

CIENCIA, TECNOLOGÍA E INNOVACIÓN PARA EL DESARROLLO DE MÉXICO

Dr. Héctor Nolasco Soria, Director General y Editor

Identificación de biomarcadores proteómicos del intestino del mosquito *Anopheles albimanus* transmisor de la malaria en México, infectado con *Plasmodium berghei*

La Paz, B.C.S., a 14 de diciembre de 2014



Vania Verónica Serrano Pinto

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

vserrano04@cibnor.mx

Resumen
El principal vector para la transmisión de la malaria en las costas de México es el mosquito *Anopheles albimanus*. El intestino de los mosquitos transmisores de enfermedades lleva a cabo una variedad de funciones que están relacionadas con la alimentación a base de sangre. El objetivo del estudio fue analizar el intestino de *An. albimanus* infectado con *Plasmodium berghei* utilizando análisis proteómicos para identificar proteínas que se sobre expresan después de la invasión con *Plasmodium*. Las dos principales clases de proteínas sobre expresadas fueron las de inmunidad y defensa y el grupo de proteasas digestivas.

Palabras clave: Malaria, proteómica, intestino, *Anopheles albimanus*, *Plasmodium berguei*.

Abstract
The main vector for transmission of malaria in the coasts of Mexico is the *Anopheles albimanus* mosquito. The midgut of disease-transmitting mosquitoes carries out a variety of functions that are related to blood feeding. The objective was to analyze the midgut of *An. albimanus* infected with *Plasmodium berghei* using a proteomic approach to identify proteins over expressed following *Plasmodium* invasion. The two major classes of proteins were overexpressed on the immunity/defense and digestive protease groups.

Key words: Malaria, proteomics, midgut, *Anopheles albimanus*, *Plasmodium berguei*.

Área temática: Área 3. Medicina y Ciencias de la Salud.

Problemática

La malaria o paludismo es una de las principales enfermedades transmitida por vector en países tropicales y subtropicales del mundo. Es un padecimiento de naturaleza infecciosa causada por el protozooario parásito del género *Plasmodium* y transmitida al hombre a través de la picadura del mosquito hembra del género *Anopheles* (Osta et al 2004, Rodríguez et al 2007) (Fig. 1). La malaria infecta entre 350 y 500 millones de personas en el mundo y mata a más de un millón cada año. En el año 2000, se registraron más de 1 millón de casos de malaria en América. Para el año 2011 el número había descendido a menos de 490,000. En México las muertes se redujeron de 439 a 113 durante el mismo período (Boletín de Epidemiología, SSA, México, 2011), y se reportaron logros mediante un programa de "tratamiento focalizado" que consiste en la eliminación de criaderos del vector mediante la remoción de algas filamentosas *Spirogyra* sp. por las comunidades (Rodríguez-López M.H. 1994). En abril de 2013, el Sistema SINAVE/DGE/Secretaría de Salud/Sistema de Notificación Semanal de Casos Nuevos de Enfermedades, informó sobre un total de 123 casos probables de malaria por *Plasmodium vivax*, especie predominante en nuestro país (Uribarren-Berrueta 2014). No obstante los grandes avances alcanzados, alrededor del 30% de la población de 21 países endémicos de América, sigue expuesta a un riesgo de contagio y el 8% se considera de "alto riesgo" (OMS 2012). Durante muchos años se han realizado diversas estrategias de prevención y control de esta enfermedad en México. Sin embargo, a pesar del enorme esfuerzo que se ha realizado para desarrollar vacunas en humanos para controlar este problema, la resistencia de los mosquitos a los insecticidas, así como de los parásitos a los fármacos antipalúdicos, no han permitido una solución eficaz, por lo que es urgente desarrollar nuevas estrategias de prevención y control (Mendis et al 2001), en este sentido, una posibilidad es conocer las moléculas que permiten el desarrollo del parásito en el mosquito vector, para proponer proteínas candidatas a ser modificadas mediante la transgénesis orientadas a bloquear el desarrollo del parásito (Ito et al 2002, Kaslow 2002).



Figura 1. Mosquito del género *Anopheles* spp..

Usuarios

La Secretaría de Salud (SS) Federal, el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), el Seguro Popular, el Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (ISSSTE), la Secretaría de Desarrollo Social (SEDESOL), las Secretarías de Salud de los Estados y la sociedad en general.

Proyecto

El principal vector para la transmisión de la malaria en las costas de México, infectado por el protozooario parásito *P. vivax*, es el mosquito *Anopheles albimanus*. Las hembras del mosquito *Anopheles* son las únicas que se alimentan de sangre, elemento necesario para el proceso de vitelogenénesis (Osta et al 2004, Xu et al 2006), por lo tanto son también las responsables de la transmisión de la enfermedad. La sangre se digiere en el intestino de este mosquito y es el primer lugar de interacción con el parásito. En este sitio, mediante la activación de diversos mecanismos del sistema inmune innato, se bloquea casi por completo el desarrollo del parásito debido a la lisis en el epitelio del intestino y a la melanización temprana de los oquistes. No obstante lo anterior, algunos oquistes sobreviven en el lumen y en el epitelio del intestino del vector (Collins 1994), por lo que es indispensable eliminarlos. En mosquitos se tienen identificadas tres vías de transducción de señales relacionadas con inmunidad, las vías Toll, IMD y la vía JAK/STAT. La información relacionada con las proteínas responsables de la respuesta inmune en mosquitos es limitada (Dimopoulos et al 1998), debido a lo cual, la determinación de la función de estas proteínas podría contribuir al entendimiento de las respuestas selectivas de la inmunidad innata en este insecto, con la finalidad de bloquear el desarrollo del parásito dentro del mosquito. Para cumplir con esta meta, es indispensable identificarlas así como entender el mecanismo por el cual el parásito es eliminado. Con base en lo anterior, investigadores en Enfermedades Transmitidas por Vectores del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, B.C.S. y del INSP en Cuernavaca, Morelos, realizamos un estudio para identificar las proteínas que participan en la susceptibilidad o resistencia del mosquito *An. albimanus* durante la infección con *Plasmodium*, para lo cual se tuvo como objetivo principal analizar el intestino del mosquito infectado con *P. berghei*, utilizando análisis proteómicos para identificar las proteínas que se sobre expresan después de una alimentación con sangre infectada con este protozooario.

La metodología utilizada para la identificación de las proteínas, incluyó la alimentación de los mosquitos con sangre de ratón no infectada e infectada con *P. berghei*, siguiendo el procedimiento descrito por Rodríguez y col. (2002). Se realizaron las disecciones de 200 mosquitos (de 3 días post-emergencia) y se separaron en dos grupos: Grupo experimental 1- 100 mosquitos alimentados con sangre de ratón sin infectar (Control). Grupo experimental 2- 100 mosquitos alimentados con sangre de ratón infectada con *P. berghei*. La disección se efectuó a las 24 horas post-alimentación. Posteriormente se realizó la limpieza y la cuantificación de las

muestras. Por medio de la electroforesis de doble dimensión, se obtuvieron las proteínas sintetizadas durante el reto inmune. La primera dimensión o isoelectroenfoco, se llevó a cabo con la finalidad de separar las proteínas con base en su punto isoelectro (pI) y la segunda dimensión, mediante la electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE al 12.5%, permitió separar las proteínas con base en su peso molecular (kDa). Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie y escaneados. El análisis de los geles se realizó mediante el programa (Image Master 2D Platinum, Amersham Biosciences) (Serrano-Pinto et al 2010). Los spots de proteínas obtenidos en los geles, fueron cortados, digeridos con tripsina y analizados por medio de espectrometría de masas (Electrospray). La identificación de los péptidos fue reportada en términos de probabilidad con el programa Xcalibur (Thermo Fisher Scientific) en un sistema PC con Windows NT para obtener las secuencias de los péptidos sintetizados, que luego fueron comparadas contra las secuencias de proteínas homólogas en las bases de datos Swissprot y Non-redundant del NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), de proteínas de *An. gambiae* (<http://www.anobase.org/>) y en el MSBLAST (<http://dove.embl-heidelberg.de/Blast2/msblast.html>), lo que permitió conocer el nombre y la función de cada una de las proteínas.

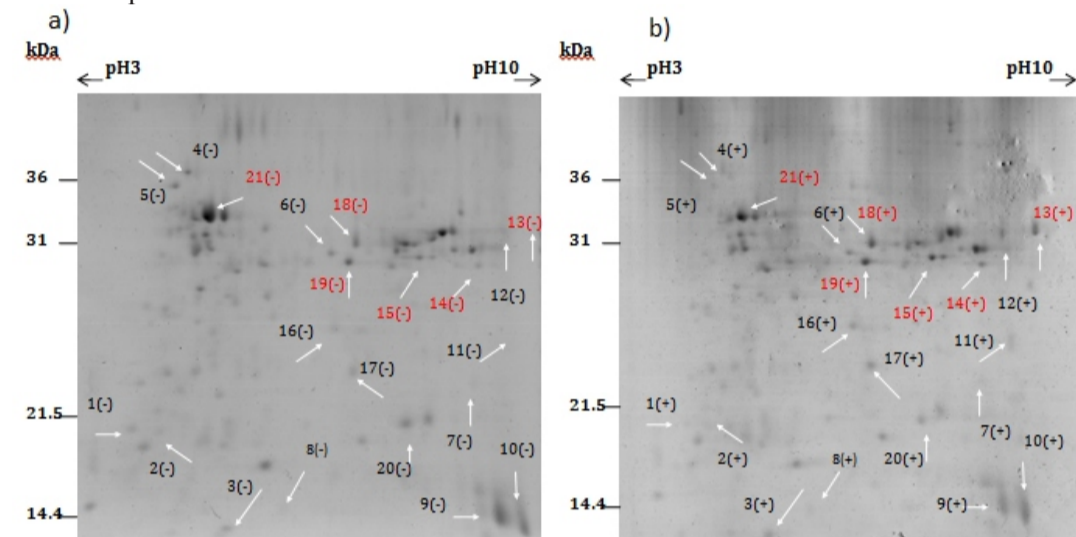


Figura 2. Visualización de las proteínas diferenciales analizadas por electroforesis bidimensional del intestino del mosquito hembra *Anopheles albimanus* alimentado con: (a) sangre de ratón no infectada; (b) sangre de ratón infectada con el protozooario *Plasmodium berghei*. Proteínas inmunes sobre expresadas en color rojo: Spot 19- Proteína Serpina (SRPN11); spot 14- Proteína similar a Spaetzle (Spaetzle-like protein); spot 13- Proteína en la región, repeticiones ricas en leucina (Protein in the region, Leucine-rich repeats (LRRs) por sus siglas en inglés); spot 18- Proteína ECSIT- Señalización intermedia evolutivamente conservada en Toll (Evolutionarily Conserved Signaling Intermediate in Toll (ECSIT) por sus siglas en inglés); spot 15- Serina tipo proteasa (Serine type protease); spot 21- Serina proteasa similar a Tripsina (Trypsin-like serine protease).

Como parte de los resultados más relevantes, se identificaron aproximadamente 200 spots de proteínas bien diferenciados. Se identificaron 21 spots de proteínas que presentaron mayor expresión en volumen en las muestras de mosquitos infectados con *Plasmodium* (Fig. 2). Se identificaron 19 proteínas conocidas y 2 nuevas proteínas. Las diferentes categorías funcionales de las proteínas sobre expresadas en el intestino del mosquito se observan en la figura 3. Las dos clases principales de proteínas sobre expresadas, fueron la de inmunidad y defensa (34.78%) y el grupo de las proteasas digestivas (15.21%) (Serrano-Pinto et al 2010). Algunos de los péptidos identificados tuvieron similitud con las proteínas inmunes y proteasas digestivas de *An. gambiae* (Gorman et al 2000). Varias de estas proteínas como la proteína similar a Spaetzle un homólogo del ligando que activa el receptor Toll, la proteína Señalización intermedia evolutivamente conservada en Toll (ECSIT, por sus siglas en inglés) y una proteína adaptadora que sirve de puente para TRAF6 MEKK- 1 en la vía Toll (Kopp et al 1999) fueron inducidas en el intestino del mosquito en presencia de *Plasmodium*, lo que sugiere que la Vía Toll también media la respuesta antiplasmodial en este mosquito. La proteína en la región, repeticiones ricas en Leucina (LRRs) por sus siglas en inglés, presente también en la vía Toll, tiene un papel clave en las reacciones inmunes (Osta et al 2004). La familia de los receptores Toll incluye a las moléculas transmembrana del compartimiento extracelular, donde se produce el contacto y el reconocimiento de patógenos microbianos, y el compartimiento intracelular, donde se inician las cascadas de señalización que conducen a respuestas celulares (Vasselon y Detmers 2002). Se identificaron además diversas proteasas que fueron inducidas durante la infección de *P. berghei* (precursor de tripsina-3, quimiotripsina 1, proteasa tipo serina, y la serina proteasa similar a tripsina). La inducción del péptido Serpina (SRPN11) en las muestras infectadas en el presente estudio, sugiere que puede estar involucrado en la regulación de la respuesta inmune de *An. albimanus* a la infección debido a que la activación de las cascadas proteolíticas están reguladas por serpinas (inhibidores de la serina proteasa) (Danielli et al 2003, Vlachou et al 2005).

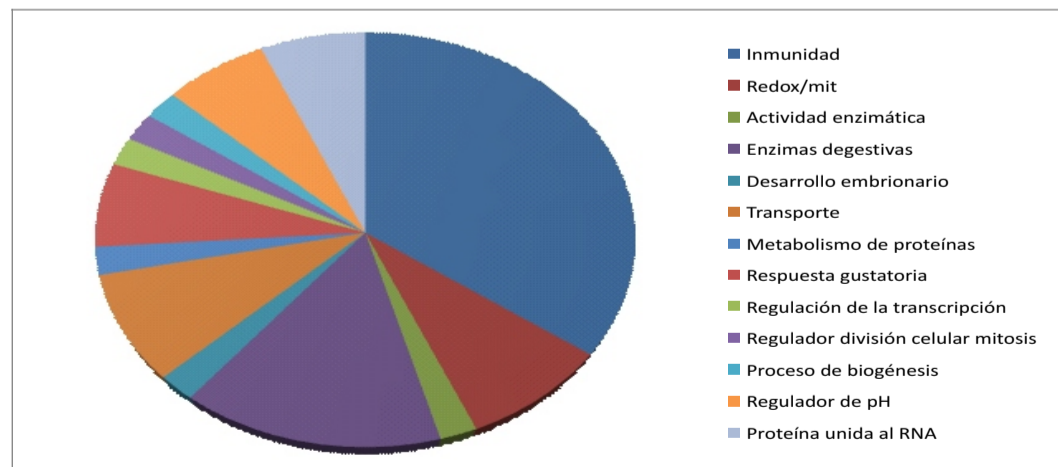


Figura 3. Diferentes categorías funcionales de las proteínas sobre expresadas en el intestino del mosquito hembra *Anopheles albimanus* infectado con el protozooario *Plasmodium berghei*.

En conclusión, con base en el análisis de estas proteínas y de sus funciones, se aporta nuevo conocimiento sobre mecanismos moleculares del desarrollo de *P. berghei* en *An. albimanus* que podrán ser utilizadas para establecer moléculas blanco que permitan el bloqueo del desarrollo del parásito en su vector mediante el silenciamiento de los genes que sintetizan a estas proteínas al inyectar RNA de interferencia (RNAi) en estos organismos, lo que puede servir como base para el desarrollo de mosquitos transgénicos resistentes a la transmisión.

Impacto socioeconómico

En todo el país se trabaja en establecer campañas efectivas de erradicación y manejo de este vector, orientadas a minimizar en lo posible el impacto negativo que se genera en el humano por esta enfermedad, sin descartar los altos costos anuales asignados para su control, por lo que este estudio servirá para establecer las bases para el desarrollo de nuevas estrategias de manejo y control que llevarán al objetivo final de erradicación de esta enfermedad en México y en otros países donde *An. albimanus* es el vector.

Contacto: <http://pcti.mx>, hnolasco2008@hotmail.com