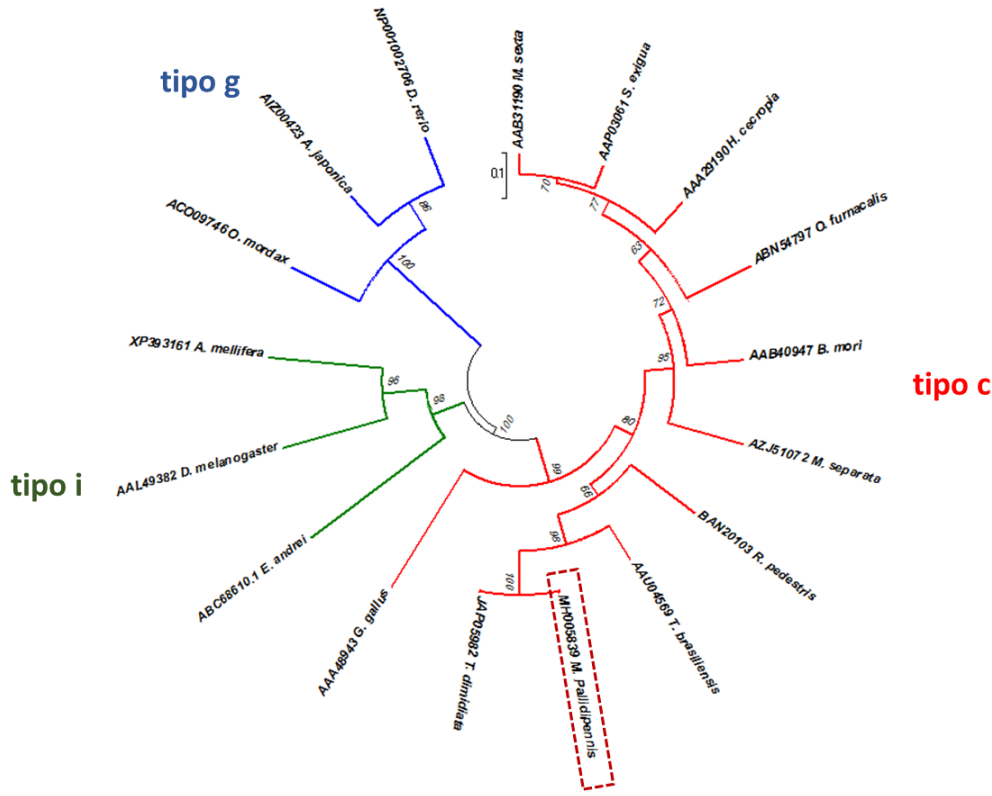








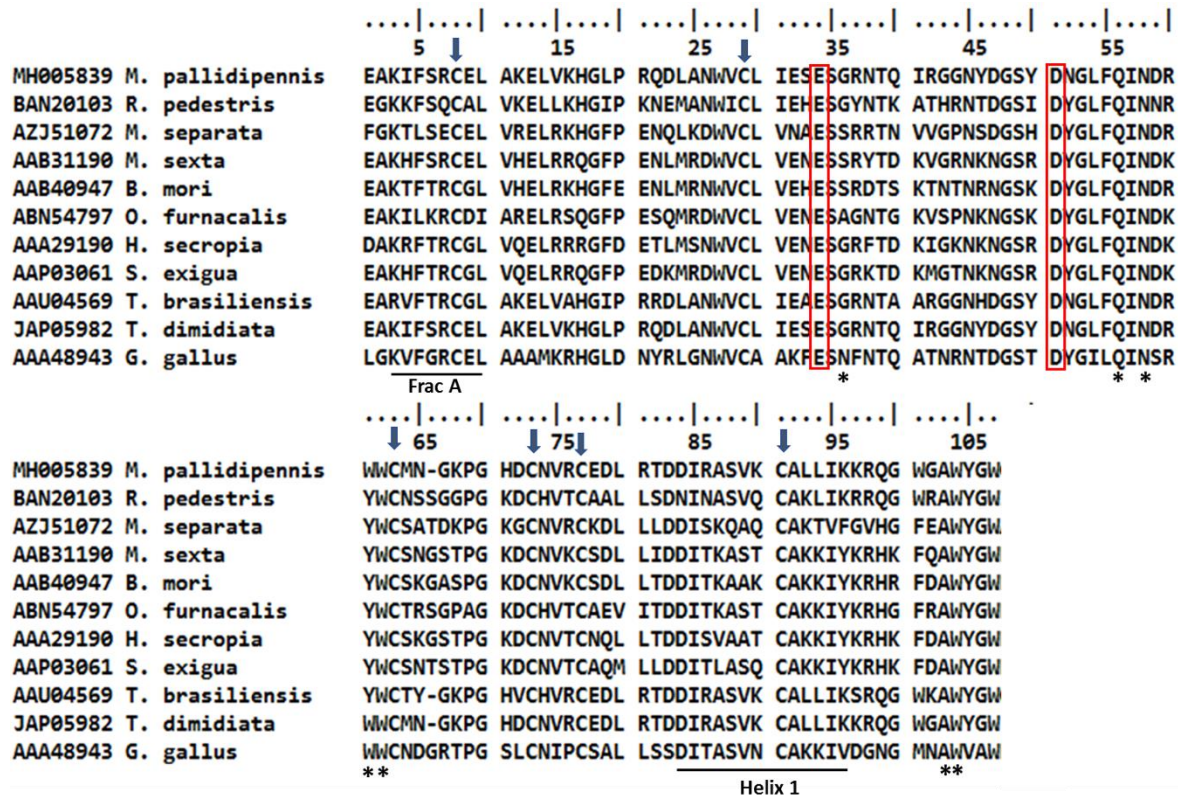
expresar más de un gen de lisozimas tipo-c (Gao *et al.*, 2012). Por lo que podría haber otros genes por describir en esta especie. Al analizar detalladamente la secuencia de aminoácidos de TpaLys y compararla con secuencias de Lisozima tipo-c descritas en otros organismos, se observó que en esta secuencia 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: TpaLys

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 TpaLys 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 TpaLys 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