*S. aureus*) y Gram-negativas (*E. coli*) a diferentes días postinfección (1 y 7 días) altera diferencialmente los patrones de expresión de mRNA codificantes para AMP en el estómago. Durante el 1^{er} día de infección con *E. coli* se incrementa la expresión *DefC*, mientras que *LysB* disminuye significativamente, en contraste, la infección con *S. aureus* mostró un incremento de *DefA*, *DefB*, *LysA* y *Prolixin* en comparación con los insectos control, sin embargo, a los 7 días postinfección disminuye la transcripción de *DefB*, *DefC*, *prolixin* y *LysB* en los insectos infectados con *E. coli* o *S. aureus*. Por su parte Ursic-Bedoya *et al.*, (2008) caracterizaron e identificaron 2 genes que codifican lisozimas; la lisozima A (*RpLys-A*) evidenció un aumento en la expresión de mRNA en el tracto intestinal a los 7 y 14 días postinfección con *T. cruzi*, la lisozima B (*RpLys-B*) se

expresó principalmente en la grasa corporal a las 8 y 24 h después de una infección bacteriana. Mientras que Araújo *et al.*, (2006) demostraron que los genes *def1* y *Lys1* incrementan la expresión de mRNA en el tracto digestivo de *Triatoma brasiliensis*, a los 5 días después de la alimentación, pero la expresión fue mayor en el estómago que en el intestino medio posterior.

Estos antecedentes evidencian cambios de expresión de genes a nivel de mRNA en el estómago e intestino medio posterior, modificados en respuesta a la infección por el parásito *T. cruzi* e infecciones bacterianas. Sin embargo, hasta la fecha se ha publicado poca información en relación con los perfiles de expresión diferencial bajo la infección por *T. cruzi* en el tracto digestivo de los principales vectores de la enfermedad de Chagas, aunado a esto, las investigaciones realizadas se dirigen a la cuantificación de mRNA y el uso de etiquetas de secuencias expresadas (EST) (Whitten *et al.*, 2007; Buarque *et al.*, 2013).

Buarque *et al.*, (2013) evidenciaron la expresión diferencial de genes en el intestino medio de *T. infestans* a las 24h después de la infección por *T. cruzi*, mediante etiquetas de EST, genes participantes en muchos procesos, como metabolismo energético, desintoxicación, inmunidad y el control de proteinasas, etc. de los cuales fueron seleccionados un grupo de genes con expresión diferencial, para cuantificar mediante qRT-PCR. Estos resultados confirman los cambios de expresión, tal es el caso de la tiorredoxina que disminuye la cantidad de mRNA bajo la infección por *T. cruzi*, mientras que, nitroforina, una proteína de 14 kDa, lisozima y catepsina D aumentan su expresión significativamente.

Con base a lo anterior, la cuantificación del mRNA no siempre refleja el nivel de proteína correspondiente a la expresión genética, por lo que se realizó un análisis proteómico mediante electroforesis bidimensional, con el propósito de observar el proteoma del estómago de *M. pallidipennis* a los 5 días postinfección con *T. cruzi*, tiempo de estudio que presentó una mayor diferencia en el perfil proteico observado en los corrimientos de SDS-PAGE (Figura 2). El análisis comparativo de geles 2D permite determinar perfiles de proteínas modificadas diferencialmente (Dowsey *et al.*, 2010). El análisis del mapa proteico del estómago infectado por *T. cruzi*, reveló 356 manchas proteicas, mientras que el mapa proteico del estómago libre de infección

evidenció 295 manchas proteicas, ambas condiciones enfocadas en el rango de peso molecular entre ~10 a ~150 kDa y pI entre ~4.5 a ~10, de las cuales 60 presentaron expresión diferencial ($p < 0.05$) (Figura 3). Contrastando ambas condiciones, se observó que 5 proteínas están ausentes en el perfil del estómago infectado por *T. cruzi* y presentes en el control sano, en contraparte, 23 manchas se encontraron específicamente en el mapa proteico del estómago infectado por *T. cruzi* además, 32 manchas proteicas manifestaron cambios cuantitativos en su relación de la intensidad relativa que refleja sus niveles de expresión según la condición (Tabla 1). Estos resultados exhiben una similitud en la resolución de las manchas proteicas que constituyen el mapa del intestino medio de *Ae. Albopictus* alimentado con azúcar, donde se resolvieron 340 manchas proteicas (Saboia-Vahia *et al.*, 2012). Sin embargo, la discrepancia entre los diversos estudios se debe probablemente a las diferencias fisiológicas de intestino medio y el método utilizado para la separación y tinción de las proteínas. En el presente estudio, el análisis comparativo de los geles 2D evidenció que la presencia del parásito *T. cruzi* en el estómago de *M. pallidipennis* induce la expresión diferencial de 60 proteínas a los 5 días postinfección, revelando cambios cualitativos y cuantitativos. Otras investigaciones han evidenciado que el proteoma del intestino medio de insectos vectores hematófagos, es modificado diferencialmente ante la presencia de un agente infeccioso.

Tchankouo-Nguetcheu *et al.*, (2010) reportaron que el perfil proteico 2D constituido por un promedio de 840 manchas proteicas del intestino medio de *Aedes aegypti*, es modificado diferencialmente a los 7 días después de la infección oral con virus del dengue-2 (DENV-2) y Chikungunya (CHIKV), el análisis comparativo del perfil bidimensional demostró que 18 proteínas son moduladas diferencialmente por DENV-2, 12 proteínas por CHIKV, mientras que 20 fueron reguladas por ambos virus ya sea de forma similar o diferente. Sus hallazgos señalan que el CHIKV y DENV-2 son capaces de modular la expresión de proteínas con función estructural (Citoesqueleto), redox, proteínas reguladoras, y las enzimas de varias rutas metabólicas. Ambos virus inducen una sobreexpresión de proteínas implicadas en la protección celular, respuesta antioxidante y desintoxicación. La investigación

realizada por Serrano-Pinto *et al.*, (2010) evidenciaron la expresión diferencial de 21 proteínas que incrementan su expresión en el intestino medio de *Anopheles albimanus* después de 24h de la ingesta de sangre infectada con *Plasmodium berghei*, la identificación por espectrometría propone homología con proteínas de diversos grupos funcionales participantes en la inmunidad (34.78%), la digestión de la sangre/proteasas de inmunidad (15.21%), proteínas implicadas en redox/mitocondrial y el metabolismo de proteínas (8.69%), proteínas de regulación transcripcional y proteínas con funciones desconocidas (6.52%), seguido por las proteínas implicadas en el transporte, la respuesta gustativa, el proceso de traducción, la biogénesis y proteínas con actividad enzimática (2.17%).

Por su parte, Zhang *et al.*, (2013) destacaron que después de 8 días postinfección viral con DENV-2 es modificado el perfil proteico del intestino medio de mosquito *Aedes albopictus*, enfatizando la expresión diferencial de 23 manchas proteicas, de las cuales 21 disminuye su expresión significativamente, sin embargo, 2 manchas proteicas incrementan su expresión. La identificación de 10 proteínas propone una variedad de funciones correspondientes a chaperonas, citoesqueleto, enzimas de varias rutas metabólicas y proteínas multifuncionales.

Por lo anterior, se destacan 23 proteínas con expresión diferencial como candidatas para su identificación por espectrometría de masas (MS) (Figura 4) para deducir sus características funcionales correspondientes a la dinámica de interacción parásito-vector. Considerando que el enfoque proteómico se ha convertido en una herramienta fundamental en la investigación en salud, útil para la identificación de proteínas que intervienen en diversas etapas de una enfermedad, ayuda a comprender las bases moleculares de dicha anomalía, asimismo, la identificación de biomarcadores de diagnóstico o pronóstico, nuevos blancos terapéuticos, conocimiento de la biología del sistema, por lo que constituye una de las herramientas idóneas para el control de las enfermedades infecciosas (Pando-Robles y Lanz-Mendoza, 2009).

VII. CONCLUSIONES

- 1.- Se demostró que la presencia del parásito *T. cruzi* en el estómago (Intestino medio anterior) de las hembras de *M. pallidipennis* modifica el perfil proteico a las 24h, 3, 5 y 7 días postinfección; siendo estas diferencias más marcadas a los 5 días de infección.
- 2.- El análisis comparativo del mapa proteico bidimensional del estómago de *M. pallidipennis* infectado con *T. cruzi* confirmó la expresión diferencial de 60 proteínas con cambios cualitativos y cuantitativos a los 5 días postinfección.
- 3.- Se capturó el mapa proteico bidimensional del estómago de *M. pallidipennis* asociado a la infección con *T. cruzi* y mapa proteico bidimensional del estómago libre de infección, lo que constituye un análisis primario para estudios futuros con el interés de esclarecer la interacción parásito-vector.

VIII. PERSPECTIVAS

Se propone la identificación de 23 manchas proteicas, que presentaron expresión diferencial significativa asociado a la infección con *T. cruzi* en el estómago de *M. pallidipennis*, por espectrometría de masas MALDI-ToF, para deducir sus características funcionales correspondientes a la dinámica de interacción parásito-vector. Además, sería muy importante la búsqueda de proteínas modificadas diferencialmente en el estómago de machos de *M. pallidipennis* bajo la infección con *T. cruzi* así como en los diversos estadios de desarrollo de este insecto. De igual forma la búsqueda de estas proteínas en los diversos géneros de insectos vectores de la enfermedad de Chagas con la finalidad de encontrar blancos moleculares sobre los cuales se puedan desarrollar métodos de control biológico dirigidos a la interrupción del ciclo biológico de este parásito en el insecto vector.

IX. REFERENCIAS

- Albuquerque-Cunha, J., Gonzalez, M., Garcia, E., Mello, C., Azambuja, P., Almeida.** (2009). Cytochemical characterization of microvillar and perimicrovillar membranes in the posterior midgut epithelium of *Rhodnius prolixus*. *Arthropod Struct Dev*, 38, 31–44.
- Araújo, C., Waniek, P., Stock, P., Mayer, C., Jansen, A., Schaub, G.** (2006). Sequence characterization and expression patterns of defensin and lysozyme encoding genes from the gut of the reduviid bug *Triatoma brasiliensis*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 36, 547–560.
- Assumpcao, T., Charneau, S., Santiago, P., Francischetti, I., Meng, Z., Araujo, C., et al** (2011). Insight into the Salivary Transcriptome and Proteome of *Dipetalogaster maxima*. *J Proteome Res*, 10, 669–679.
- Azambuja, P., Feder, D., Garcia, E.** (2004). Isolation of *Serratia marcescens* in the midgut of *Rhodnius prolixus*: Impact on the establishment of the parasite, *Trypanosoma cruzi*, in the vector. *Exp Parasitol.*, 107, 89-96.
- Azambuja, P., Ratcliffe, N., Garcia, E.** (2005). Towards an understanding of the interactions of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* within the reduviid insect host *Rhodnius prolixus*. *An Acad Bras Cienc*, 77, 397-404.
- Balczun, C., Meiser, C., Schaub, G.** (2012). Triatomines as Vectors of American Trypanosomiasis. *Parasitol Res Monog*, 3, 275–299.
- Berth, M., Moser, F., Kolbe, M., Bernhardt, J.** (2007). The state of the art in the analysis of two-dimensional gel electrophoresis images. *Appl Microbiol Biotechnol*, 76, 1223-1243.
- Borges, E., Machado, E., Garcia, E., Azambuja P.** (2006). *Trypanosoma cruzi*: effects of infection on cathepsin D activity in the midgut of *Rhodnius prolixus*. *Exp. Parasitol*, 112, 130–133.
- Boulanger, N., Bulet, P., Lowenberger, C.** (2006). Antimicrobial peptides in the interactions between insects and flagellate parasites. *Trends Parasitol*, 22, 262–268.
- 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.
- Brener, Z.** (1962). Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, 4(6), 389-396.

Buarque, D., Braz, G., Martins, R., Tanaka-Azevedo, A., Gomes, C., Oliveira, F. et al., (2013). Differential expression profiles in the midgut of *Triatoma infestans* infected with *Trypanosoma cruzi*. *PLoS ONE*, 8, e61203.

Castro, D., Moraes, C., Gonzalez, M., Ratcliffe, N., Azambuja P. (2012) *Trypanosoma cruzi* Immune Response Modulation Decreases Microbiota in *Rhodnius prolixus* Gut and Is Crucial for Parasite Survival and Development. *PLoS ONE*, 7(5), e36591.

Dowsey, A., Morris, J., Gutstein, H., Yang, G. (2010). Informatics and Statistics for Analyzing 2-D Gel Electrophoresis Images. *Methods Mol Biol*, 604, 239–255.

García, E., Castro, D., Figueiredo, M., Azambuja, P. (2010b). Immune homeostasis to microorganisms in the guts of triatomines (Reduviidae): a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 105, 605–610.

García, E., Genta, F., Azambuja, P., Schaub, G. (2010a). Interactions between intestinal compounds of triatomines and *Trypanosoma cruzi*. *Trends Parasitol*, 26, 499–505.

Gutiérrez-Cabrera, A., Alejandro-Aguilar, R., Hernández-Martínez, S., Espinoza, B. (2014). Development and glycoprotein composition of the perimicrovillar membrane in *Triatoma (Meccus) pallidipennis* (Hemiptera: Reduviidae). *Arthropod Struct Dev* 43, 571–578.

Henriques, C., Castro, D., Gomes, L., Garcia, E., Souza, W. (2012). Bioluminescent imaging of *Trypanosoma cruzi* infection in *Rhodnius prolixus*. *Parasit Vectors*, 5(214), 2-15.

Kollien, A. and Schaub, G. (2000). The development of *Trypanosoma cruzi* in Triatominae. *Parasitol. Today*, 16, 381–387.

Laemmli U. (1970). Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227(5259), 680-685.

Lopez, L., Morales, G., Wolff, M., Lowenberger, C. (2003). Isolation and characterization of a novel insect defensin from *Rhodnius prolixus*, a vector of Chagas' disease. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 33, 439–447.

López-Ordóñez, T., Panzera, F., Tun-Ku, E., Ferrandis, I., Ramsey, J. (2009). Contribuciones de la genética y la proteómica al estudio de la enfermedad de Chagas. *Salud Publica Mex*, 51(3), S410-S423.

Martínez-Ibarra, J., Noguera-Torres, B., García-Benavídez, G., Vargas-Llamas, V., Bustos-Saldaña, R., Montañez-Valdez, O., (2012) Bionomics of populations of *Meccus pallidipennis* (Stål), 1872 (Hemiptera: Reduviidae) from Mexico. *Journal of Vector Ecology*, 37, 474–477.

Martínez-Ibarra, J., Noguera-Torres, B., Salazar-Schettino, P., Vences-Blanco, M., Torre-Álvarez, F., Montañez-Valdez, O. (2014). Differences on biological attributes of three populations of *Meccus pallidipennis* Stål (Hemiptera: Reduviidae). *J Vector Borne Dis* 51, 22–26.

Monteón, V., Godínez, S., Cruz-Zetina, G., Balmes, J., López, R., Hernández, O. (2009) Caracterización biológica de aislados mexicanos de *Trypanosoma cruzi*: metacicloogénesis, parasitemia y resistencia contra benznidazol. *Rev Biomed*, 20, 206-214.

Nogueira, N., Gonzalez, M., Gomes, J., de Souza, W., Garcia, E.S., Azambuja. (2007). *Trypanosoma cruzi*: involvement of glycoinositolphospholipids in the attachment to the luminal midgut surface of *Rhodnius prolixus*. *Exp. Parasitol*, 116, 120–128.

Saboia-Vahia, L., Borges-Veloso, A., Cuervo, P., Junqueira, M., Mesquita-Rodrigues, C., Britto, C., et al. (2012). Protein expression in the midgut of sugar-fed *Aedes albopictus* females. *Parasites Vectors*. 5, 1–25.

Silva, J., Mury, F., Oliveira, M., Oliveira, P., Silva, C., Dansa-Petretski, M. (2007). Perimicrovillar membranes promote hemozoin formation into *Rhodnius prolixus* midgut. *Insect Biochem. Mol. Biol*, 37, 523–531.

Silva-Neto, M., Fampa, P., Donato, C., Carneiro, A. B. (2010). Atella. Cell Signaling During *Trypanosoma cruzi* Development in Triatominae. *Open Parasitol J*, 4, 188-194.

Sojka, D., Francischetti, I., Calvo, E., Kotsyfakis, M. (2011). Cysteine proteases from bloodfeeding arthropod ectoparasites. *Adv. Exp. Med. Biol*, 712, 177–191.

Tartarotti, E., Azeredo-Oliveira, M., Ceron, C. (2006). Phylogenetic approach to the study of triatomines (Triatominae, Heteroptera). *Braz. J. Biol*, 66(2B), 703–708.

Ursic-Bedoya, R., Lowenberger, C. (2007). *Rhodnius prolixus*: identification of immune-related genes up-regulated in response to pathogens and parasites using suppressive subtractive hybridization. *Dev. Comp. Immunol*, 31, 109–120.

Ursic-Bedoya, R., Nazzari, H., Cooper, D., Triana, O., Wolff, M., Lowenberger, C. (2008). Identification and characterization of two novel lysozymes from *Rhodnius prolixus*, a vector of Chagas disease. *J. Insect Physiol*, 54, 593–603.

Valente, L., Neves, C., Zanuncio, J., Serrão, J. (2010). Digestive cells in the midgut of *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) in different starvation periods. *C. R. Biol*, 333, 405–415.

Vieira, C., Waniek, P., Mattos, D., Castro, D., Mello, C., Ratcliffe, N., et al. (2014). Humoral responses in *Rhodnius prolixus*: bacterial feeding induces differential

patterns of antibacterial activity and enhances mRNA levels of antimicrobial peptides in the midgut. *Parasit Vectors*, 7, 232.

Waniek, P., Castro, H., Sathler P., Miceli, L., Jansen, A., Araújo C. (2009). Two novel defensin-encoding genes of the Chagas disease vector *Triatoma brasiliensis* (Reduviidae, Triatominae): gene expression and peptide-structure modeling. *J. Insect Physiol.* 55, 840–848.

Whitten, M., Sun, F., Tew, I., Schaub, G., Soukou, C., Nappi, A., et al. (2007). Differential modulation of *Rhodnius prolixus* nitric oxide activities following challenge with *Trypanosoma rangeli*, *T. cruzi* and bacterial cell wall components. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 37, 440–452.