

ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE UNA LISOZIMA DE *Triatoma (Meccus) pallidipennis* Stat, 1872 (HEMÍPTERA: REDUVIIDAE), VECTOR DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EN MÉXICO

Ignacio Martínez✉, Paulina Diaz-Garrido y Bertha Espinoza

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Avenida Universidad 3000, Col. Universidad Nacional Autónoma de México, Alcaldía Coyoacán, C. P. 04510, Ciudad de México

✉Autor de correspondencia: imm@biomedicas.unam.mx

RESUMEN. *Triatoma (Meccus) pallidipennis* es una especie endémica de México cuyo papel como vector de *Trypanosoma cruzi* (agente etiológico de la enfermedad de Chagas) ha sido ampliamente demostrado. Muchos de los aspectos de su biología aún no se conocen, particularmente aquellos relacionados con las moléculas involucradas en la eliminación de patógenos como defensinas y lisozimas. En este trabajo se analizó la filogenia y características de una lisozima de *M. pallidipennis* recientemente registrada en GenBank por nuestro grupo de investigación. Se encontró que dicha molécula pertenece al grupo de las lisozimas tipo-c. Esta es la primera molécula de esta familia descrita en *M. pallidipennis* y está más emparentada con sus homólogos de *T. dimidiata* que con los de otras especies de triatomas de Sudamérica.

Palabras clave: péptidos antimicrobianos, enfermedad de Chagas, *T. pallidipennis*, lisozima.

Phylogenetic analysis of a lysozyme from *Triatoma (Meccus) pallidipennis*, Chagas disease vector in Mexico

ABSTRACT. *Triatoma (Meccus) pallidipennis* is an endemic species of Mexico whose role as vector of *Trypanosoma cruzi* (etiological agent of Chagas disease) has been well demonstrated. Many aspects of its biology are not yet known, particularly those related to molecules involved in the elimination of pathogens such as defensins and lysozymes. In this work, we analyzed the phylogeny and characteristics of a lysozyme of *M. pallidipennis* recently registered in GenBank by our research group. It was found that this molecule belongs to the group of type-C lysozymes. This is the first molecule of this family described in *M. pallidipennis* and is more related to its *T. dimidiata* counterparts than those of other triatomine species of South America.

Keyword: antimicrobial peptides, Chagas disease, *T. pallidipennis*, lysozyme.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas (Tripanosomiasis americana) es un padecimiento causado por el protozooario *Trypanosoma cruzi*. Esta parasitosis es un problema de salud relevante en países de América donde se estiman 6-7 millones de infectados y 50, 000 nuevos casos por año. En la última década se han reportado casos en Estados Unidos, Europa, Asia y Oceanía, debido principalmente a los inmigrantes latinoamericanos (Schmunis y Yadon, 2010). *T. cruzi* es transmitido al hombre y a otros mamíferos a través de las heces de insectos de la familia *Triatominae*, que al alimentarse defecan, depositando al parásito que ingresa al organismo a través de mucosas, heridas pre-existentes o por el sitio de picadura. En México se han reportado más 30 especies de estos vectores, la mayoría de los cuales se han encontrado naturalmente infectados con este patógeno (Ramsey *et al.*, 2015). En la última década se ha hecho énfasis en la importancia de tener una mejor comprensión de la fisiología de los vectores triatominos y su relación con el entorno, para interrumpir la transmisión del parásito (de Fuentes-Vicente *et al.*, 2018). Uno de los aspectos que ha sido abordado es el sistema inmune de estos insectos, cuya posible participación en la eliminación de *T. cruzi* lo hace muy atractivo para la investigación biomédica (Mello *et al.*, 1995).

Una parte importante de dicho sistema inmune lo constituyen moléculas como defensinas y lisozimas, que actúan como péptidos antimicrobianos (Díaz-Garrido *et al.*, 2018).

Las lisozimas son una familia de proteínas ampliamente distribuidas en vertebrados e invertebrados, incluidos los insectos. En estos últimos se ha determinado que se expresan en diversos tejidos, participan en procesos digestivos y tienen propiedades antimicrobianas (Moraes *et al.*, 2014). Previamente ha sido reportada la presencia de diversas lisozimas en triatomos sudamericanos como *Rhodnius prolixus*, *Triatoma brasiliensis* y *Triatoma infestans* (Araújo *et al.*, 2006; Kollien *et al.*, 2003; Ursic-Bedoya *et al.*, 2008). Sin embargo, no hay información sobre la presencia o características (secuencia de aminoácidos, de nucleótidos, sitio de unión a sustrato, sitio catalítico de la enzima) de lisozimas de especies mexicanas. Por ello, el objetivo del presente trabajo fue establecer la filogenia y características de una lisozima de *Meccus pallidipennis*, vector endémico de México, distribuido en la región centro-sur del país, que ha sido considerada de importancia médica por estar domiciliada y tener altos porcentajes de infección (Vidal-Acosta *et al.*, 2000).

MATERIALES Y MÉTODO

Secuencias de lisozimas. La secuencia de lisozima de *M. pallidipennis* fue reportada recientemente en GenBank por nuestro grupo de trabajo (MH005839). Para el análisis filogenético se obtuvieron otras secuencias de nucleótidos y aminoácidos de lisozimas de la misma base: *Triatoma infestans* (AY253830.1, DQ888712.1), *Triatoma brasiliensis* (AY692463, AAU04569), *Triatoma (Meccus) pallidipennis* (MH005839.1), *Triatoma dimidiata* (GECL01000142, JAP05982), *Rhodnius prolixus* (EU250275.1), *Halyomorpha halys* (XM_014434963), *Cimex lectularius* (XM014388499), *Aphis gossypii* (KY575341), *Acyrtosiphon pisum* (XM00194928), *Drosophyla melanogaster* (X58382, NM057480), *Aedes aegypti* (AJ290428), *Bombyx mori* (L37416), *Anopheles dirus* (EU622903), *Musca domestica* (KY680278), *Homo sapiens* (M21119, M19045) y *Danio rerio* (BC162644). También se obtuvieron secuencias proteicas de lisozimas específicas tipo-c, tipo-g y tipo-i de *Riptortus pedestris* (BAN20103), *Mythimna separata* (AZJ51072), *Manduca sexta* (AAB31190), *Gallus gallus* (AAA48943), *Bombyx mori* (AAB40947), *Ostrinia furnacalis* (ABN54797), *Hyalophora cecropia* (AAA29190), *Spodoptera exigua* (AAP03061), *Anguilla japonica* (AIZ00423), *Danio rerio* (NP001002706), *Osmerus mordax* (ACO09746), *Eisenia andrei* (ABC68610), *Drosophila melanogaster* (AAL49382) y *Apis mellifera* (XP393161).

Análisis filogenético. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos fueron alineadas mediante el programa Clustal W. El análisis para la identificación de los sitios de unión a sustrato se realizó mediante el software BioEdit (Hall, 1999). Las secuencias alineadas, tanto de nucleótidos, como de aminoácidos, fueron empleadas para realizar un análisis de Neighbor joining (NJ) mediante el software MEGA6, considerando el modelo de *p-distancia* con un bootstrap de 10,000 réplicas y una cobertura del 95% en cada sitio analizado (Tamura *et al.*, 2013). Los árboles filogenéticos resultantes fueron visualizados mediante Figtree v1.4.3. (Rambaut, 2006).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La secuencia de nucleótidos reportada para la lisozima de *M. pallidipennis* en GenBank (TpalLys) está conformada por 367 nucleótidos (108 aminoácidos) y fue obtenida a partir del RNA mensajero del cuerpo graso del insecto. Cuando la secuencia de TpalLys fue comparada con otras secuencias de lisozimas se observó que TpalLys es muy parecida a su homóloga en *T. dimidiata*, con la cual comparte un 90 % de identidad a nivel de nucleótidos y un 85% a nivel de aminoácidos. El análisis filogenético mediante NJ mostró que esta molécula se agrupa con las lisozimas

reportadas para otros triatomas (Figura 1A). Como se esperaba, se observó una alta similitud con la misma molécula de *T. dimidiata*, especie distribuida en el centro-sur de México y Centro América. Se nota un distanciamiento de las lisozimas reportadas para especies sudamericanas como *T. brasiliensis* y *T. infestans*. Este distanciamiento es más notorio con triatominos menos emparentados como *R. prolixus*. Esta topología en los arboles filogenéticos ha sido observada con otros péptidos antimicrobianos como las defensinas del género *Triatoma*, las cuales se agrupan por especies afines, separándose de géneros como *Rhodnius* (De Araújo *et al.*, 2015; Diaz-Garrido *et al.*, 2018). Una topología similar fue observada en el filograma obtenido a partir de la secuencia de aminoácidos (Figura 1B). A partir de esta filogenia se puede inferir que la TpalLys podría participar en el control de la infección con *T. cruzi* y en el proceso de digestión, como se ha descrito para moléculas similares en especies del mismo género (Araújo *et al.*, 2006; Buarque *et al.*, 2013).

Por otra parte, hasta ahora se han descrito 3 tipos principales de lisozimas: tipo-c (mamíferos, insectos, aves, reptiles, anfibios, peces, arácnidos y crustáceos), tipo-i (anélidos, artrópodos, equinodermos, moluscos, poríferos) y tipo-g (aves, peces, mamíferos, moluscos) (Callewaert y Michiels, 2010).

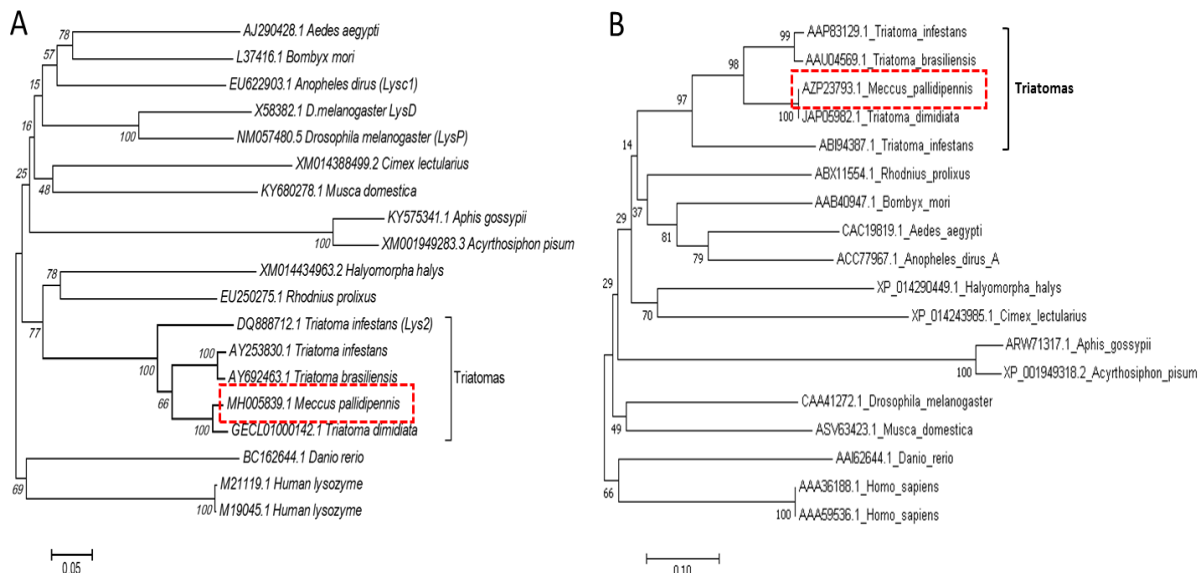


Figura 1. Filogenia de la lisozima de *Meccus pallidipennis*. A) Análisis de nucleótidos (nts) mediante NJ. B) Análisis de aminoácidos (aa) mediante NJ. La filogenia fue inferida como se describe en materiales y método. El valor de bootstrap a partir de 10, 000 réplicas es mostrado en los nodos de los brazos. Las distancias genéticas para el análisis fueron determinadas por el método de *p-distance*. La escala mostrada representa el número de diferencias por posición en la secuencia. Todas las posiciones con menos del 95% de cobertura fueron eliminadas. El análisis de nts incluyó 19 secuencias y un total de 329 posiciones. El análisis de aa incluyó 18 secuencias y un total de 85 posiciones.

Las lisozimas reportadas para triatominos hasta ahora han sido tipificadas como tipo-c. Sin embargo, se sabe que esta es una familia con varios miembros y que algunos artrópodos expresan enzimas de tipo-c y de tipo-i simultáneamente (Callewaert y Michiels, 2010; Paskewits *et al.*, 2008). Para establecer la naturaleza de TpalLys, se realizó un análisis de NJ comparándola con secuencias de lisozimas tipo-c, tipo-g y tipo-i. Se observó que la lisozima de *M. pallidipennis* se agrupa con las lisozimas tipo-c (Figura 2). Esta es la primera lisozima de este tipo descrita en esta especie mexicana, pero no necesariamente la única. Se sabe que algunos organismos pueden

expresar más de un gen de lisozimas tipo-c (Gao *et al.*, 2012). Por lo que podría haber otros genes por describir en esta especie. Al analizar detalladamente la secuencia de aminoácidos de TpalLys y compararla con secuencias de Lisozima tipo-c descritas en otros organismos, se observó que en esta secuencia parcial están presentes 6 de las 8 Cisteínas características de esta familia de enzimas (Figura 3). También están presentes los residuos de ácido glutámico (E) y ácido aspártico (D) característicos del sitio catalítico. Asimismo, se identificó la presencia de los aminoácidos que participan en la unión al sustrato, la mayoría de los cuales son compartidos con la lisozima de huevo, la molécula mejor caracterizada de toda la familia.

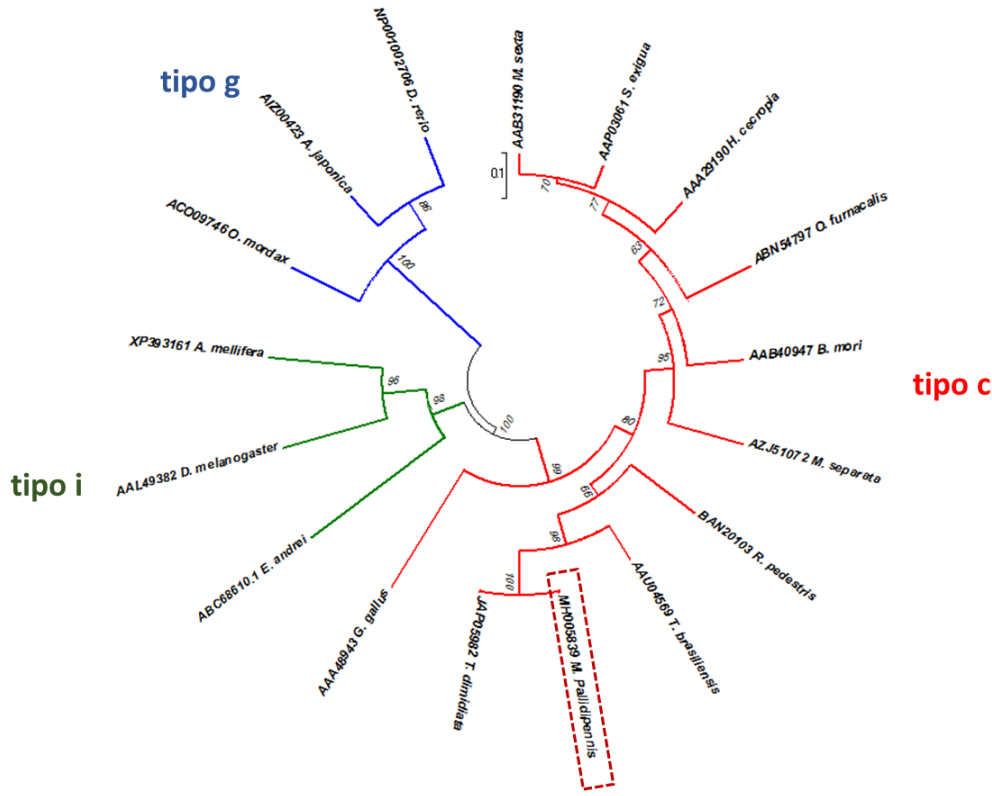


Figura 2. La lisozima de *M. pallidipennis* pertenece al tipo-c. Se analizó mediante NJ la similitud de la secuencia de *M. pallidipennis* con lisozimas de los tres grupos principales. El análisis se realizó como se describe en materiales y método. Se emplearon 17 secuencias de amino ácidos y 59 posiciones. Todos los sitios con menos del 95% de cobertura fueron eliminados. Caja roja punteada: TpalLys

Previamente se ha propuesto que la actividad enzimática de la lisozima de huevo se encuentra en los residuos de ácido aspártico y ácido glutámico, pero que la actividad antimicrobiana se encuentra distribuida en otros segmentos de la molécula (Ibrahim *et al.*, 2001a). A este respecto se ha demostrado que la lisozima tipo-c de gallina cuenta con una región denominada Helix 1 (DITASVNCAKKIV) que tiene actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas como *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* (Ibrahim *et al.*, 2001b). Nosotros encontramos que la TpalLys conserva un 84.6% de la secuencia Helix 1, con dos sustituciones Lys por Leu (hidrofílico por hidrofóbico) en las posiciones 93 y 94 (Figura 3). Lo cual sugiere que podría conservar la actividad bactericida descrita para su homólogo en gallina. Asimismo, la TpalLys mantiene (con sustituciones conservativas) siete de los ocho aminoácidos del péptido antimicrobiano Frac A (KVFGRCLE) descrito en la lisozima de ave con propiedades bactericidas (Ibrahim *et al.*, 2005). La similitud observada entre la lisozima de *M.*

pallidipennis y la lisozima de huevo de gallina no es rara puesto que previamente se ha descrito una alta similitud entre las lisozimas de insectos y de vertebrados (Boman y Hultmark, 1987).

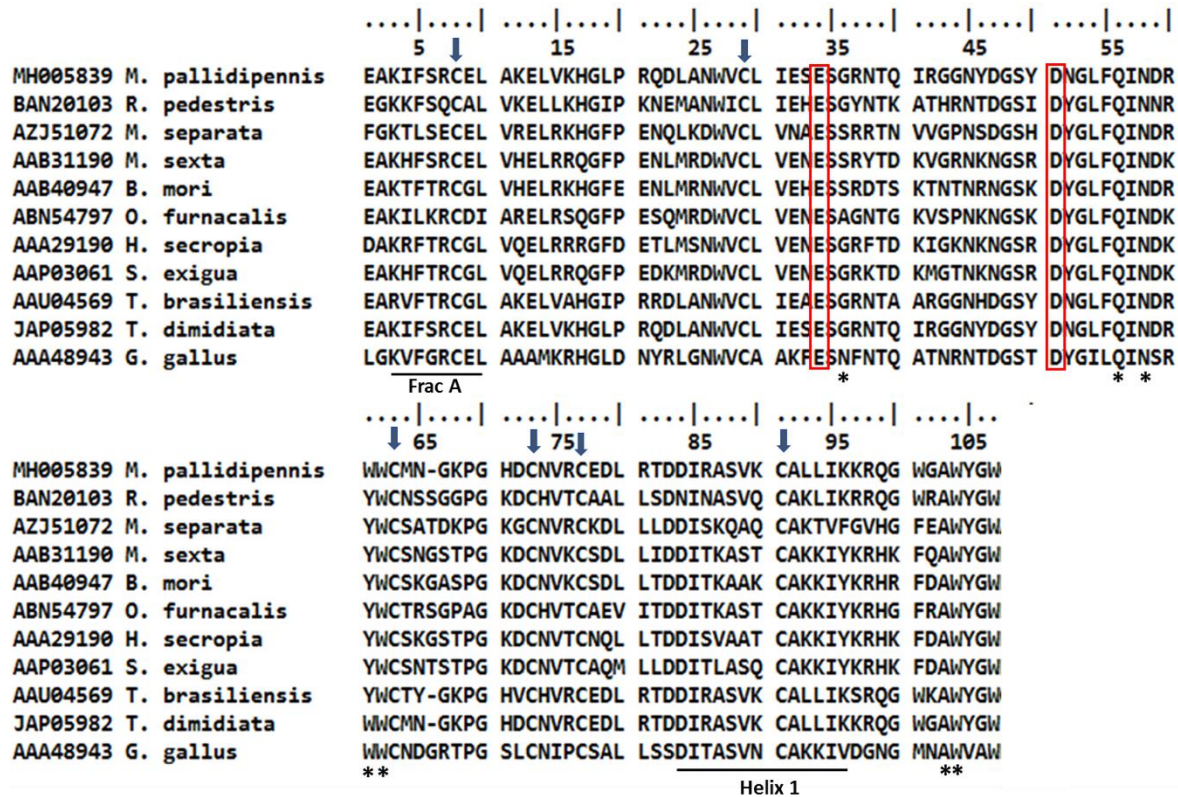


Figura 3. Características de TpaLys tipo-c. Se encontraron 6 de las cisteínas características de estas lisozimas (flechas), así como los ácidos glutámico y aspártico (cajas rojas) característicos del sitio catalítico de la enzima. También se identificaron 7 de los 12 sitios de unión a sustrato (asteriscos) descritos para la lisozima de huevo (AAA48943). Los péptidos antimicrobianos Frac A y Helix 1 identificados en la lisozima tipo-c de gallina están subrayados.

Por otra parte, las lisozimas tipo-c se subdividen en dos grupos: las de unión a calcio y las que no se unen a este. Las primeras se caracterizan por la presencia de residuos de aspártico (D) en las posiciones 101, 106 y 107. Hasta ahora éstas moléculas solo han sido encontradas en algunos mamíferos, aves y peces, por lo que se han propuesto como un carácter ancestral que se perdió en otros organismos durante el desarrollo evolutivo de las lisozimas convencionales tipo-c (Grobler *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 2018). La lisozima de *M. pallidipennis* carece de estos residuos en esas posiciones, por lo que proponemos que pertenece al grupo de lisozimas tipo-c que no se unen a calcio.

CONCLUSIONES

Las lisozimas han sido consideradas parte importante de un mecanismo primitivo de defensa en una gran variedad de organismos, los cuales carecen de un sistema inmunológico tipo vertebrado. La TpaLys es una lisozima que comparte alta similitud con la misma molécula de *T. dimidiata* y otras especies del mismo género. Pertenece al grupo de las lisozimas de tipo-c, de no-unión a calcio, que conserva varios de los sitios de unión a sustrato y las secuencias Frac A y Helix 1 con propiedades antimicrobianas.

AGRADECIMIENTOS

P. Diaz-Garrido es apoyada por una beca Doctoral del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (663015).

LITERATURA CITADA

- Araújo, C.A., Waniek, P.J., Stock, P., Mayer, C., Jansen, A.M., Schaub, G.A. 2006. Sequence characterization and expression patterns of defensin and lysozyme encoding genes from the gut of the reduviid bug *Triatoma brasiliensis*. *Insect Biochemical and Molecular Biology*, 36(7): 547-560. doi: 10.1016/j.ibmb.2006.04.003.
- Boman, H.G., Hultmark, D. 1987. Cell-free immunity in insects. *Annual Review of Microbiology*, 41(1): 103-126. doi: 10.1146/annurev.mi.41.100187.000535
- Buarque, D.S., Braz, G.R., Martins, R.M., Tanaka-Azevedo, A.M., Gomes, C.M., Oliveira, F.A., Schenkman, S., Tanaka, A.S. 2013. Differential expression profiles in the midgut of *Triatoma infestans* infected with *Trypanosoma cruzi*. *PLoS One*. 8(5): e61203. doi: 10.1371/journal.pone.0061203.
- Callewaert, L., Michiels, C.W. 2010. Lysozymes in the animal kingdom. *Journal of Bioscience*, 35(1): 127-160.
- de Fuentes-Vicente, J.A., Gutierrez-Cabrera, A.E., Flores-Villegas, A.L., Lowenberger, C., Benelli, G., Salazar-Schettino, P.M., Cordoba-Aguilar, A. 2018. What makes an effective Chagas disease vector? Factors underlying *Trypanosoma cruzi*-triatomine interactions. *Acta Tropica*, 183(1): 23-31. doi: 10.1016/j.actatropica.2018.04.008.
- De Araújo, C.A., Lima, A.C., Jansen, A.M., Galvão, C., Jurberg, J., Costa, J., Azambuja, P., Waniek, P.J. 2015. Genes encoding defensins of important Chagas disease vectors used for phylogenetic studies. *Parasitology Research*, 114(12): 4503-4511. doi: 10.1007/s00436-015-4694-6.
- Diaz-Garrido, P., Sepulveda-Robles, O., Martinez-Martinez, I., Espinoza, B. 2018. Variability of defensin genes from a Mexican endemic Triatominae: *Triatoma (Meccus) pallidipennis* (Hemiptera: Reduviidae). *Bioscience Reports*, 38(5): 1-11. doi: 10.1042/BSR20180988.
- Gao, F.Y., Qu, L., Yu, S.G., Ye, X., Tian, Y.Y., Zhang, L.L., Bai, J.J., Lu, M. 2012. Identification and expression analysis of three c-type lysozymes in *Oreochromis aureus*. *Fish Shellfish Immunology*, 32(5): 779-788. doi: 10.1016/j.fsi.2012.01.031.
- Grobler, J.A., Rao, K.R., Pervaiz, S., Brew, K. 1994. Sequences of two highly divergent canine type c lysozymes: implications for the evolutionary origins of the lysozyme/alpha-lactalbumin superfamily. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 313(2): 360-366. doi: 10.1006/abbi.1994.1399.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41(1): 95-98.
- Ibrahim, H.R., Matsuzaki, T., Aoki, T. 2001a. Genetic evidence that antibacterial activity of lysozyme is independent of its catalytic function. *FEBS Letters*, 506(1): 27-32.
- Ibrahim, H.R., Thomas, U., Pellegrini, A. 2001b. A helix-loop-helix peptide at the upper lip of the active site cleft of lysozyme confers potent antimicrobial activity with membrane permeabilization action. *Journal of Biological Chemistry*, 276(47): 43767-43774. doi:10.1074/jbc.M106317200.
- Ibrahim, H.R., Inazaki, D., Abdou, A., Aoki, T., Kim, M. 2005. Processing of lysozyme at distinct loops by pepsin: a novel action for generating multiple antimicrobial peptide motifs in the newborn stomach. *Biochemical and Biophysical Acta*, 1726(1): 102-114. doi: 10.1016/j.bbagen.2005.07.008.

- Kollien, A.H., Fechner, S., Waniek, P.J., Schaub, G.A. 2003. Isolation and characterization of a cDNA encoding for a lysozyme from the gut of the reduviid bug *Triatoma infestans*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 53(3): 134-145. DOI: 10.1002/arch.10090.
- Mello, C.B., Garcia, E.S., Ratcliffe, N.A., Azambuja, P. 1995. *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*: interplay with hemolymph components of *Rhodnius prolixus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 65(3): 261-268. doi: 10.1006/jipa.1995.1040.
- Moraes C.S., Diaz-Albiter, H.M., Faria Mdo, V., Sant'Anna, M.R., Dillon, R.J., Genta, F.A. 2014. Expression pattern of glycoside hydrolase genes in *Lutzomyia longipalpis* reveals key enzymes involved in larval digestion. *Frontiers in Physiology*, 5(1): 276-281. doi: 10.3389/fphys.2014.00276.
- Paskewitz, S.M., Li, B., Kajla, M.K. 2008. Cloning and molecular characterization of two invertebrate-type lysozymes from *Anopheles gambiae*. *Insect Molecular Biology*, 17(3): 217-225. doi: 10.1111/j.1365-2583.2008.00797x.
- Rambaut, A. 2006. *FigTree: tree figure drawing tool.*, FigTree, ed. (Edinburg, TX, USA., Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburg, USA.).
- Ramsey, J.M., Peterson, A.T., Carmona-Castro, O., Moo-Llanes, D.A., Nakazawa, Y., Butrick, M., Tun-Ku, E., la Cruz-Felix, K., Ibarra-Cerdena, C.N. 2015. Atlas of Mexican Triatominae (Reduviidae: Hemiptera) and vector transmission of Chagas disease. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 110(3): 339-352. doi: 10.1590/0074-02760140404.
- Schmunis, G.A., Yadon, Z.E. 2010. Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta Tropica*, 115(1): 14-21. doi: 10.1016/j.actatropica.2009.11.003.
- Tamura K., Peterson, S.G., Filipinski, D., Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12): 2725-2729. doi: 10.1093/molbev/mst197.
- Ursic-Bedoya, R.J., 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. *Journal of Insect Physiology*, 54(3): 593-603. doi: 10.1016/j.jinsphys.2007.12.009.
- Vidal-Acosta, V., Ibanez-Bernal, S., Martinez-Campos, C. 2000. Natural *Trypanosoma cruzi* infection of Triatominae bugs associated with human habitations in Mexico. *Salud Publica de Mexico*, 42(6): 496-503.
- Zhang, S., Xu, Q., Bosdari, E., Du, H., Qi, Z., Li, Y., Huang, J., Di, J., Yue, H., Li, C., Congiu, L., Wei, Q. 2018. Characterization and expression analysis of g- and c-type lysozymes in Dabry's sturgeon (*Acipenser dabryanus*). *Fish Shellfish Immunology*, 76(2): 260-265. doi: 10.1016/j.fsi.2018.10.1038/nmeth.3213