



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

**“IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS EXPRESADAS
DIFERENCIALMENTE POR LA HEMATOFAGIA EN EL
ESTÓMAGO DE *Meccus pallidipennis*”.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

JORGE ISIDORO SOTELO CANO

DIRECTOR DE TESIS: Dr. PÁVEL SIERRA MARTÍNEZ

CHILPANCINGO, GRO., ENERO DE 2011.

ÍNDICE

Página

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
MATERIALES Y MÉTODOS	6
RESULTADOS	9
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	15
ANEXOS	20
REFERENCIAS	22

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Control Biológico de la Unidad de Investigación Especializada en Microbiología, de la Universidad Autónoma de Guerrero, Chilpancingo, Guerrero, México.

Bajo la dirección de:

Dr. Pável Sierra Martínez

La Tutoría de:

Dra. Mónica Espinoza Rojo.

La Asesoría de:

Dr. José Lino Zumaquero Ríos

Dr. Marco Antonio Leyva Vázquez

Dr. Donaciano Flores Robles

Dr. Alejandro Millán Vega

Durante el período en que se curso la Maestría en Ciencias Biomédicas, El C. Jorge Isidoro Sotelo Cano recibió la beca CONACYT.

Así mismo se agradece al Banco Santander Serfín por la beca otorgada de Movilidad Santander Universia, durante el período de Agosto-Diciembre 2010.

AGRADECIMIENTOS

Al **Dr. Pável Sierra Martínez** gracias por la confianza vertida en mi persona, su ayuda incondicional y por todo el tiempo y esfuerzo puesto en este trabajo que sin duda se vio reflejado en los resultados obtenidos.

Al **Dr. José Lino Zumaquero Ríos**, por la aportación de las chinches *Meccus pallidipennis*, así como sus valiosas aportaciones.

A la **Dra. Hortensia Carrillo Ruiz**, por su dedicación y paciencia para enseñarme a disectar los triatominos.

Al **Dr. Eduardo Castañeda Saucedo**, por sus consejos y ayuda desinteresada, que sin duda fueron muy importantes.

Al **Dr. Donaciano Flores Robles**, por su tiempo y aportaciones para la realización de este trabajo.

Al **Dr. Alejandro Millán Vega**, por las aportaciones brindadas en este trabajo.

Al **Dr. Marco Antonio Leyva Vázquez**, por sus valiosas aportaciones en este trabajo.

A la **Maestra Daysi y el Maestro Alfredo**, por sus consejos y permitirme trabajar en el laboratorio al lado de ustedes.

A la **Bióloga Paola**, solo me pregunto qué haríamos sin tu preciado trabajo. Mil gracias por todo.

A la **Dra. Alicia Chagolla López**, por la identificación por MALDI-TOF de las proteínas.

A la **Dra. Mónica Espinoza Rojo**, por el esfuerzo realizado como mi tutora, al orientarme en momentos de duda y dificultad. Gracias.

A la **Dra. Elvia Rodríguez Bataz**, por su amistad y palabras de aliento cuando todo parecía derrumbarse.

DEDICATORIA

Tanto mis imperfecciones y fracasos como mis éxitos y dones son bendiciones de **Dios**, y lo deposito todo a sus pies.

Mahatma Gandhi

A mis Padres: **Bertha e Isidoro**. A ustedes que me han conducido con amor y paciencia, hoy ven forjado un anhelo, una ilusión y un deseo. Gracias por darme la libertad de elegir mi futuro y brindarme con las manos abiertas su apoyo y confianza en mi preparación. Porque hoy recibo una de sus más valiosas herencias. Por ustedes la obtuve y a ustedes se las brindo.

A mis hijos **Alejandra y Jose**, por permitirme robarles parte de su tiempo y sacarlos de su mundo para acompañarme en esta hermosa experiencia. Que este logro lo sientan como propio, con la esperanza de que algún día vean recompensados sus sacrificios.

A **Idanya**, gracias por tu apoyo incondicional, esperanza, estímulo constante y comprensión. Por estar allí en los momentos alegres así como en los difíciles. Recuerda siempre que, sencillamente te amo.

A mi hermana que con su amor y cariño se hace siempre presente. Gracias por formar parte de mi vida **Lupita**.

A mis compañeros y amigos, de la MCB: **Idanya, Karen, Betza, Magali, Lupita, Natalia, Jorge, Arturo, Jesús, Pepe Toño, Pepe Robledo, Adrian y Salvador**, que pertenecemos a esta generación, juntos pasamos momentos de angustia, así como momentos inolvidables.

A la familia Serafín Higuera, **Nicolás, Modesta, Addiel y Emir**, gracias por el apoyo recibido durante estos años de formación, además de recibirme en su familia.

“IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS EXPRESADAS DIFERENCIALMENTE POR LA HEMATOFAGIA EN EL ESTÓMAGO DE *Meccus pallidipennis*”.

RESUMEN

Meccus pallidipennis pertenece al orden de los Hemípteros, vectores de la enfermedad de Chagas, su sistema digestivo está dividido en tres regiones: anterior, media y posterior. Hasta el momento, en el estómago (como es conocida la región anterior del sistema digestivo) de estos organismos, no se han descrito proteínas implicadas en la digestión de la sangre ingerida. En este trabajo, mediante estrategias proteómicas, se identificaron proteínas de expresión diferencial relacionadas con el procesamiento de la sangre, sugiriendo la presencia de una maquinaria bioquímica necesaria durante el proceso de la hematofagia. Para lo cual se utilizaron estómagos de chinches macho, alimentados con sangre y disectados a 4 diferentes tiempos postalimentación (7, 15, 50 y 70 días). Las proteínas totales fueron analizadas mediante SDS-PAGE al 10 %, encontrándose un total de 15 bandas con expresión diferencial en los diferentes tiempos, de estas, dos fueron seleccionadas una de ~180 y otra de ~100 kDa en el día 15 postalimentación para su identificación por MALDI-TOF. En la banda de ~180 kDa se encontraron péptidos que no correspondieron con ninguna proteína conocida hasta el momento y necesariamente deberá ser secuenciada de “*de novo*” para su identificación, mientras que en la banda de ~100 kDa, se identificó una proteína no reportada para este organismo, la paramiosina, proteína cuya función de contracción y relajación muscular, con actividad motora, en este momento solo puede sugerirse con base a su homología con moléculas identificadas en *Sarcoptes scabiei*, *Dermatophagoides farinae* y *Boophilus microplus*, organismos que tienen contacto con la sangre durante su alimentación.

ABSTRACT

Meccus pallidipennis are insects from the Hemiptera order, and are vectors for the Chagas disease. They are haematophagous and their digestive system is divided into three regions: foregut, midgut and hindgut. To date, no proteins involved in blood digestion have been identified in the stomach (foregut) of these organisms. In this work, using a proteomic approach, we identified a group of proteins that showed differential expression pattern in *Meccus pallidipennis* stomach, at increasing times after blood feeding, suggesting the presence of a biochemical machinery required during haematophagy. Stomachs from *M. pallidipennis* males were dissected at 4 different times after bloodfeeding (7, 15, 50 and 70 days). Total proteins were separated by SDS-PAGE on 10 % gels. We found a total of 15 differentially expressed bands in the different times. Two major bands (one of ~180 and other one of ~100 kDa) were selected from day 15 after-fed lane and analyzed by MALDI-TOF. Peptides identified from the band of ~180 kDa did not match to any known protein. For the ~100 kDa band, we identified paramyosin, a protein with motor activity involved in muscle contraction and relaxation, at this time can only be suggested on basis of its homology whit molecules identified in *Sarcoptes scabiei*, *Dermatophagoides farinae* and *Boophilus microplus*, organisms that have contact with the blood during its feeding.

Keys words: *Meccus pallidipennis*, stomach, proteomic analysis, paramyosin.

IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS EXPRESADAS DIFERENCIALMENTE POR LA HEMATOFAGIA EN EL ESTÓMAGO DE *Meccus pallidipennis*.

INTRODUCCIÓN

La subfamilia Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) está organizada en 6 tribus con 19 géneros (Santos *et. al.*, 2007), comprende insectos hematófagos capaces de transmitir *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas. Más del 50% de las especies de esta subfamilia se han infectado natural o experimentalmente con el parásito. En México existen al menos 34 especies de triatominos, dentro de las cuales al menos seis son consideradas dentro del complejo *Phyllosoma*, encontrándose ampliamente distribuidas en el territorio mexicano (Martínez-Ibarra *et. al.*, 2008). En general en México se piensa que la enfermedad de Chagas es poco común, debido a los pocos casos documentados, sin embargo es probable que al igual que otras enfermedades exista un subregistro por falta de un diagnóstico adecuado (Rodríguez, 2002).

Los triatominos presentan un desarrollo hemimetabólico o metamorfosis incompleta con fases de huevo, cinco estadios ninfales y adulto, caracterizado por ser lento y prolongado, pudiendo durar varios meses, influenciado por la temperatura, humedad del ambiente y por la disponibilidad de alimento. Todos los estadios ninfales y los adultos de ambos sexos son hematófagos estrictos. Solo la alimentación sanguínea en cada uno de los estadios ninfales, permite el paso a la siguiente fase (Nation, 2002). 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 (Schofield, 2000a). La saliva de los insectos hematófagos presenta sustancias anticoagulantes, antihistamínicas, vasodilatadoras y antiplaquetarias que facilitan el proceso de alimentación sobre el huésped vertebrado (Arévalo *et. al.*, 2007a), que en promedio tarda entre 10 y 20 minutos en alimentarse totalmente. 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 (Castillo y Wolf, 2000). Consecuentemente 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 generalmente solo son activas a pH ácido (Schofield, 2000a, Schofield, 2000b).

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, la cual es una estructura presente sobre la superficie de las células del epitelio intestinal de los insectos hematófagos (Silva *et. al.*, 2007). Esta recubre a las micro vellosidades y es especialmente evidente a los diez días después de haber ingerido alimento, teniendo como finalidad proveer la compartimentalización de los procesos enzimáticos en el microambiente intestinal (Albuquerque *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 Malpigi y posteriormente al recto, mientras que la sangre concentrada entra en pequeñas porciones en la región digestiva del intestino (Kollien y Billingsley, 2002). La digestión de la hemoglobina en el intestino de los Triatomas, genera grandes cantidades del grupo hemo, lo cual representa un serio cambio en el insecto, posterior a cada comida. Debido a que este grupo es una potente toxina que puede catalizar la formación de grupos reactivos del oxígeno (Silva *et. al.*, 2007), la digestión en estos es llevada a cabo por cisteína y aspartato peptidasas, enzimas proteolíticas que permiten digerir la sangre en el ambiente ácido en que se encuentra.

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. En este equipo las proteínas son absorbidas dentro de una matriz que al ser bombardeada con un láser, se ioniza y transfiere energía a los péptidos para su ionización. Aplicando una diferencia de potencial, los péptidos cargados vuelan hasta el detector y el tiempo de vuelo es proporcional a la masa del péptido. Con este método se obtiene un espectro de las masas de todos los péptidos resultantes del proceso de digestión triptica, lo cual permite la identificación de forma rápida y confiable de los péptidos presentes en la muestra analizada.

Hasta el momento no se han descrito proteínas que estén involucradas en el proceso de digestión de la sangre en el estómago de *Meccus pallidipennis*, que permitan identificar cuales moléculas son las que se expresan para el procesamiento del alimento ingerido, y de esta forma contribuir al conocimiento de la bioquímica del proceso. Por tal motivo, mediante estrategias proteómicas en este trabajo se identifican proteínas diferenciales que están implicadas en el procesamiento de la sangre ingerida, lo que amplía el conocimiento del proceso de la hematofagia, así como las posibles interacciones de este vector con su huésped. Estos aspectos pudieran ser implementados como estrategias para un control integrado del vector en relación a la inhibición del procesamiento de la sangre por parte del insecto.

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 40 machos adultos que se alimentaron con sangre de conejo durante 20 minutos al inicio del estudio, para posteriormente ser sacrificados a diferentes tiempos (7, 15, 50 y 70 días postalimentación), descartando los que no se alimentaron.

Disección del sistema digestivo de *Meccus pallidipennis*. La disección del sistema digestivo de esta especie se realizó de la siguiente manera: Se colocó a la chinche en una caja de Petri y se decapitó para su sacrificio, se agregaron 5 ml de PBS frío 1X pH 7.4 al cuerpo del insecto. Mediante el uso de pinzas entomológicas, bisturí y con ayuda del microscopio estereoscópico se sujetó al insecto y se separaron ambas alas, posteriormente se procedió a retirar la cutícula abdominal con el bisturí dejando descubierta 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: anterior, medio y posterior, desechándose los túbulos de Malpighi, posteriormente las diferentes secciones se colocaron en una caja de Petri y se añadió aproximadamente 5 mL de PBS frío 1X pH 7.4 para eliminar los restos de sangre. El estómago se colocó en 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) y con una solución de inhibidores de proteasas (IA, PMSF, TLCK, NEM) y se almacenaron a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ hasta su uso. Por otra parte, la sangre que fue extraída de cada sección, se guardó en el mismo volumen de PBS frío 1X pH 7.4 e inhibidores de proteasas a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ hasta su uso.

Extracción de proteínas totales de las secciones del sistema digestivo de *Meccus pallidipennis*. Para la extracción de proteínas totales los órganos se disectaron a los 7, 15, 50 y 70 días postalimentación como se describió, se

homogenizaron por 5 min en un tubo Eppendorf con su pistilo de plástico. El extracto se centrifugó a 10,000 rpm por 10 min a 4 °C en una microcentrífuga marca Eppendorf y el sobrenadante se colocó en un tubo limpio para microcentrífuga, para posteriormente analizarlo por geles PAGE-SDS al 10%.

Cuantificación de proteínas. Las proteínas se cuantificaron utilizando el método de Bradford (Bradford, 1976), se utilizó un biofotómetro marca Eppendorf.

Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE-SDS). 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 (Laemmli UK, 1970) al 10 %. Para las proteínas de cada una de las secciones se colocó aproximadamente 0.04 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).

Identificación de proteínas mediante espectrometría de masas (MS). Para la identificación de las proteínas de interés resueltas por PAGE-SDS, se eligieron bandas que al ser teñidas con azul de Coomassie mostraron una mayor concentración y una expresión diferencial. Las bandas se cortaron con una navaja estéril, portando guantes para evitar contaminación, y se colocaron en un tubo para microcentrífuga de 1.5 ml, se etiquetaron y almacenaron a -20 °C. Las bandas se enviaron para su identificación por MALDI-TOF al Departamento de Biotecnología y Bioquímica del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN, Unidad Irapuato.

Análisis de resultados. El coeficiente carga/masa (m/z) obtenido por MALDI-TOF se analizó en bases de datos accesibles en los sitios del National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), San Diego Super Computer (SDSC) Biology Workbench (<http://workbench.sdsc.edu/>) y Expasy Proteomics Server (<http://www.expasy.org/>). Los espectros obtenidos por MALDI-TOF fueron analizados utilizando el programa Peakerazor (<http://www.protein.sdu.dk/gpmaw/Help/PeakErazor/peakerazor.html>), con la finalidad de localizar los péptidos a analizar, así como contaminaciones. Las proteínas identificadas se analizaron mediante el programa computacional MASCOT (<http://www.matrixscience.com/>).

RESULTADOS.

Estómagos de chinches macho de la especie *Meccus pallidipennis* alimentados con sangre. La alimentación con sangre de conejo indujo cambios en el tamaño del estómago de la chinche, donde se observó su incremento durante los días 7 y 15 días postalimentación, debido al almacenamiento de la sangre ingerida, así también como retorna a su tamaño normal entre los 50 y 70 días postalimentación, indicando que en estos tiempos ya no hay sangre almacenada que deba ser digerida. (figura1).

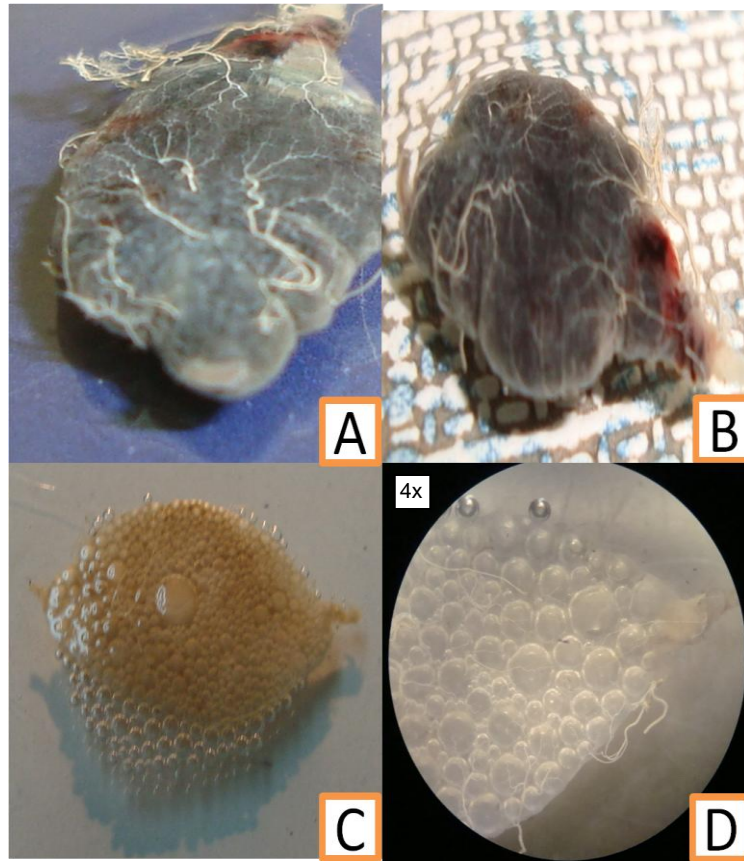


Figura 1.- Estómagos de chinches macho de la especie *Meccus pallidipennis* alimentados con sangre a 4 diferentes días postalimentación. A: a los 7 días. B: a los 15 días. C: a los 50 días. D: a los 70 días (4x).

Análisis comparativo de las proteínas totales inducidas por la hematofagia en los estómagos de *Meccus pallidipennis*. 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 (figura 2).

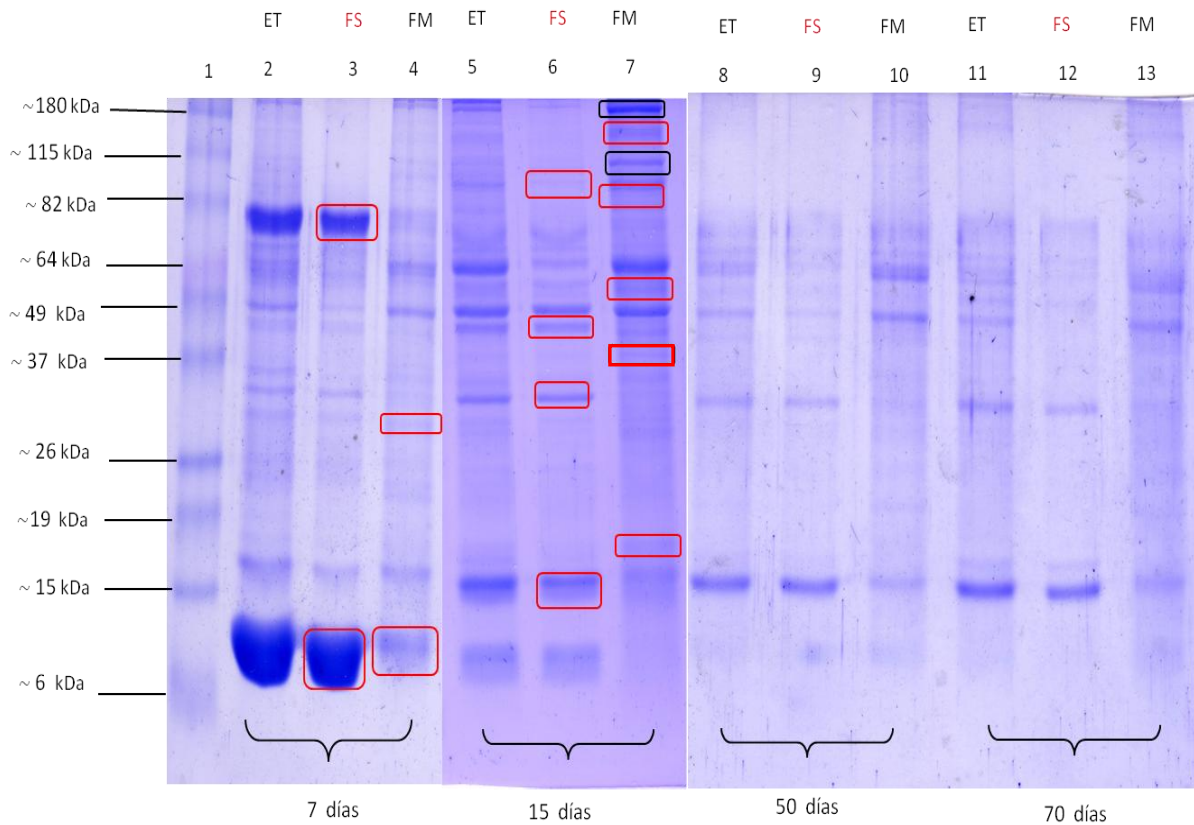


Figura 2.- Proteínas totales de los estómagos de *Meccus pallidipennis*. Se obtuvieron las proteínas totales de los estómagos a distintos tiempos postalimentación (7, 15, 50 y 70 días) con sangre de conejo y fueron analizadas en geles de SDS-PAGE al 10% y teñidas con Azul de Coomassie. Carril 1.- Marcadores de peso molecular. Carriles 2, 5, 8 y 11.- Extracto total de los estómagos a distintos tiempos postalimentación (ET). Carriles 3, 6, 9 y 12.- Fracción soluble (FS). Carriles 4, 7, 10 y 13.- Fracción membranosa (FM). Se señalan con un rectángulo rojo las bandas que modifican su expresión en los diferentes tiempos postalimentación. Carril 7.- Se encuentran marcadas con un rectángulo negro las bandas que fueron seleccionadas para su identificación por MALDI-TOF.

Identificación de proteínas que modifican su expresión en los estómagos de *Meccus pallidipennis* durante la hematofagia. Uno de los objetivos del trabajo fue observar e identificar mediante herramientas proteómicas, proteínas en el estómago de *Meccus pallidipennis* que modificaran su expresión, inducidas por la alimentación con sangre, se encontraron 15 bandas que cumplieron con este criterio, de las cuales 6 correspondieron a la fracción soluble: teniendo los siguientes pesos moleculares: 90, 70, 40, 32, 15 y 8 kDa, mientras que 9 pertenecieron a la fracción membranal: con los pesos moleculares de 180, 115, 100, 86, 50, 37, 28, 17 y 8 kDa. De las cuales se seleccionaron 2 bandas; las de 180 y 100 kDa para su identificación por MALDI-TOF (figura 2).

Espectros de las bandas de 180 y 100 kDa obtenidos por MALDI-TOF. El espectro obtenido en la proteína de 180 kDa presenta un patrón de 28 péptidos, de los cuales 12 corresponden a péptidos que no se identificaron en ninguna de las bases de datos analizadas, mientras que el resto pertenece a queratinas y tripsina (figura 3). 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, mientras que 6 péptidos no alinearon con ninguna proteína conocida, el resto pertenece a queratinas y tripsina (figura 4).

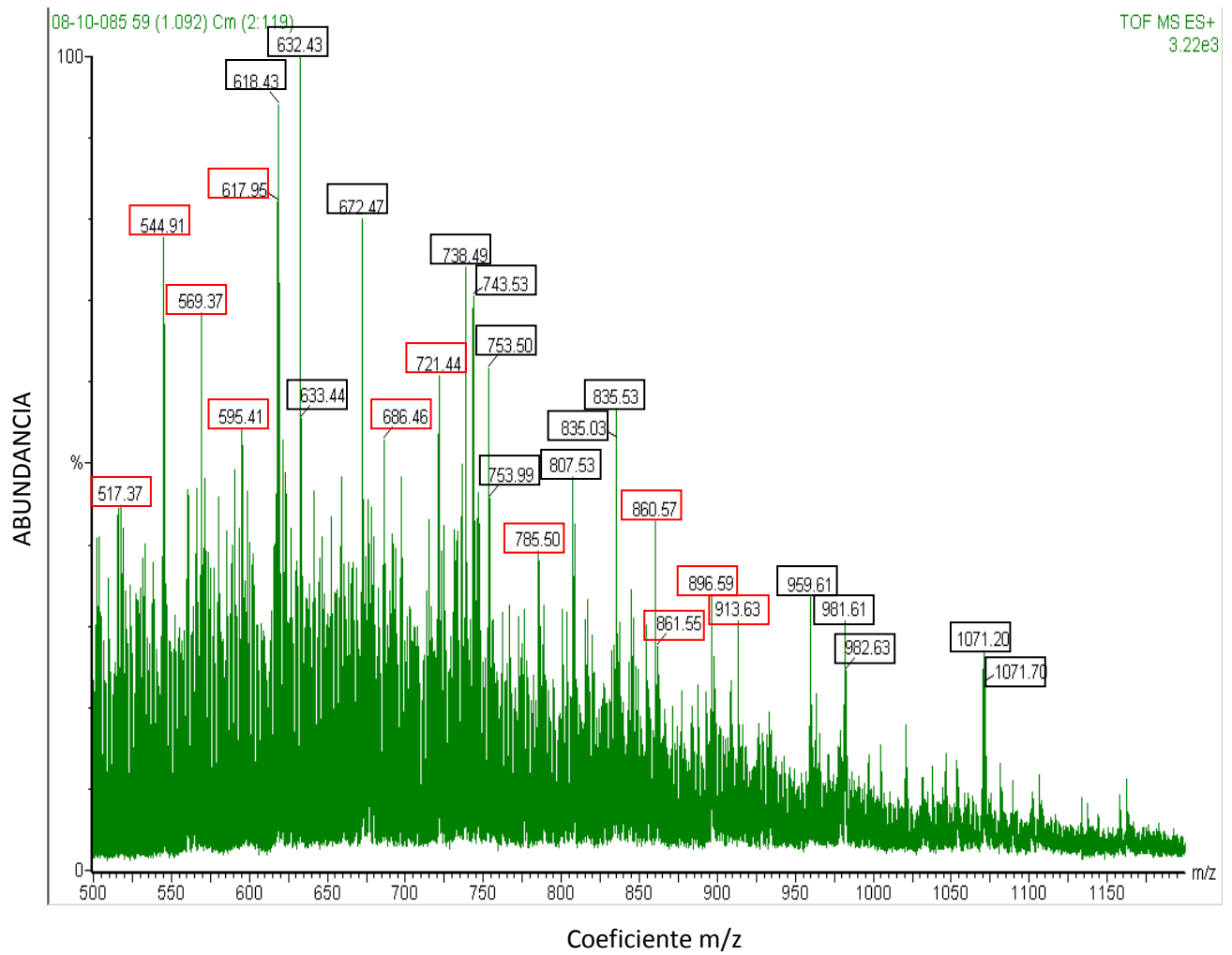


Figura 3.- Espectro obtenido por MALDI-TOF en la banda de 180 kDa. Encerrados en un rectángulo rojo se muestran los coeficientes carga masa de los péptidos que no alinearon con ninguna proteína conocida en las bases de datos. Encerrados en un rectángulo negro se muestran los péptidos que corresponden a queratinas y tripsina.

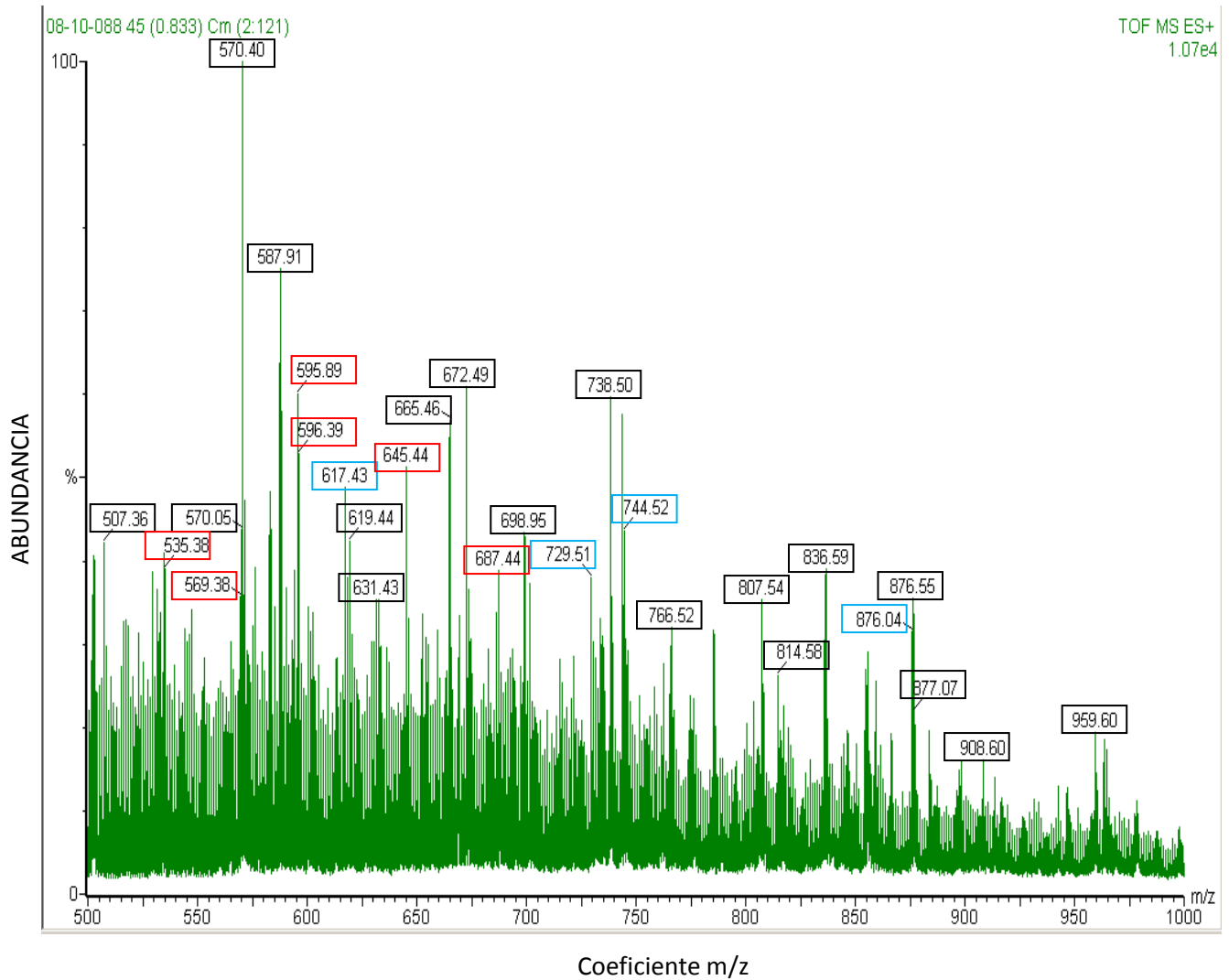


Figura 4.- Espectro obtenido por MALDI-TOF de la banda de 100 kDa. Encerrados en un rectángulo rojo se muestran los coeficientes carga masa de los péptidos que no alinearon con ninguna proteína conocida en las bases de datos. Encerrados en un rectángulo azul los péptidos que alinearon con proteínas conocidas en las bases de datos, identificando a una proteína de la familia de las paramiosinas. Encerrados en un rectángulo negro se muestran los péptidos que corresponden a queratinas y tripsina.

De las dos bandas seleccionadas únicamente en la correspondiente a 100 kDa fue posible identificar péptidos relacionados a una proteína perteneciente a 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 (tabla 1).

Tabla 1.- Identificación por MALDI-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 Filamentos gruesos	Actividad motora Miosina Contracción/relajación muscular.
Paramiosina¹	81,372	62	165	<i>Dermatophagoides farinae</i>	Citoplasma Filamentos gruesos	Actividad motora Miosina Contracción/relajación muscular.
Paramiosina¹	101.992	75	143	<i>Boophilus microplus</i>	Citoplasma Filamentos gruesos	Actividad motora Miosina Contracción/relajación muscular.

* PM.- peso molecular en kilodaltones (kDa).

´ Cobertura.- Porcentaje de aminoácidos presentes en los péptidos identificados por MALDI-TOF/MS que se relacionan con las proteínas de la base de datos.

^ Mowse score.- Coeficiente calculado a partir de los residuos idénticos (>80 se considera idéntico).

© Localización.- Localización de la proteína en otros organismos.

¹ Datos tomados de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein> con número de registro: AAK01181.1, Q967Z0 y Q86RN8.1

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En el trabajo realizado por Silva, *et. al.*, en 2007 en el que analizan la formación de la membrana perimicrovellosa, por medio de la actividad de la α -glucosidasa acoplada a membranas, a diferentes días después de la ingesta de sangre, encontraron que el ciclo digestivo en estos insectos comprendía aproximadamente 21 días, tiempo en el cual degradaban toda la sangre ingerida. Con base a sus hallazgos se planteó analizar la expresión de proteínas a los días 7 y 15 postalimentación que correspondieron a los días de mayor expresión de proteínas involucradas en la digestión de la sangre, debido a la gran cantidad de alimento que se tendría que procesar en el estómago de los insectos (figuras 1 A y B), mientras que a los días 50 y 70 postalimentación, el patrón de expresión de proteínas fue modificado debido a que en estos tiempos no se encuentra alimento que deba ser digerido, como se confirmó al observar la morfología de los estómagos en animales disectados (figuras 1 C y D).

La sangre que ingieren estos insectos, generalmente se compone de una mezcla de plasma (55 %) y células sanguíneas (45 %), las células de los mamíferos normalmente tienen un citoplasma rico en K^+ , mientras que el plasma tiene una alta concentración de cloruro de sodio, de tal forma que cuando estos insectos se alimentan, están ingiriendo un fluido que contiene células sanguíneas suspendidas en un plasma rico en sodio, que es hipoosmótico en comparación con su hemolinfa (Martini *et. al.*, 2007). Además generalmente es deficiente de ciertas vitaminas, particularmente folato y vitaminas-B, así que todos los hematófagos obligados requieren de simbiosis para ayudarles en la producción de estos compuestos. Normalmente estos simbiosis se encuentran intracelularmente o en un órgano especial conocido como micetoma, pero en los Triatomas estos simbiosis se encuentran libres en el lumen del intestino. Una vez que los triatomas han ingerido alimento, la sangre permanece sin digerir en el estómago, la parte anterior del intestino. Durante la ingesta se liberan hormonas diuréticas y el agua e iones son transportados a través de la membrana del estómago y la hemolinfa hacia los túbulos de Malpigi y de ahí al recto, la sangre concentrada entra en pequeñas porciones en

la región digestiva del intestino (Kollien y Billingsley, 2002). Esto es lo que se ha reportado que ocurre en el estomago de los triatomas, al que únicamente se le considera como un simple recipiente 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 (figura 2) indicando que este órgano juega un papel activo muy diferente al que se tenía pensado. En un experimento adicional de análisis del contenido estomacal en los diferentes tiempos postalimentación se encontró que existe actividad enzimática involucrada en la digestión de los componentes sanguíneos (Anexo 1).

De la expresión diferencial de las 15 bandas identificadas y encerradas en un rectángulo (figura 2), 6 correspondieron a la fracción soluble y 9 a la fracción membranal, sugiriendo fuertemente que en estas se encuentran por lo menos 15 proteínas que se están expresando únicamente cuando el estómago contiene sangre que debe ser procesada (a los días 7 y 15 postalimentación), debido a que no se encuentran cuando el estómago ya no contiene alimento (figura 1 C y D), como se observa en los carriles 9, 10, 12 y 13 que corresponden a los tiempos de 50 y 70 días postalimentación. Además en el presente trabajo se indagó si existía una expresión diferencial en relación al sexo, encontrando que hay un patrón diferencial en los días 50 y 70 postalimentación en el caso de las hembras en comparación con los machos (Anexo 2).

En trabajos relacionados con la búsqueda de proteínas que presentan expresión diferencial inducida por la ingesta de sangre en insectos hematófagos (Garibay *et. al.* 2009) utilizaron la estrategia de seleccionar las bandas expresadas en forma diferencial al alimentar mosquitos (*Aedes aegypti*), con dos diferentes fuentes de alimento y posteriormente seleccionaron aquellas bandas incrementadas en su expresión, para ser identificadas mediante MALDI-TOF, que es una determinación basada en la especificidad de la tripsina para generar cortes precisos en las proteínas, generando péptidos específicos para cada proteína de forma reproducible y por lo tanto cada proteína tiene una huella de péptidos trípticos única. Los

espectros de masas obtenidos se usan para contrastar con bases de datos con los algoritmos adecuados para identificar las proteínas que corresponden (Siusdak, 2003). Una vez identificadas las bandas que presentaron expresión diferencial se seleccionaron 2 de ellas: de aproximadamente 180 y 100 kDa, pertenecientes a la fracción membranal (figura 2, carril 7) del día 15 postalimentación, las cuales fueron identificadas por MALDI-TOF. Estas bandas fueron seleccionadas con el propósito de identificar proteínas membranales que participen en el proceso de digestión y contribuyan al entendimiento de su bioquímica.

En la banda de aproximadamente 180 kDa (figura 3) se observa la presencia de 28 péptidos, dentro de los cuales 12 pertenecen a una o varias proteínas que no se lograron identificar en ninguna de las bases de datos analizadas, indicando que se trata de una o varias proteínas desconocidas, que necesitan ser secuenciadas “*de novo*” para lograr su identificación y posteriormente realizar su incorporación a la base de datos correspondiente. Mientras que en el espectro resultante de la banda de aproximadamente de 100 kDa presenta de igual manera la presencia de 28 péptidos, dentro de los cuales 4 (figura 4, rectángulos azules) alinearon con proteínas reportadas en las bases de datos analizadas, dando como resultado la identificación de una proteína que pertenece a la familia de las paramiosinas. Mientras que 6 (figura 4, rectángulos rojos) no se identificaron, lo cual indica que puede tratarse de péptidos que pertenecen a la paramiosina pero que se encuentran en una sección que no es homóloga o bien que se trata de una o varias proteínas no reportadas hasta el momento, por lo que se necesitaría de igual forma realizar una análisis de secuenciación “*de novo*” para su plena identificación.

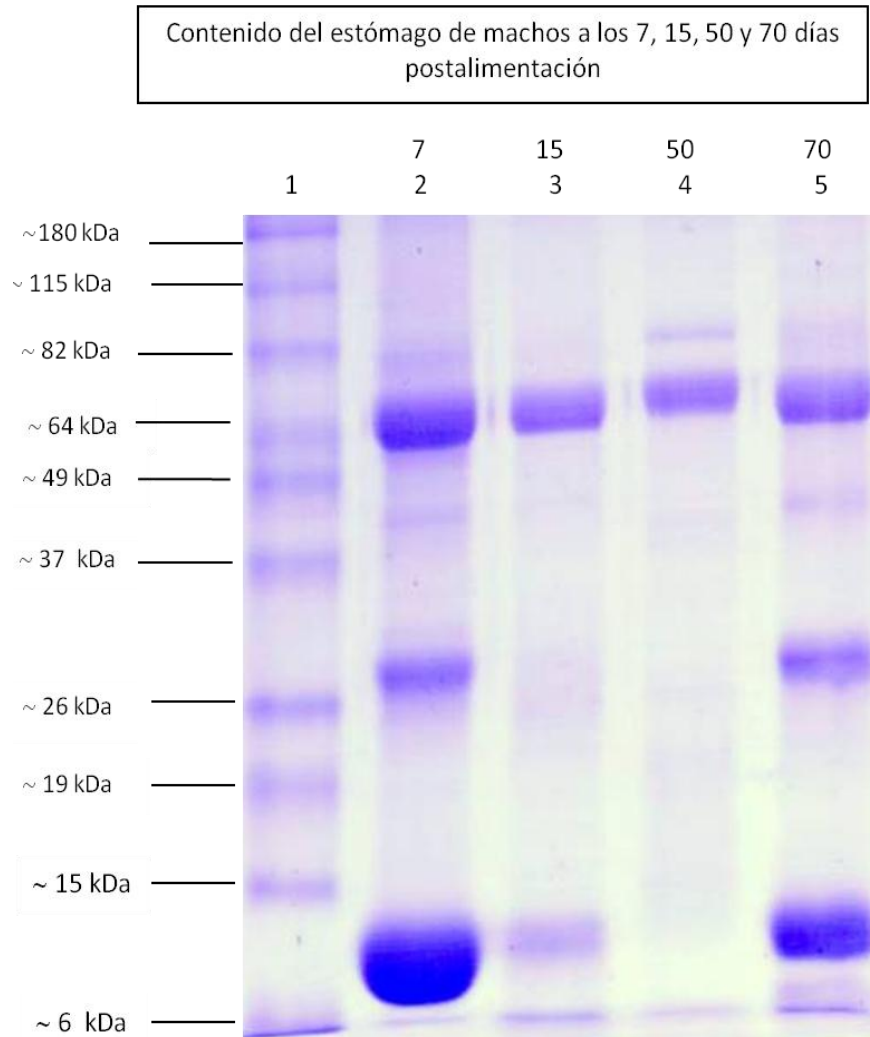
En este trabajo se reporta por primera vez, en *Meccus pallidepennis*, una proteína que pertenece a la familia de las paramiosinas (tabla 1), proteínas filamentosas presentes en el músculo de los invertebrados, con una estructura secundaria de α -hélice superenrollada que forma homodímeros. Es una proteína 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, por lo que se trata de una proteína nueva que deberá ser reportada a las bases de datos de este organismo, ya que hasta el momento no se han reportado trabajos que describan la expresión de proteínas relacionadas con la hematofagia en este organismo. Sin embargo, Kollien y Billingsley, 2002, encontraron diferentes mRNAs, asociados con la ingesta de alimento en el intestino de *T. infestan*. De las 14 secuencias identificadas, únicamente la secuencia de 265 pb es homóloga a una enzima digestiva, una aminopeptidasa. Las demás secuencias se relacionan principalmente con proteínas del metabolismo celular. Las secuencias de 431 y 696 pb son proteínas mitocondriales, la secuencia de 619 pb muestra homología con una proteína del complejo de Golgi. La secuencia de 571 pb se relaciona con la proteína CAD, que es una proteína de fusión que presenta cuatro actividades enzimáticas de la vía de las pirimidinas, Las secuencias de 426, 531, 572, 636 y 696 son homólogos de enzimas parecidas a la transcriptasa reversa, deshidrogenasa, sintetasa o reductasa respectivamente. La secuencia de 664 pb se relaciona con la proteína Vigelin (que es una proteína de unión a HDL), la cual participa en el metabolismo celular de los esteroides. La secuencia de 1009 pb muestra similitud con el factor de crecimiento epidermal (EGF), el cual se expresa en todos los tejidos y puede unirse a múltiples blancos celulares. La secuencia de 1078 pb es una proteína que forma parte del hemidesmosoma.

En conclusión, en el presente trabajo se muestra información que apoya la idea de que el estómago de *Meccus pallidipennis* juega un papel importante en la digestión de la sangre ingerida y no es únicamente un sitio de almacenamiento como ha sido reportado (Kollien y Billingsley, 2002). Se observó un patrón de 15 bandas con una expresión diferencial respecto al tiempo postalimentación que representan proteínas que se están expresando con la finalidad de participar en la digestión de la sangre y que en su momento deberán ser identificadas. Se identificó una proteína no reportada en este organismo, la paramiosina, proteína cuyas funciones en este momento solo pueden sugerirse, con base a la homología que existe entre esta molécula identificada con las de *Sarcoptes scabiei*, *Dermatophagoides farinae* y

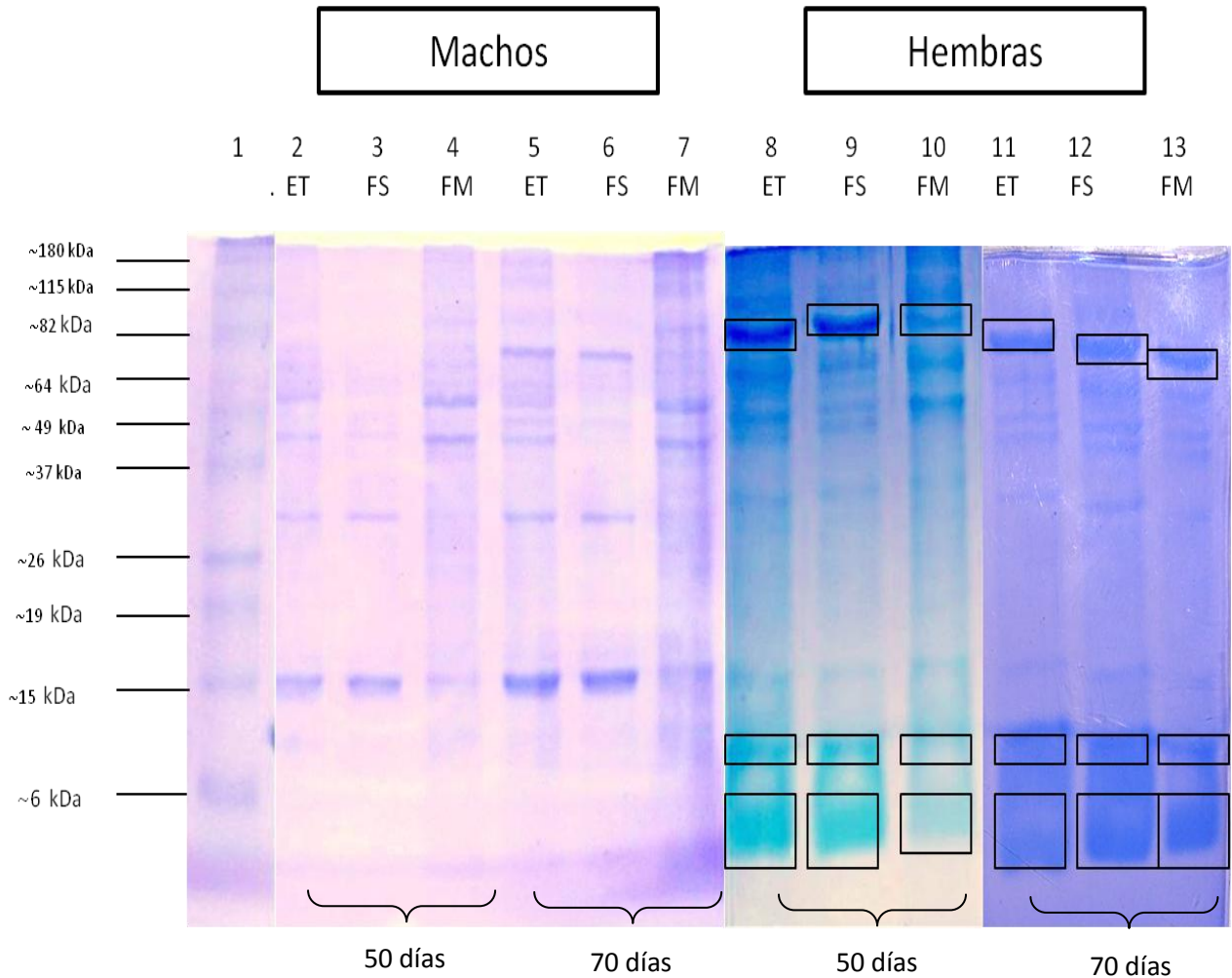
Boophilus microplus. Agregando que en los espectros analizados se encuentra información que puede conducir en un futuro a identificar nuevas proteínas que no están reportadas hasta este momento en ningún organismo.

ANEXO 1



Anexo 1.- Gel SDS-PAGE al 10 % del contenido estomacal de insectos machos en diferentes días postalimentación. Carril 1: marcador de peso molecular. Carril 2: contenido estomacal a los 7 días postalimentación. Carril 3: a los 15 días. Carril 4: a los 50 días. Carril 5: a los 70 días. Es notoria la ausencia de bandas que deberían corresponder a proteínas plasmáticas como es el caso de la albumina (~70 kDa) principal proteína del plasma sanguíneo, lo cual sugiere que fueron parcial o totalmente degradadas por enzimas secretadas hacia el lumen. Por otro lado se observa la presencia de bandas que pudieran corresponder a las enzimas secretadas, reforzando la conclusión de que el estómago juega un papel activo en la digestión.

ANEXO 2



Anexo 2.- Proteínas totales de los estómagos de machos y hembras de *Meccus pallidipennis*. Se obtuvieron las proteínas totales de los estómagos a distintos tiempos postalimentación (50 y 70 días) con sangre de conejo y fueron analizados en geles de SDS-PAGE al 10% y teñidos con Azul de Coomassie. Carril 1.- Marcadores de peso molecular. Carriles 2 y 5: Extracto total de los estómagos de machos a distintos tiempos postalimentación (ET). Carriles 8 y 11: ET de hembras a los 50 y 70 días. Carriles 3 y 6: Fracción soluble de los estómagos de machos a distintos tiempos postalimentación (FS). Carriles 9 y 12: FS de hembras a los 50 y 70 días. Carriles 4 y 7: Fracción membranal de los estómagos de machos a distintos tiempos postalimentación (FM). Carriles 10 y 13: FM de hembras a los 50 y 70 días. Se señalan con rectángulo negro las bandas con una expresión diferencial en relación al sexo de estos insectos.

REFERENCIAS

ALBUQUERQUE-CUNHA, J.M., *et. al.*, (2009) *Cytochemical characterization of microvillar and perimicrovillar membranes in the posterior midgut epithelium of Rhodnius prolixus*. *Arthropod Struct Dev*, 38(1): 31-44.

ARÉVALO A, CARRANZA J-C, GUHL F, CLAVIJO J-A, VALLEJO G-A. (2007). Patrones electroforéticos de hemoproteínas salivares (Nitroforinas) de *Rhodnius colombiensis* y *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Biomédica*;27 (supl.1):137-142.

ARÉVALO A, CARRANZA J-C, GUHL F, CLAVIJO J-A, VALLEJO G-A. (2007). Comparación de los patrones de alimentación y defecación de *Rhodnius colombiensis* y *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) en condiciones de laboratorio. *Biomédica*;27: 101-9.

BAPTISTA-GONZÁLEZ H, SANTAMARÍA-HERNÁNDEZ C, CEDILLO-VALLE F, BORDES-AZNAR J. (2004). Detección de anticuerpos séricos contra *Trypanosoma cruzi* en donadores de sangre. *Médica Sur*; 11:169-174.

BELTRÁN M, BERMÚDEZ MI, FORERO MC, AYALA M, RODRÍGUEZ MJ. (2005). Control de la infección por *Trypanosoma cruzi* en donantes de sangre de Colombia. *Rev Bioméd*; 25:527-32.

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.

CASTILLO D, WOLFF M. (2000). Aspectos del comportamiento de los triatominos (Hemiptera: Reduviidae), vectores de la enfermedad de Chagas. *Rev Bioméd*; 20: 59-64.

DONINI A, O'DONNELL M-J, ORCHARD I.(2007). Differential actions of diuretic factors on the Malpighian tubules of *Rhodnius prolixus*. *The Journal of Experimental Biology*; 211, 42-48.

GARIBAY GARCÍA, J. A. *et. al.* (2009). Análisis proteómico del intestino del mosquito *Aedes aegypti* durante la hematofagia.

HERNÁNDEZ GONZÁLEZ Y, GONZÁLEZ BROCHE R. (2006). Revisión de la subfamilia Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) en Cuba. Vol. XLVI, N° 2, Boletín de malariología y salud ambiental.

KALUME DE, OKULATE M, ZHONG J, REDDY R, SURESH S, DESHPANDE N. (2005). A proteomic analysis of salivary glands of female *Anopheles gambiae* mosquito. *Proteomics* 5:3765-3777.

KOLLIEN, A.H. AND P.F. BILLINGSLEY. (2002). Differential display of mRNAs associated with blood feeding in the midgut of the bloodsucking bug, *Triatoma infestans*. *Parasitol Res*, 88(12): 1026-33.

LAEMMLI UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227 (5259): 680-685.

MANCIPAR I, ROODVELDT C, CORRADI G, CABEZA M, BRITO M, WINTER L, ET AL. SILBER A. (2005). Use of Full-Length Recombinant Calflagin and Its C Fragment for Improvement of Diagnosis of *Trypanosoma cruzi* Infection. J Clin Microbiol; 43: 5498–5503.

MARTÍNEZ-IBARRA, J. A., VENTURA-RODRÍGUEZ L.V., MEILLON-ISAIS K., BARAJAS-MARTÍNEZ H., ALEJANDRE-AGUILAR R., LUPERCIO-CORONEL P., *et. al.* (2008) Biological and genetic aspects of experimental hybrids from species of the Phyllosoma complex (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 103(3): 236-243.

MARTINI, S.V., S.B. NASCIMENTO, AND M.M. MORALES, (2007). Rhodnius prolixus Malpighian tubules and control of diuresis by neurohormones. An Acad Bras Cienc, 79(1): 87-95.

NATION, J. L. (2002). Insect Physiology and Biochemistry. CRC PRESS. Washington . p.p. 27-65).

OBARA, M.T., et al., (2007). A study of the scutellum in eight Chagas disease vector species from genus Triatoma (Hemiptera, Reduviidae) using optical and scanning electron microscopy. Mem Inst Oswaldo Cruz, 102(4): 463-8.

RAMÍREZ CRUZ A, NOGUEDA TORRES B, AGUILAR RA, MARTÍNEZ MORALES I. (2005) Madurez ovérica y proteínas del vitelio en hembras de Triatoma Barberi Usinger, 1939 (Hemiptera: Reduviidae, Triatominae) infectadas experimentalmente con T. cruzi (Chagas, 1909). Acta Zoologica Mexicana 21(2): 101-107.

RAMOS-LIGONIO A, RAMÍREZ-SÁNCHEZ ME, GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ JC, ROSALES-ENCINA JL, LÓPEZ-MONTEON A. (2006) Prevalencia de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en donadores de sangre del IMSS, Orizaba, Veracruz, México. Salud Pública Méx; 48:13-21.

RODRIGUEZ DOMÍNGUEZ J. (2002). Las enfermedades Transmitidas por vector en México. Rev. Fac. Med. UNAM. 45: 126-141.

SANTOS, A., et. al., (2007). The sialotranscriptome of the blood-sucking bug Triatoma brasiliensis (Hemiptera, Triatominae). Insect Biochem Mol Biol, 2007. 37(7): p. 702-12.

SCHOFIELD CJ. (2000). *Trypanosoma cruzi* the vector-parasite paradox. mem inst oswaldo cruz, rio de Janeiro, 2000; Vol. 95(4): 535-544.

SCHOFIELD, C.J., (2000). Biosystematics and evolution of the Triatominae. Cad Saude Publica, 2000. 16 Suppl 2:89-92.

SILVA, J.R., et al., (2007). Perimicrovillar membranes promote hemozoin formation into Rhodnius prolixus midgut. Insect Biochem Mol Biol, 37(6): 523-31.

SIUSDAK, G., (2003) Mass spectrometry in biotechnology, MCC Press.