

IDENTIFICACIÓN DE DOS DEFENSINAS EN EL GENOMA DE *Triatoma (Meccus) pallidipennis* (HEMÍPTERA: REDUVIIDAE) Y UNA LISOZIMA EN SU HEMOLINFA

Paulina Díaz-Garrido✉, Esteban Santacruz-Martínez, Ignacio Martínez-Martínez, Patricia de la Torre, Juan Pedro-Laclette y Bertha Espinoza-Gutiérrez

¹Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Avenida Universidad 3000, Delegación Coyoacán, C. P. 04510, Ciudad de México.

✉Autor de correspondencia: di_paulina@yahoo.com

RESUMEN. Las defensinas y lisozimas son moléculas pertenecientes al sistema inmune de los insectos. Trabajos previos, identificaron isoformas de éstas moléculas en triatomíneos sudamericanos. El objetivo de este trabajo fue demostrar por primera vez, la presencia de *defensina 3* y *defensina 4* en el DNA genómico y mRNA, así como una lisozima tipo “c” en la hemolinfa de una especie endémica y de importancia epidemiológica en México: *Triatoma (Meccus) pallidipennis*.

Palabras clave: Enfermedad de chagas, *Triatoma pallidipennis*, defensinas, lisozimas, péptidos antimicrobianos.

Didentification of two defensins in genome *Triatoma (Meccus) pallidipennis* (Hemiptera: Reduviidae) and one lisozima in your hemolymph

ABSTRACT. Defensins and lysozymes are molecules of insect immune system. Previous works have identified isoforms of these molecules in sudamerican triatomines. The target of the present work was demonstrate the presence of *defensin 3* and *defensin 4* in genomic DNA and mRNA, also we characterize a protein with lysozyme activity in the hemolymph of *Triatoma (Meccus) pallidipennis* a Mexican endemic species of epidemiological importance.

Keywords: Chagas disease, *Triatoma pallidipennis*, defensins, lysozymes, antimicrobial peptides.

INTRODUCCIÓN

La Enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana es una parasitosis causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). El parásito tiene diferentes vías de transmisión sin embargo la principal es la vía vectorial, la cual es ocasionada por insectos pertenecientes a la subfamilia Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). Se estima que de seis a siete millones de personas se encuentran infectadas a nivel mundial, principalmente en el continente Americano. En México se reportan 1.1 millones de personas infectadas, de acuerdo a información de la OMS (WHO, 2015), sin embargo hasta el día de hoy no se cuenta con una cifra oficial en el país.

En México, se han reportado alrededor de 33 especies de insectos pertenecientes a la subfamilia Triatominae, de las cuales 28 son endémicas y 23 han sido reportadas por estar infectadas de manera natural con *T. cruzi* (Martínez *et al.*, 2006). Las especies del género *Triatoma* se agrupan en nueve complejos, uno de ellos es el complejo *Phyllosoma*, el cual es el más distribuido en México (Martínez *et al.*, 2006; Espinoza *et al.*, 2013). *Triatoma (Meccus) pallidipennis* (*T. pallidipennis*) es una especie endémica del país con importancia epidemiológica, debido al alto índice de infección con *T. cruzi* el cual ha sido reportado en algunos estados como Michoacán (con arriba del 50 % de infección natural) (Martínez-Ibarra *et al.*, 2011), aunado a su amplia distribución, ya que se ha reportado en 13 estados de la república (Martínez-Hernández *et al.*, 2010).

La respuesta inmune de los insectos vectores tiene un papel determinante en el establecimiento del parásito. En el caso particular de *T. cruzi*, éste únicamente se aloja a lo largo del tracto digestivo no generando daño dentro del vector. Existen estudios donde la presencia del parásito en el insecto da como resultado la producción de diferentes moléculas del sistema inmune, lo cual sugiere que el insecto pudiera estar modulando la población del parásito en él para no hacerle daño (Vieira *et al.*, 2016).

En insectos, la respuesta inmune se divide en: la respuesta inmune de tipo humoral y la de tipo celular; las cuales son activadas por proteínas de reconocimiento a patógenos. La respuesta celular se lleva a cabo por los hemocitos (células del sistema circulatorio o hemolinfa) y sus mecanismos de acción consisten en la nodulación, fagocitosis y la encapsulación de agentes patógenos (Lavine y Strand, 2002). La respuesta humoral incluye la producción de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO's) y Nitrógeno, cascadas enzimáticas que regulan la coagulación y melanización de la hemolinfa y la síntesis de Péptidos Antimicrobianos (PAM's) y lisozimas (Tsakas and Marmaras, 2010).

Las defensinas son péptidos antimicrobianos, catiónicos, poseen 6 cisteínas lo cual da como resultado la formación de 3 puentes disulfuro, el apareamiento entre las cisteínas es único en defensinas de insectos Cys¹-Cys⁴, Cys²-Cys⁵ y Cys³-Cys⁶, la masa molecular de estas moléculas es de aproximadamente 4 kDa y típicamente constan de entre 33-46 residuos de aminoácidos en su forma madura (Araujo *et al.*, 2009). El principal mecanismo de acción es la generación de poros en la membrana citoplasmática de bacterias Gram (+), bacterias Gram (-) y algunos hongos filamentosos (Hetru *et al.*, 1988) dando como resultado una lisis celular. Se han identificado isoformas de estas moléculas en *T. brasiliensis*, *T. infestans* y *T. sherlocky*. (Araujo *et al.*, 2006; Araujo *et al.*, 2015). Las lisozimas son enzimas con actividad de hidrolasas, que en insectos han sido reportadas por tener una actividad digestiva, sin embargo, también son moléculas que participan en la respuesta inmune de los insectos. Actualmente la información sobre la relación vector-parasito en la Enfermedad de Chagas está confinada a especies sudamericanas, principalmente a *Rhodnius prolixus* (especie sudamericana que no se encuentra en México), por ello el interés de estudiar una especie endémica del país. Este trabajo tuvo como objetivo principal identificar y caracterizar moléculas del sistema inmune de *T. pallidipennis*.

MATERIALES Y MÉTODO

Material Biológico. Los ejemplares utilizados para este trabajo fueron proporcionados por el laboratorio de Tripanosomiasis Americana perteneciente al Instituto de Investigaciones Biomédicas. Se utilizaron seis adultos machos de *T. pallidipennis*, tres para la extracción de ADN y los restantes para la extracción de ARN. Los insectos se mantuvieron a una temperatura de 25° - 28 °C en frascos de vidrio con tapas ventiladas y se dejaron en un periodo de inanición de 15 días después de que mudaron al quinto estadio.

Extracción de ADN, ARN y hemolinfa. Para la extracción de órganos, los insectos se inmovilizaron a -20 °C durante 10 minutos, una vez inmovilizados se realizó la extracción del tracto digestivo y cuerpo graso, el tracto digestivo se lavó con PBS para eliminar todo el contenido intestinal. La extracción de ADN se realizó por la técnica de Fenol: Cloroformo y la extracción de RNA se realizó por la técnica de TRIZOL[®] (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. La cuantificación de ácidos nucleicos se realizó en el Nanodrop[®] (ND 1000).

La extracción de la hemolinfa se realizó por medio de una punción entre el trocánter y la coxa. Se mantuvo a -20 °C hasta el momento de su uso.

Amplificación de genes. La amplificación de los genes se realizó con los juegos de oligonucleótidos reportados para *T. brasiliensis*: *defensina 3* (Fw-TATTCTTGGTGGCCGCCCTG,

Rv-CACTTCCTGCAGTGACAGAT) y *defensina 4* (Fw-ACACAGTTGAACTTGCTCCA, Rv-CACTTCCTGCAGTGACAGAT) (Arájú *et al.*, 2006 y Waniek *et al.*, 2009). Las condiciones para la amplificación de genes fue: 95 °C-5 min, 94 °C-1 min, Tm: 60 °C para *defensina 3* y 57° C para *defensina 4*, seguido de 72 °C-1 min, se realizaron 30 ciclos y finalmente 72 °C-10 min. Los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa 1 % en TBE.

Ensayos de actividad enzimática. Se realizaron zimogramas para identificar actividad de lisozimas en geles de poliacrilamida SDS/PAGE al 15 %, con 2 % de *Micrococcus lysodeikticus* como sustrato enzimático. Las muestras se pusieron en presencia de buffer de carga sin β-mercaptoetanol y se hirvieron por dos minutos (Audy *et al.*, 1989).

RESULTADOS

Para ambos juegos de oligonucleótidos se obtuvo una banda con un peso molecular de 400 pb para *def3* y *def4*. Para corroborar esto, se diseñaron oligonucleótidos para únicamente amplificar la región codificante del péptido maduro, ya que al ser proteínas de secreción, estas moléculas sufren un proceso de corte o maduración, el amplificado de la región del péptido maduro es de 160 pb en ambos casos (Fig. 1). Para los mensajeros, el peso molecular de las defensinas fue: 260 pb para *def3* y 330 pb para *def4*. Lo cual indica que el gen que codifica para éstos péptidos tiene al menos un intrón (Fig. 2). También se buscó la presencia de actividad de lisozimas en la hemolinfa de estos insectos por medio de zimogramas. Identificamos la presencia de estas enzimas en un peso molecular de 14.5 kDa (Fig. 3).

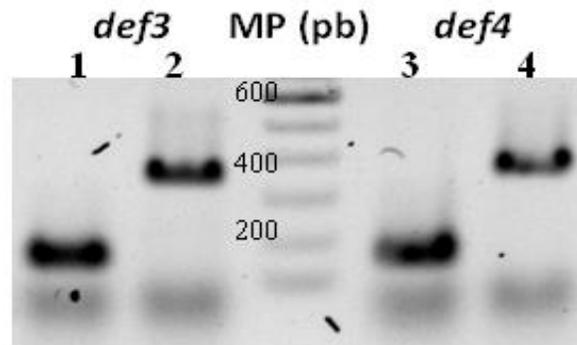


Figura 1. Amplificados de *def3* y *def4* a partir de DNA genómico de insectos post alimentación. En 1 y 3, amplificados de la secuencia codificante para el péptido maduro, 132 pb en ambos casos. En 2 y 4, amplificados del gen completo, se observa en ambos casos una banda de alrededor de 400 pb. Gel de agarosa 1 % en TBE.

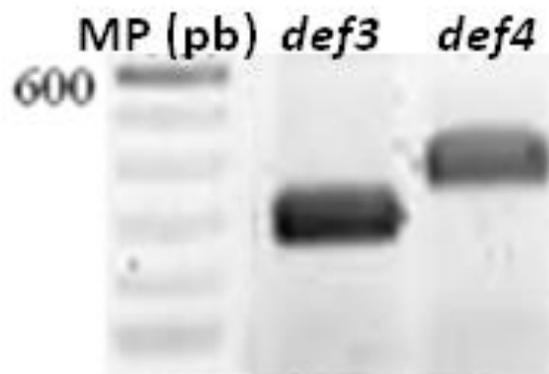


Figura 2. Amplificados de *def3* y *def4* a partir de cDNA post alimentación, *def3* tiene un peso molecular de 260 pb y *def4* 330 pb. Gel de agarosa 1% en TBE.

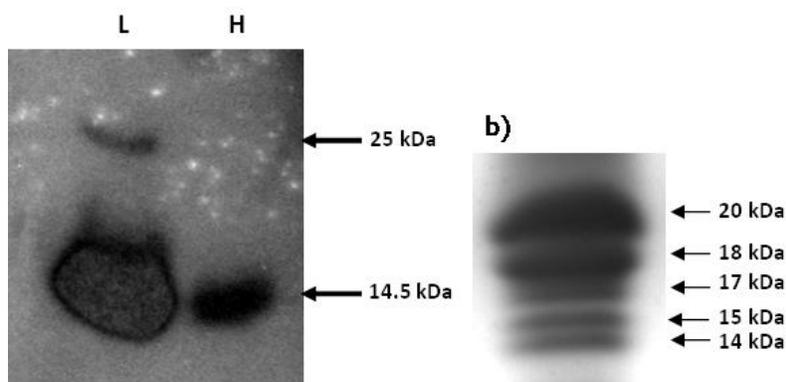


Figura 3. Actividad de lisozimas tipo “c” en hemolinfa de *T. pallidipennis*. a) Se observa la actividad de lisozimas en un peso de 14.5 kDa tanto en el carril control (L: lisozima comercial) como en la hemolinfa (H). Gel de acrilamida SDS/PAGE 15 % con 2 % de *M. lysodeikticus*. b) Perfil proteico de la hemolinfa en un rango de 20 a 14 kDa.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

Las defensinas son péptidos antimicrobianos ampliamente distribuidos en la naturaleza, ya que se han descrito desde plantas hasta insectos. En insectos se han reportado en endopterygotos (Díptera, Hymenoptera y Trycoptera) y en exopterygotos (Hemiptera y Odonata) (Bulet *et al.*, 1999). En este trabajo se reporta por primera vez la presencia de *def3* y *def4* en el genoma de *T. pallidipennis*, nuestros resultados indican que ambas defensinas poseen al menos un intrón en su secuencia, el cual no se encuentra dentro de la secuencia que codifica para el péptido maduro. El peso molecular del gen completo para ambas defensinas es de alrededor de 400 pb y el peso del péptido maduro es de 132 pb correspondiente a 44 residuos de aminoácidos. Los iniciadores para la amplificación de los genes se generaron a partir de las secuencias reportadas para *T. brasiliensis*, en esta especie los pesos reportados para el gen completo fue de 403 pb para *def3* y 358 pb para *def4* (Araujo *et al.*, 2009). Una vez que se tenga la secuencia de estas moléculas, se podrá conocer el índice de similitud entre ellas y será de gran interés estudiar los mecanismos de acción que pudieran tener *def3* y *def4*, para conocer más sobre la respuesta inmune que puede tener *T. pallidipennis* contra el parásito.

La hemolinfa es el principal almacén de agua de los insectos, la porción celular de la hemolinfa está compuesta por hemocitos, los cuales participan en la defensa contra patógenos de diferentes formas: fagocitosis, encapsulación de materiales foráneos y coagulación, pero también en procesos como el almacenamiento/distribución de nutrientes o la síntesis de proteínas. La parte restante de la composición de la hemolinfa consta de iones, plasma, moléculas y una gran cantidad de aminoácidos libres (Paskewitz y Christensen, 1996). Por primera vez se identifica y caracteriza la presencia de una lisozima tipo “c” en la hemolinfa de estos insectos con un peso molecular de 14.5 kDa, de la cual faltan estudios para conocer sus mecanismos de acción.

Agradecimientos

Al pasante de Biología Edgar Ruíz Quezada, por su apoyo en la disección de los insectos.

Literatura Citada

Araújo, C. A. C., Waniek, P. J., Stock, P., Mayer, C., Jensen, A. M. and G. A. Schaub. 2006. Sequence characterization and expression patterns of defensin and lysozymes encoding genes from the gut of the reduviid bug *Triatoma brasiliensis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 36: 547–560.

- Araújo, C. A., Lima, A. C., Jansen, A. M., Galvão, C., Jurberg, J., Costa, J., Azambuja, P. and P. J. Waniek. 2015. Genes encoding defensins of important Chagas disease vectors used for phylogenetic studies. *Parasitol Research*, 114: 4503–4511.
- Audy, P., Grenier, J. and A. Asselin. 1989. Lisozyme activity in animal extracts after sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 3: 523–527.
- Bulet, P., Hetru, C., Dimarcq, J. L. and D. Hoffman. 1999. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Developmental and Comparative Immunology*, 23: 329–344.
- Carcavallo, R. U., Jurberg, J., Lent, H., Noireau, F. F. and C. Galvão. 2000. Phylogeny of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). Proposals for taxonomic arrangements. *Entomología y Vectores*, 7(Supl. 1) 1–99.
- Espinoza, B., Martínez-Ibarra, J. A., Villalobos, G., De La Torre, P., Laclette, J. P. and F. Martínez-Hernandez. 2013. Genetic variation of North American triatomines (Insecta: Hemiptera: Reduviidae): Initial divergence between species and populations of Chagas Disease vector. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 88: 275–284.
- Hetru, C., Hoffmann, D. and P. Bulet. 1998. Antimicrobial peptides from insects. Pp. 40–66. In: Brey, P.T. and D. Hultmark. (Eds.), *Molecular Mechanisms of Immune Responses in Insects*. Chapman & Hall, London,
- Lavine, M. D. and M. R. Strand. 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32: 1295–1309.
- Martínez-Ibarra, J. A., Valencia-Navarro, I., León-Saucedo, S., Ibáñez-Cervantes, G., Bustos-Saldaña, R., Montañez-Valdez, O. D., Cervantes Díaz, O. I. and B. Noguera-Torres. 2011. Distribution and infection of triatomines (Hemiptera: Reduviidae) by *Trypanosoma cruzi* in the state of Michoacán, México. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 106: 445–450.
- Martínez-Hernández, F., Martínez-Ibarra, J. A., Catalá, S., Villalobos, G., de la Torre, P., Laclette, J. P., Alejandro-Aguilar, R. and B. Espinoza, B. 2010. Natural crossbreeding between sympatric species of the *Phyllosoma* Complex (Insecta: Hemiptera: Reduviidae) indicate the existence of only one species with morphologic and genetic variations. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 82: 74–82.
- Martínez, H. F., Villalobos, G. C., Ceballos A. M., De la Torre, P., Laclette, J. P., Alejandro-Aguilar, R. and B. Espinoza. 2006. Taxonomic study of the *Phyllosoma* complex and other triatomino (Insecta: Hemiptera: Reduviidae) species of epidemiological importance in the transmission of Chagas disease: Using ITS-2 and mtCytB sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 41: 279–287.
- Paskewitz, S. M. and B. M. Christensen. 1996. Immune responses of vectors. Pp. 371–392. In: Beaty, B. and W. C. Marquart (Eds.) *The biology of disease vectors*. University Press of Colorado, Niwot, Colorado.
- Tsakas, S. and V. J. Marmaras. 2010. Insect immunity and its signaling: an overview. *Invertebrates Survival Journal*, 7: 228–238.
- Vieira, C. S., Waniek, P. J., Castro, D. P., Mattos, D. P., Moreira, O. C. and P. Azambuja. 2016. Impact of *Trypanosoma cruzi* on antimicrobial peptide gene expression and activity in the fat body and midgut of *Rhodnius prolixus*. *Parasites & Vectors*, 9: 119. doi:10.1186/s13071-016-1398-4.
- Waniek, P. J., Castro, H. C., Sathler, P. C., Miceli, L., Jansen, A. M. and C. A. C. Araújo. 2009. Two novel defensin-encoding genes of the Chagas disease vector *Triatoma brasiliensis* (Reduviidae, Triatominae): Gene expression and peptide-structure modeling. *Journal of Insect Physiology*, 55: 840–848.
- WHO. Chagas disease (American trypanosomiasis) Fact sheet N° 340. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>. (Fecha de consulta: 10-V-2015).