

Año 12, PCTI 195-2021-11-13

Análisis proteómico del mosquito *Anopheles* transmisor del Paludismo infectado con el parásito *Plasmodium berghei*

Vania Verónica Serrano Pinto

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), vserrano04@cibnor.mx.

Medicina y Ciencias de la Salud

Abstract

The main vector for transmission of malaria in Mexico is the *Anopheles albimanus* mosquito. We analyzed the fat body of *An. albimanus* infected with *Plasmodium berghei* using proteomics to identify putative short peptides that are enriched in the fat body after blood feeding. Mosquito fat body tissue was analyzed by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry analysis and 11 spot proteins that are differentially expressed in the mosquitoes during the immune challenge were identified. At least four spots corresponded to fragments of proteins related with the immune system (two fragments of Wingless, Hdd11-like and two of Cytochrome P450). The results obtained in this study will serve as a basis for the development of transgenic mosquitoes, resistant to transmission. **Keywords:** malaria, *Anopheles albimanus*, *Plasmodium berghei*.

Resumen

El principal vector de la transmisión de paludismo o malaria en México es el mosquito *Anopheles albimanus*. Se analizó el tejido graso de *An. albimanus* infectado con *Plasmodium berghei* utilizando técnicas proteómicas para identificar péptidos cortos putativos que se enriquecen en el cuerpo graso después de la alimentación con sangre. El cuerpo graso de los mosquitos se analizó mediante electroforesis bidimensional y análisis de espectrometría de masas y se identificaron 11 proteínas puntuales que se expresan diferencialmente en los mosquitos durante el desafío inmune. Al menos cuatro puntos correspondieron a fragmentos de proteínas relacionadas con el sistema inmune (dos fragmentos de Wingless, tipo Hdd11 y dos de Cytochrome P450). Los resultados obtenidos en este estudio, servirán como base para el desarrollo de mosquitos transgénicos resistentes a la transmisión. **Palabras clave:** malaria, paludismo, *Anopheles albimanus*, *Plasmodium berghei*

Problemática

El paludismo o malaria que es una de las principales enfermedades en países tropicales y subtropicales del mundo incluyendo México, es una de las enfermedades infecciosas más importantes causada por el parásito protozoario del género *Plasmodium* (especies *P. vivax* y *P. falciparum*), y transmitida al hombre a través de la picadura del mosquito vector hembra del género *Anopheles* (OMS, 2020).

Usuarios

Secretaría de Salud, Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales, Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica. Investigadores del sector salud.

Introducción

Según el último Informe mundial sobre el paludismo (noviembre, 2020), hubo 229 millones de casos de paludismo en el 2019 en comparación con 228 millones de casos en el 2018. El número estimado de muertes por paludismo fue de 409,000 (2019), en comparación con 411,000 muertes (2018) (OMS 2020). *P. vivax* es el parásito predominante en la Región de las Américas causante del 75% de los casos de paludismo (OMS 2020). En México, en el 2019 hubo un aumento en el número de casos en relación a años anteriores, con un total de 618 casos de paludismo causado por *P. vivax* en Chiapas, Quintana Roo, Campeche, Chihuahua, Sinaloa y Nayarit, y ningún caso por *P. falciparum* (SUIVE 2019). Actualmente persisten retos significativos entre las poblaciones con mayor incidencia que comparten

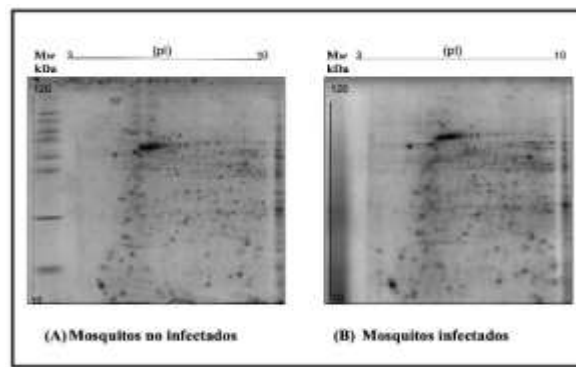


Figura 1. Perfil proteómico del cuerpo graso de *Anopheles albimanus*: A) Mosquitos no infectados, B) mosquitos infectados con *Plasmodium berghei* en geles 2D-SDS-PAGE

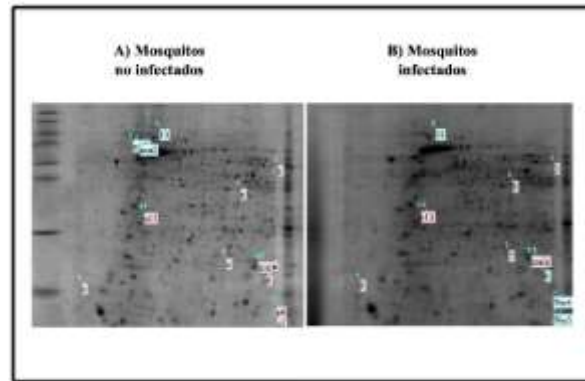


Figura 2. Perfil proteómico del cuerpo graso de *Anopheles albimanus*: A) Mosquitos no infectados, B) mosquitos infectados con *Plasmodium berghei* en geles 2D-SDS-PAGE

varias características: acceso limitado a servicios, escasa infraestructura, pobreza extrema y asentamientos de difícil acceso. Se han realizado diversas estrategias de prevención y control de esta enfermedad; sin embargo, las grandes extensiones de áreas, la resistencia tanto de los mosquitos a los insecticidas como de los parásitos a los fármacos antipalúdicos, así como la ineficacia de vacunas en humanos a pesar del enorme esfuerzo que se ha realizado en los últimos 20 años, hace urgente la necesidad de desarrollar nuevas estrategias de prevención y control (Mendis *et al.* 2001). Por lo que es fundamental conocer las moléculas que permiten el desarrollo del parásito en el mosquito vector para proponer proteínas blanco candidatas para ser modificadas mediante la transgénesis para bloquear el desarrollo del parásito (Ito *et al.*, 2002). La transmisión del paludismo humano depende del desarrollo exitoso de *Plasmodium* en los mosquitos.

importantes, incluida la digestión (Richman y Kafatos 1996), la desintoxicación y las respuestas inmunitarias (Luckhart *et al.* 1998). El intestino medio, en el caso de la infección palúdica de los mosquitos, es el primero en entrar en contacto con el parásito (Dimopoulos 2003), pero el cuerpo graso es el sitio principal de biosíntesis de péptidos inmunes. Se han identificado varias moléculas de *An. gambiae* que controlan el desarrollo de *Plasmodium* (Christophides *et al.* 2004); sin embargo, la información relacionada con las proteínas responsables de la respuesta inmune en mosquitos es limitada. Poco se sabe sobre el proteoma de *An. albimanus*, uno de los principales vectores del paludismo en México; por ejemplo, se tiene conocimiento que algunas proteínas inmunes del mosquito se sobreexpresan en el intestino durante la infección con *P. berghei* (Serrano-Pinto *et al.* 2010). La determinación de la función de estas proteínas contribuye al entendimiento de las respuestas selectivas de la inmunidad innata en este insecto. Sin embargo, para cumplir con esta meta, es indispensable identificar en otros tejidos, proteínas que permiten el desarrollo del parásito en el mosquito, para poder entender el mecanismo por el cual los mosquitos resistentes eliminan al parásito.

Objetivos

El objetivo de este estudio fue realizar un enfoque proteómico durante la interacción de *An. albimanus* - *P. berghei* para identificar moléculas en el cuerpo graso inducidas en el mosquito durante la invasión del parásito.

Materiales y Métodos

Se utilizó la técnica de electroforesis de doble dimensión (2-DE) para obtener las proteínas sintetizadas durante el reto inmune. Dentro de esta técnica, la primera dimensión o isoelectroenfoque, se llevó a cabo con la finalidad de separar las proteínas con base en su punto isoelectrónico (pI), y la segunda dimensión se realizó mediante la electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE al 12.5%, para separar las proteínas con base en su masa molecular (MW en 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).

Resultados y Discusión

Los resultados de esta investigación mostraron que después de la alimentación con sangre de ratón no

3.9-8.8 y MW 14-43 kDa] (Tabla 1). Los once puntos obtenidos en los geles, fueron cortados, digeridos con tripsina y analizados por medio de espectrometría de masas (MALDI-TOF) para la identificación de las proteínas (Fig. 2). 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. La función de las secuencias de las proteínas obtenidas, fueron comparadas contra las secuencias de proteínas de las bases de datos Swissprot, TrEMBL y Pfam. De los once puntos analizados mediante espectrometría de masas, al menos cuatro puntos correspondieron a fragmentos de proteínas relacionadas con el sistema inmune (dos fragmentos de Wingless, tipo Hdd11 y dos de Cytochrome P450). Las características de cada punto después del análisis MALDI-TOF se muestran en la Tabla 1. Según su función, estas proteínas se relacionan con el metabolismo celular, regulación de vías de señalización, desarrollo, respuesta inmune, estructural, desintoxicación y factores relacionados con los procesos de transcripción y traducción.

Conclusiones

Mediante el uso de un enfoque proteómico determinamos la presencia de las proteínas inmunes Wingless, Hdd11-like y Cytochrome P450 del cuerpo graso de mosquitos hembra infectados con el protozoario *P. berghei*. Se requiere más trabajo para caracterizar su participación específica en la respuesta inmune del mosquito y la eliminación del parásito.

Impacto Socioeconómico

Por varios años y a lo largo de todo el País, se han establecido campañas efectivas de erradicación y manejo del mosquito vector, por lo que el desarrollo de este estudio permitirá comprender las interacciones entre el mosquito vector y el parásito con la finalidad de identificar componentes clave de la respuesta inmune del mosquito que eliminen al parásito del paludismo, y con ello minimizar en lo posible el impacto negativo que se genera en el humano por esta grave enfermedad. El difundir en diversos medios de comunicación los resultados obtenidos en este estudio, servirán como base para el desarrollo de mosquitos transgénicos resistentes a la transmisión, estableciendo las bases para el desarrollo de nuevas estrategias de manejo y control, lo que permitiría disminuir los casos de infección y muerte provocados por esta grave enfermedad.

Tabla 1. Proteínas presentes y ausentes del cuerpo graso de mosquitos hembra *Anopheles albimanus* no infectados e infectados con *Plasmodium berghei*, obtenidos por espectrometría de masas

No. punto	NI	IN	pI	Mw (kDa)	Proteína	Función conocida según las bases de datos Swiss-Prot, TrEMBL y Pfam
1	+	-	4.9	27	ENSANGP00000017232	Serina tipo endopeptidasa
2	+	-	5.1	27	ENSANGP00000020171	Ribosomal
3	-	+	6.9	33	ENSANGP00000026522	Metabolismo de carbohidratos, enlaces cationes.
4	-	+	8.8	15	Wingless (Fragmento)	Respuesta inmune, desarrollo
5	-	+	8.8	14	Wingless (Fragmento)	Respuesta inmune, desarrollo
6	-	+	8.6	18	Proteína 1 inmunoinducida	Respuesta inmune, intracelular
7	-	+	5.1	15	Citocromo P450	Respuesta inmune
8	-	+	3.9	17	Troponina C 25 D	Movimiento flagelar
9	-	+	6.3	33	ENSANGP00000014982	Vincula la actividad de hierro, hidrolasa, fosfoproteína
10	-	+	5.2	43	Ubiquitina enzima de conjugación E2	Proteólisis
11	-	+	6	20	ENSANGP00000028435	Enlaces de ADN

Puntos 1 y 2: proteínas inducidos por sangre no infectada (NI). Puntos 3 a 11: proteínas inducidas por la infección por *P. berghei* (IN). En negritas se señalan las proteínas que se expresan en respuesta al reto inmune. Marcador de peso molecular (Mw), Kilo Dalton (kDa), Punto isoelectrónico (pI).

Los parásitos protozoarios superan las barreras pasivas y una respuesta inmune activa para completar su ciclo de vida dentro de los mosquitos, y solo unos pocos parásitos se desarrollan y son transmitidos por el mosquito (Dimopoulos 2003). El intestino medio y el cuerpo graso del insecto representan las principales interfaces de tejido que se ocupan de varias funciones fisiológicas

infectada e infectada con *P. berghei*, se identificaron aproximadamente 1,700 puntos de proteínas bien diferenciados (Fig. 1). Dos proteínas (puntos 1 y 2) estuvieron sobre expresadas en muestras de cuerpo graso de mosquitos alimentados con sangre normal (pI: 4.9 y 5.1; MW: 27 kDa). Otras nueve proteínas (puntos 3 a 11) estuvieron sobre expresadas en muestras de cuerpo graso de los mosquitos alimentados con sangre infectada con *P. berghei* [pI: