

El reto inmunológico con promastigotes de *Leishmania (Viannia) panamensis* en *Galleria mellonella* modula cambios en los perfiles de expresión de proteínas de bajo peso molecular

Galleria mellonella immunological challenge with *Leishmania* promastigotes triggers changes on the profile expression of low molecular weight proteins

Isabel A. Patiño-Márquez^{1,3}, Marcela Manrique-Moreno^{1,4}, Laura Hernández-Villa^{1,5}, Blanca Ortíz-Reyes^{2,6}, Edwin Patiño-González^{1,7*}

Resumen

El parásito *Leishmania* es responsable de varias enfermedades que afectan humanos y animales en más de 95 países, incluido Colombia. Es conocida la toxicidad que presentan drogas como el Glucantime y la Anfotericina B, usadas en el tratamiento contra este parásito. Los péptidos antimicrobianos (PAMs) son considerados agentes prometedores contra un amplio espectro de enfermedades infecciosas, siendo potenciales agentes terapéuticos con una baja toxicidad. Los PAMs son parte de la respuesta inmune de insectos, de donde han sido aislados, demostrando tener actividad antibacteriana y anti-fúngica. La polilla *Galleria mellonella* expresa un amplio repertorio de péptidos como respuesta al reto con diversos organismos, lo que sugiere una alternativa para la obtención de péptidos con actividad antiparasitaria. Este estudio utilizó un reto inmunológico con promastigotes de *Leishmania (Viannia) panamensis* sobre larvas de *Galleria mellonella* para la búsqueda de fracciones peptídicas con actividad antiparasitaria. La hemolinfa fue obtenida de larvas control, inoculadas con PBS y retadas con parásitos. La hemolinfa libre de hemocitos de cada tratamiento fue analizada por electroforesis de dos dimensiones (gel 2D). Además, la hemolinfa fue fraccionada por RP-HPLC. El análisis del gel 2D identificó cuatro señales (manchas) en la hemolinfa retada y 3 señales en la hemolinfa con PBS. Estas señales no se encontraron en la hemolinfa control. Por otro lado, fracciones de RP-HPLC de la hemolinfa retada mostraron más actividad leishmanicida en comparación con las mismas fracciones de la hemolinfa control. Esta aproximación puede proveer nuevos péptidos contra *Leishmania*.

Palabras claves: Hemolinfa, electroforesis 2D, *G. mellonella*, *Leishmania*, PAMs, Perfiles proteicos

Abstract

The *Leishmania* parasite is responsible for several diseases that affect humans and animals in more than 95 countries including Colombia. Despite the known toxicity shown by current drugs such as Glucantime or Amphotericin B, they are still used as treatments against the parasite. Natural antimicrobial peptides (AMPs) are considered promising agents for use against a broad spectrum of infectious diseases, they are considered promising and non-toxic therapeutic agents. AMPs are part of the immune response of organisms such as insects, from where they have been isolated and shown to have antibacterial and antifungal activity. *Galleria mellonella* moths express a broad repertoire of peptides in response to challenges with different organisms. This suggests an alternative for obtaining peptides with anti-parasitic activity. This study was based on the immunological challenge induced in *Galleria mellonella* larvae with *Leishmania (viannia) panamensis* promastigotes, with the goal of isolating a peptide fraction with antiparasitic activity. Non-challenged hemolymph and hemolymph obtained from the immunization with PBS and parasites were compared. Free hemocyte hemolymph from each treatment was analyzed by two-dimensional electrophoresis (2D gel). Furthermore, hemolymphs were fractionated by RP-HPLC. 2D gel analysis identified 4 spots in challenged hemolymph and 3 spots in PBS hemolymph. These spots were not present in the control hemolymph. On the other hand, fractions from RP-HPLC of challenged hemolymph showed more antileishmania activity in comparison to the same fractions from the hemolymph control. This study may provide the basis for new antileishmanial peptides.

Key words: Hemolymph, 2D Electrophoresis, *G. mellonella*, *Leishmania*, AMPs, Protein profiles

Recibido: octubre de 2016; aceptado: agosto de 2017.

¹Grupo de Bioquímica Estructural de Macromoléculas, Universidad de Antioquia, Medellín (Antioquia) Colombia.

²Grupo de Inmunología Celular e Inmunogenética, Universidad de Antioquia, Medellín (Antioquia) Colombia.

Correos electrónicos: ³ <izabelandrea08@gmail.com>, ⁴ <marcela.manrique@udea.edu.co>, ⁵ <lauracaroh@gmail.com>

⁶ <blanca.ortiz@udea.edu.co>, ⁷ <edwin.patino@udea.edu.co>.

*Autor para correspondencia

INTRODUCCIÓN

Leishmania (Viannia) panamensis es un parásito protozoo que causa la enfermedad conocida como Leishmaniosis. Estos parásitos son transmitidos en América por la picadura de un flebótomo hembra del género *Lutzomya* (Lewis 1971, Rogers et al. 2004). Existen tres formas clínicas de la enfermedad, la Leishmaniosis cutánea (LC) que causa lesiones en la piel; la Leishmaniosis mucocutánea (LMC) que afecta las mucosas y por último la Leishmaniosis visceral (LV), que se presenta en órganos internos como el bazo y el hígado (WHO 2016). La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera la Leishmaniosis como una de las enfermedades olvidadas y hasta el momento no se cuenta con una vacuna que posibilite la prevención de la enfermedad (de Vries et al. 2015, WHO 2016).

Los principales fármacos utilizados en el tratamiento de la enfermedad son los antimoniales pentavalentes, el Isetionato de pentamida, la Mitelfosina y la Anfotericina B (Blum et al. 2004, Sundar y Chakravarty 2010, Wortmann et al. 2010); aunque estos han mostrado ser efectivos contra las tres formas de la enfermedad, presentan una alta toxicidad (Olliaro y Bryceson 1993, Sundar y Chakravarty 2010). Los tratamientos para la Leishmaniosis están acompañados de daño hepático y afecciones cardíacas debido a los periodos prolongados de tratamiento (Frézard et al. 2009), lo que conduce a la suspensión del tratamiento por los pacientes. Para ofrecer una futura posibilidad de tratamiento son necesarios nuevos candidatos en drogas leishmanicidas.

Las moléculas responsables de la defensa en muchos organismos podrían representar un buen recurso para identificar nuevas drogas contra la Leishmaniosis. Una de las alternativas más promisorias son los péptidos antimicrobianos (PAMs), moléculas utilizadas en la defensa inmune en muchos organismos, caracterizados por tener un amplio espectro de actividad, baja generación de resistencia y baja toxicidad en células humanas (Brogden et al. 2003, Zhao et al. 2013). Algunos PAMs como la Daptomicina y Vancomicina han demostrado ser efectivos contra cepas resistentes a antibióticos convencionales (Hancock y Sahl 2006). En insectos, los PAMs hacen parte de la respuesta inmune humoral, y son sintetizados principalmente en células del cuerpo graso y hemocitos (Bulet et al. 2003), para luego ser secretados a la hemolinfa, que es equivalente a la sangre en los humanos (Wyatt 1961). Los péptidos liberados en la hemolinfa generan una respuesta sistémica que lleva al ataque directo de los PAMs hacia la membrana del microorganismo invasor, permeabilizándola y produciendo por último la muerte del agente agresor (Yeaman y Yount 2003). Para buscar posibles moléculas candidatas contra la Leishmaniosis, se utilizó como modelo biológico la polilla *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae). Este organismo ha sido utilizado en diferentes estudios para evaluar la producción de PAMs, luego del reto con diferentes microorganismos (Andrejko et al. 2009, Mak et al. 2010). Uno de los péptidos identificados en *G. mellonella*, la Cecropina D, demostró tener un amplio espectro de actividad contra el hongo *Aspergillus niger*, bacterias Gram-negativas como *Escherichia coli* D31 y bacterias Gram-positivas como *Micrococcus luteus* (Cytrynska et al. 2007). Otros péptidos

identificados en *G. mellonella* pertenecen a la familia de las Moricinas las cuales presentan actividad anti-fúngica (Brown et al. 2008). Estas investigaciones revelan el potencial del uso de *G. mellonella* como modelo biológico para la obtención de péptidos con posible actividad leishmanicida. El objetivo de este trabajo fue evaluar la expresión diferencial de proteínas de bajo peso molecular, entre las cuales se encuentran los péptidos antimicrobianos presentes en la hemolinfa de larvas de *G. mellonella*, inducidos como respuesta al reto inmunológico con promastigotes de *Leishmania (Viannia) panamensis*. Para cumplir este objetivo se realizó un proceso de extracción de proteínas de bajo peso molecular; posteriormente, las proteínas fueron separadas por electroforesis bidimensional (electroforesis 2D), comparando las hemolinfas de larvas retadas y no retadas con parásitos. El análisis de los resultados permitió identificar diferencias entre los perfiles de proteínas de hemolinfa sin reto y con reto, sugiriendo que la inoculación de las larvas de *G. mellonella* con promastigotes de *L. (V) panamensis* indujo la expresión de péptidos capaces de disminuir la proliferación del parásito.

MATERIALES Y METODOS

Obtención de larvas de *G. mellonella*. Las larvas de *G. mellonella* fueron criadas en recipientes acrílicos bajo una dieta artificial compuesta por 13% de harina de maíz amarillo, 13% de leche en polvo, 6% de germen de trigo, 6% de levadura de cerveza, 25% de salvado de trigo, 20% de glicerol, 13% de miel de abejas y 4% de cera de abejas. Las larvas fueron mantenidas en la oscuridad a 28 °C. Para los ensayos se seleccionaron larvas en el último estadio de desarrollo (18 días y 300 mg de peso).

Parásitos de *L. (V) panamensis*. Se utilizaron cultivos de *L. (V) panamensis* en el estadio de promastigotes (cepa UA946, Grupo de Inmunomodulación, Universidad de Antioquia). Los promastigotes fueron cultivados en medio Schneider a un pH 6,9 (SIM, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). El medio fue suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% (GIBCO, Grand Island, NY, USA), penicilina a 100 U/mL y estreptomycin 100 µg/mL (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). Los parásitos fueron incubados 26 °C por 5 días (en fase estacionaria de crecimiento). Los cultivos se centrifugaron a 2.500 rpm a temperatura ambiente por 10 min. El botón de parásitos fue lavado dos veces con tampón PBS 1X (GIBCO, Grand Island, NY, USA), luego la concentración de parásitos fue ajustada haciendo conteo por cámara de Neubauer de acuerdo con lo requerido para cada uno de los experimentos.

Reto inmunológico y recolección de la hemolinfa. Para la inmunización de las larvas y posterior recolección de la hemolinfa, se emplearon tres grupos: larvas sin reto, larvas inoculadas con PBS y larvas retadas con parásitos de *L. (V) panamensis*, utilizando 100 larvas para cada grupo. La suspensión de promastigotes de *L. (V) panamensis* fue ajustada a tres diferentes concentraciones (1x10⁶, 1x10⁷ y 1x10⁸ parásitos/mL) en tampón PBS 1X (GIBCO, Grand Island, NY, USA). Cada larva de *G. mellonella* fue inyectada directamente en el hemocele con 20 µl de la suspensión de parásitos ajustada a las concentraciones

anteriormente mencionadas. Como controles se utilizaron larvas que fueron inoculadas con 20 μ l de tampón PBS al 1X (GIBCO, Grand Island, NY, USA) y larvas que no fueron inoculadas. Seguido a la inoculación, las larvas fueron incubadas a 28 °C dentro de cajas de Petri estériles en condiciones de oscuridad. La recolección de hemolinfa se realizó a las 24, 48 y 72 horas post-inyección. En la recolección de la hemolinfa las larvas fueron puestas sobre hielo por 15 min y la superficie del abdomen larval fue desinfectada con etanol al 70%. La hemolinfa fue obtenida por punción con una aguja estéril en el abdomen en el último segmento de la larva. La hemolinfa que fluía fue recolectada en un tubo Eppendorf que contenía cristales de feniltiourea (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) para prevenir la melanización. La hemolinfa colectada se centrifugó a 13000 rpm por 15 min a 4 °C. El sobrenadante fue colectado y la hemolinfa libre de hemocitos fue guardada a -20 °C hasta su uso.

Obtención de péptidos de bajo peso molecular. Los péptidos de bajo peso molecular fueron obtenidos a través de la extracción ácido-metanólica de las proteínas presentes en las muestras de hemolinfa colectada de acuerdo con el método de Schoofs et al. (1990). Se tomaron 100 μ l de hemolinfa que fueron diluidos en 10 volúmenes de solución metanol: ácido acético: agua (90: 1: 9, v/v/v). Luego la mezcla se centrifugó a 13.000 rpm por 30 min a 4 °C. El precipitado fue descartado y el sobrenadante fue colectado y liofilizado. El liofilizado se disolvió en solución acuosa de ácido trifluoroacético al 0,1%. Posteriormente, para remover los lípidos presentes en la muestra se adicionó un volumen igual de hexano; las muestras se agitaron con vórtex y se centrifugaron nuevamente a 13.000 rpm por 10 min a 4 °C. La fracción superior que contiene los lípidos fue removida y se adicionó un volumen igual de acetato de etilo a la fracción acuosa que contenía las proteínas. Se centrifugó nuevamente a 13.000 rpm por 5 min y la fracción acuosa fue recuperada, liofilizada y almacenada a -20 °C hasta su uso. Para la cuantificación de proteínas se utilizó el método del ácido bicinonínico (Bicinchoninic Acid Kit, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). Se realizó la cuantificación de proteínas totales presentes en la hemolinfa libre de hemocitos y proteínas totales presentes en los extractos ácido-metanólicos. La hemolinfa y las fracciones se visualizaron por SDS-PAGE en una cámara MiniProtean III (Bio-Rad, California, USA). Los geles fueron revelados con azul de Coomassie o con tinción de plata.

Electroforesis en dos dimensiones. Los extractos de hemolinfa (200 μ g de proteína total) fueron mezclados con tampón desnaturante (Urea/Tiourea 7 M/2 M, CHAPS al 4% (V/V), DTT al 100 mM y anfolitos en un rango de pH 4–7, Invitrogen, California, USA) para un volumen final de 200 μ l. Las muestras fueron agitadas y colocadas en un baño de ultrasonido 5 veces cada 120 min (Elmasonic, Singen, Baden-Wurtemberg, Alemania). Luego, de cada muestra se cargaron 190 μ l en las tirillas (Isoelectric Point Gel, IPG de 7 mm y pH 4–7, Invitrogen, Carlsbad, California, USA). Para el análisis por isoelectroenfoque (IEF), se utilizó un gradiente de voltaje de 220 V hasta 2000 V, siguiendo las recomendaciones del fabricante (ZOOM, IPG Runner, Invitrogen, Carlsbad, California, USA). Para la segunda dimensión la tirilla de IPG se equilibró en tampón LDS (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) por 15 min,

luego la tirilla se equilibró 15 min con yodo acetamida a 100 mM en tampón LDS. Después, la tirilla se colocó en un gel preformado (gel NuPAGE del 4–12%, Invitrogen, Carlsbad, California, USA) y el corrido se realizó 200 V con tampón de 50 mM MES y SDS 1X por 45 min en cámara de Xcell (XCell Sure lokc, Invitrogen, Carlsbad, California, USA). Para visualización de las proteínas (manchas) los geles fueron teñidos con plata utilizando el estuche de Invitrogen (SilverQuest Staining kit, Invitrogen, Carlsbad, California, USA) siguiendo las indicaciones del fabricante. Todos los geles fueron digitalizados por medio de un escáner (Image Scanner A3 10000 XL, Epson, Japón) y analizados con el programa Image Master Platinum 7 (GE Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom).

Fraccionamiento de los extractos ácido-metanólicos por RP-HPLC. Los extractos ácido-metanólicos fueron separados por cromatografía líquida en fase reversa (RP-HPLC) utilizando la columna Discovery C-18 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) y el equipo de cromatografía NGC (Bio-Rad, California, USA). La columna fue equilibrada con solución tampón A (Solución acuosa de TFA al 0,07%). Por cada corrido cromatográfico, la columna fue cargada con 600 μ g de muestra. Para la elución se utilizó un gradiente de 0–100% de tampón B (TFA al 0,07% - Acetonitrilo al 80%) con una velocidad de flujo de 1 mL/min por 45 min. Las fracciones fueron monitoreadas a 215 y 280 nm y almacenadas usando el colector de fracciones BioFract (Bio-Rad, California, USA).

Actividad antiparasitaria de las fracciones peptídicas. La actividad antiparasitaria de las fracciones obtenidas por cromatografía se evaluó en cultivos de promastigotes de *L. (V) panamensis* utilizando el método colorimétrico MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol (MTT) (Invitrogen, Carlsbad, California, USA)). Los parásitos (2 x 10⁷ parásitos /mL) (Chicharro et al. 2001, Díaz-Achirica et al. 1998) fueron incubados por 24 horas a 26 °C con una concentración final de 20 μ g/mL de cada fracción; como control negativo se incubaron los parásitos con PBS y como control positivo se utilizó Anfotericina B (3 μ g/mL) (Amresco, Solon, Ohio, USA). Los experimentos se hicieron por triplicado. La actividad antiparasitaria se determinó por la reducción de formazán. Los datos fueron analizados con el programa GraphPad Prism 5.01, realizando un análisis de varianza (ANOVA de una vía) y una prueba T-Student con un p<0,05.

RESULTADOS

Efecto del reto inmunológico en larvas de *G. mellonella* con promastigotes de *L. (V) panamensis*. Las larvas empleadas para el reto inmunológico se seleccionaron de acuerdo con los criterios de peso (300 mg) y adicionalmente, la presencia de una coloración totalmente amarilla en la cutícula. En la figura 1A se muestran las larvas inoculadas con PBS, utilizadas como control de la lesión generada por la inyección. Asimismo, se muestran las larvas inoculadas con la suspensión de parásitos de *L. (V) panamensis* a las tres diferentes concentraciones empleadas (figura 1B, C y D). Después del reto con *Leishmania*, se realizó el seguimiento de las larvas control y retadas, con el fin de determinar cambios en la coloración de la cutícula o mortalidad generada

por la inyección. Asimismo, se muestran las larvas inoculadas con la suspensión de parásitos de *L. (V) panamensis* a las tres diferentes concentraciones empleadas (figura 1B, C y D). Después del reto con *Leishmania*, se realizó el seguimiento de las larvas control y retadas, con el fin de determinar cambios en la coloración de la cutícula o mortalidad generada por la inoculación de los parásitos. De acuerdo con lo observado se determinó que la inoculación de promastigotes de *Leishmania* no indujo cambios de coloración (melanización) en las larvas, al comparar con

las larvas control (figura 1A). Adicionalmente, se observó que el reto con *Leishmania* no generó muerte de las larvas retadas con ninguna de las concentraciones de promastigotes inoculada. La hemolinfa se colectó en tres tiempos diferentes 24, 48 y 72 horas luego del reto. De cada larva se obtuvo, aproximadamente, entre 10–15 μ l de hemolinfa. En conclusión, no se observó retraso en el desarrollo del tiempo del ciclo de pupa hasta llegar adulto con ninguna de las concentraciones usadas y las dosis no alteraron la cantidad de hemolinfa por larva.

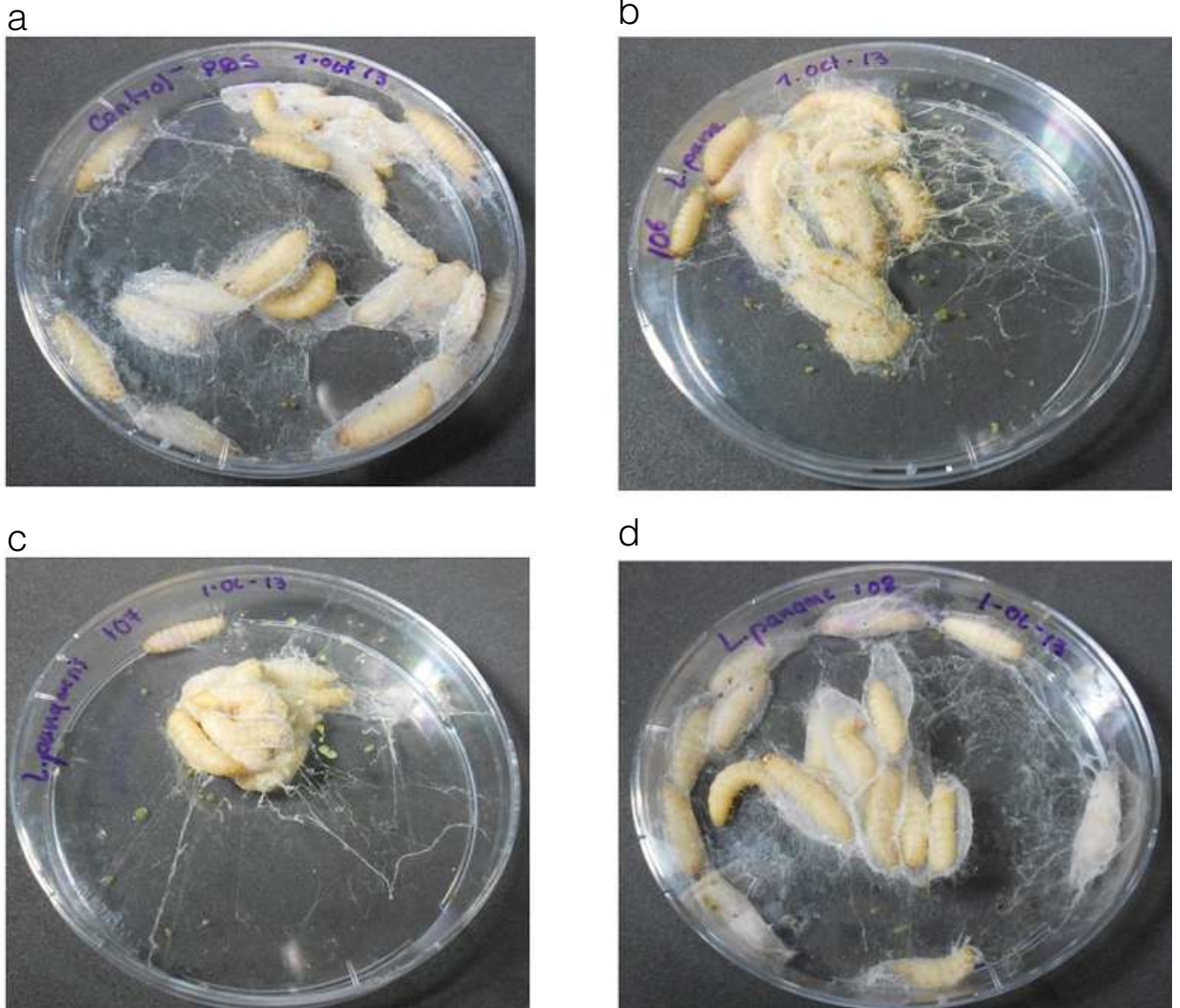


Figura 1. Apariencia de las larvas de *G. mellonella*. **A.** Larvas control PBS. **B.** Larvas retadas con 1×10^6 parásitos/mL. **C.** Larvas retadas con 1×10^7 parásitos/mL. **D.** Larvas retadas con 1×10^8 parásitos/mL.

Extracción de los péptidos de bajo peso molecular. Las proteínas presentes en la hemolinfa total y extractos ácido-metanólicos fueron analizadas por SDS-PAGE (figura 2). Los resultados muestran perfiles electroforéticos iguales en la hemolinfa sin reto, con PBS o retadas con promastigotes de *L. (V) panamensis* (figura 2A). La eliminación de los lípidos por medio de la extracción ácido-metanólica también eliminó las proteínas de peso molecular por encima de 27 kDa (figura 2B). Aunque los perfiles obtenidos de la hemolinfa después de extraer los lípidos son muy similares, se puede observar una señal tenue entre las bandas de 3,5 y 6,5 kDa presente solo en las larvas que recibieron la punción, como son las larvas inoculadas con PBS y las que fueron inoculadas con el parásito (figura 2A). Para determinar si la dosis de parásitos inoculados modula positivamente la producción de péptidos de bajo

peso molecular, los extractos libres de lípidos de las hemolinfas de las larvas que fueron tratadas con 1×10^6 , 1×10^7 y 1×10^8 parásitos/mL de inóculo, fueron analizadas por SDS-PAGE teñido con plata (figura 3). La eliminación de las proteínas de alto peso molecular, así como de los lípidos resulta en perfiles proteicos similares para las tres dosis utilizadas. Sin embargo, cuando las larvas se inocularon con 1×10^6 parásitos/mL se favorece la inducción de péptidos por debajo de la banda de 6,5 kDa a las 48 y 72 horas (figura 3, carril 6 y 10). De acuerdo con estos resultados se determinó que la concentración óptima con la cual se produjo un aumento en la expresión de proteínas fue 1×10^6 parásitos/mL a un tiempo de 48 horas para generar la inducción en la expresión de proteínas de bajo peso molecular.

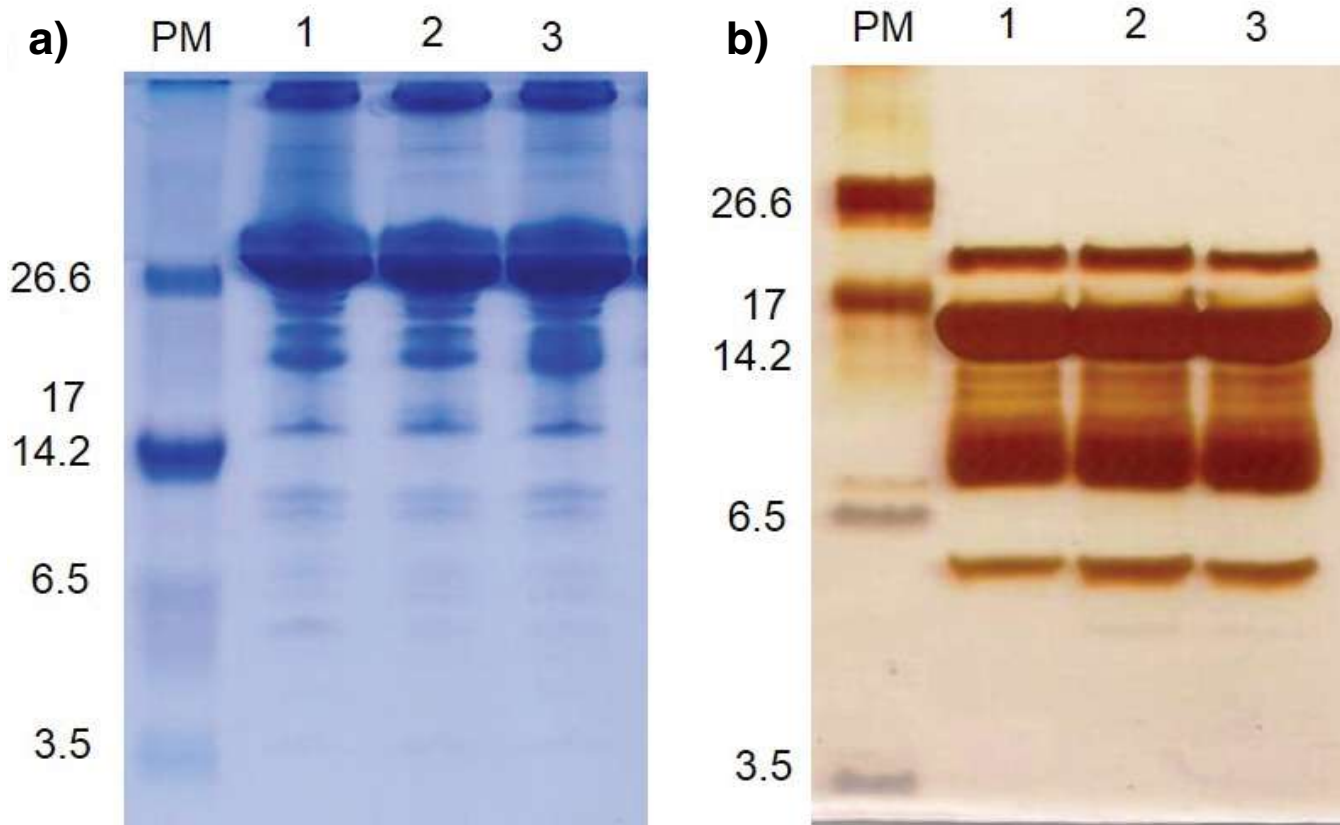


Figura 2. Perfiles SDS-PAGE de hemolinfa total y hemolinfa libre de lípidos. Carril 1 hemolinfa sin reto. Carril 2 hemolinfa de larvas inoculadas con PBS. Carril 3 larvas retadas con promastigotes de *L. (V) panamensis*. A. Hemolinfa total. B. Extractos ácido-metanólicos de hemolinfa.

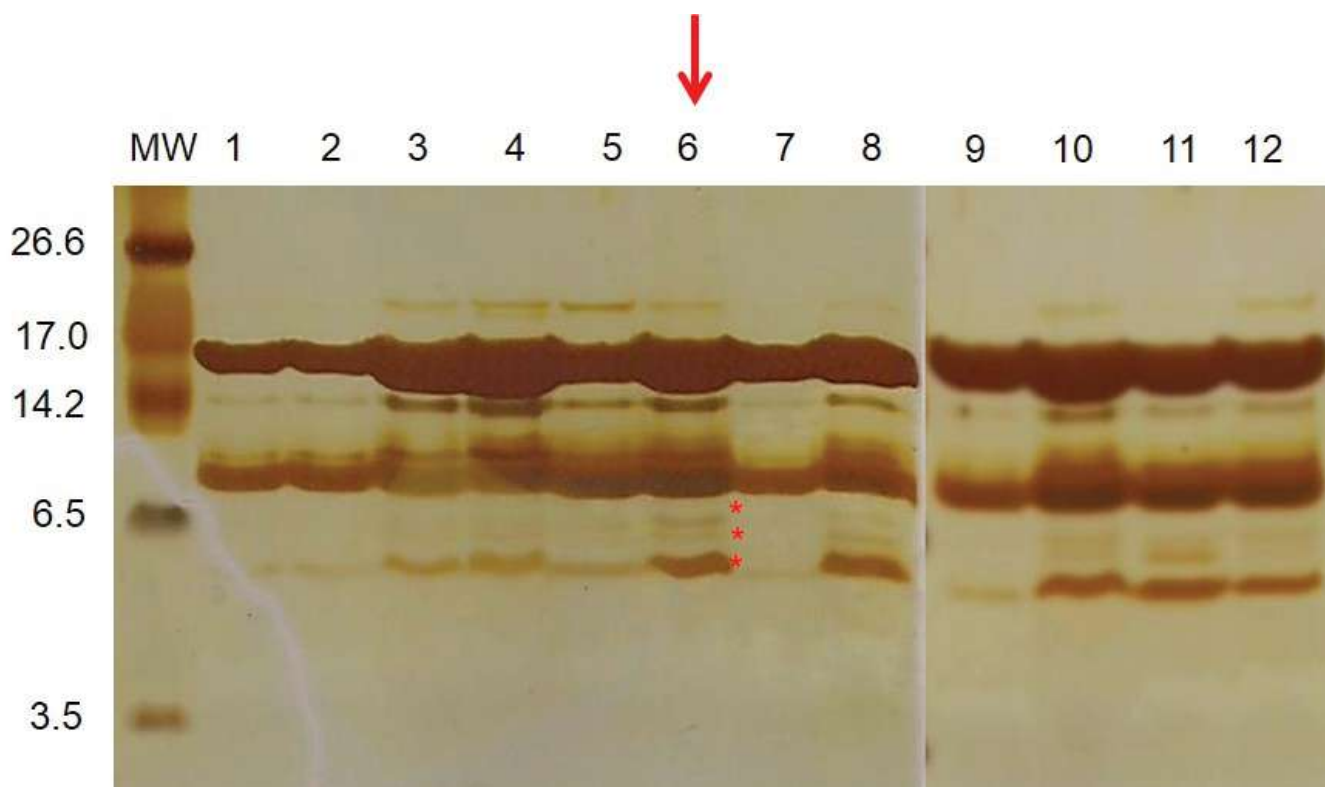


Figura 3. Perfiles electroforéticos de extractos ácido-metanólicos de hemolinfa de *G. mellonella* recolectada en diferentes tiempos. La hemolinfa fue colectada después de la inoculación de las larvas a tres diferentes tiempos: 24 horas (carriles de 2-4), 48 horas (carriles 5-8) y 72 horas (carriles 9-12). Para cada intervalo se utilizó un inoculo de 1×10^6 , 1×10^7 y 1×10^8 parásitos/mL. Carril 1, control 24 h; carril 2, 1×10^6 -24 h; carril 3, 1×10^7 -24 h; carril 4, 1×10^8 -24 h; carril 5, control 48 h; carril 6, 1×10^6 -48 h; carril 7, 1×10^7 -48 h; carril 8, 1×10^8 -48 h; carril 9, control 72 h; carril 10, 1×10^6 -72 h; carril 11, 1×10^7 -72 h; carril 12, 1×10^8 -72 h. Los asteriscos indican las bandas de bajo peso molecular.

Análisis 2D de los extractos de proteínas de bajo peso molecular. Los extractos ácido-metanólicos que contienen los péptidos de bajo peso molecular fueron sometidos a una electroforesis bidimensional (2D electroforesis). Al final, los geles se tiñeron con plata y se visualizaron varias señales (manchas) que demuestran la presencia de péptidos de bajo peso molecular en estos extractos (figura 4). Después de la digitalización de las imágenes, los geles (no retadas, PBS y retadas) fueron alineados y se establecieron los parámetros para la detección de las señales reales, la no superposición de las señales y los límites reales de cada señal de acuerdo con el programa Image Master (General Electric, Little Chalfont, United Kingdom). El número total de señales (manchas) identificados en los geles de la hemolinfa sin reto fue 61, en la hemolinfa control con PBS fue 65 y en la hemolinfa retada fue 66. Los resultados muestran que la punción en el abdomen de la larva tuvo un incremento en el número de señales detectadas por el programa Image Master Platinum. Además, se presentaron señales comunes en ambas hemolinfas como las manchas 39, 55 y 59 (figura 4B y C). El análisis también reveló la presencia de señales que estuvieron solo

en la hemolinfa retada (manchas 46, 49, 50 y 92) (figura 4C).

Actividad antiparasitaria de las fracciones de hemolinfa. Los extractos de hemolinfa control de larvas inoculadas con PBS y larvas retadas se fraccionaron por cromatografía en fase reversa utilizando una columna C-18; las fracciones obtenidas se liofilizaron y se evaluó la actividad antiparasitaria usando el método colorimétrico de MTT, donde la no reducción del formazán determina el porcentaje de parásitos muertos. De las fracciones obtenidas, cuatro correspondientes a hemolinfa retada presentaron más del 40% en la mortalidad de los parásitos (figura 5, barras rojas). La fracción 1 presentó la mayor actividad leishmanicida generando $62,2 \pm 3,7\%$ de parásitos muertos seguida por la fracción 4 con $56,25 \pm 4,6\%$, la fracción 3 con $47,17 \pm 3,04\%$ y la fracción 2 con $41,9\% \pm 2,7\%$. El análisis estadístico (ANOVA, con un nivel de significancia de $p < 0,05$) indicó diferencias significativas de las cuatro fracciones evaluadas respecto al control (parásitos con PBS), obteniendo un $p < 0,001$. Adicionalmente, al comparar entre fracciones de hemolinfa sin reto (figura 5, barras azules) y las fracciones de hemolinfa retada (figura 5, barras rojas)

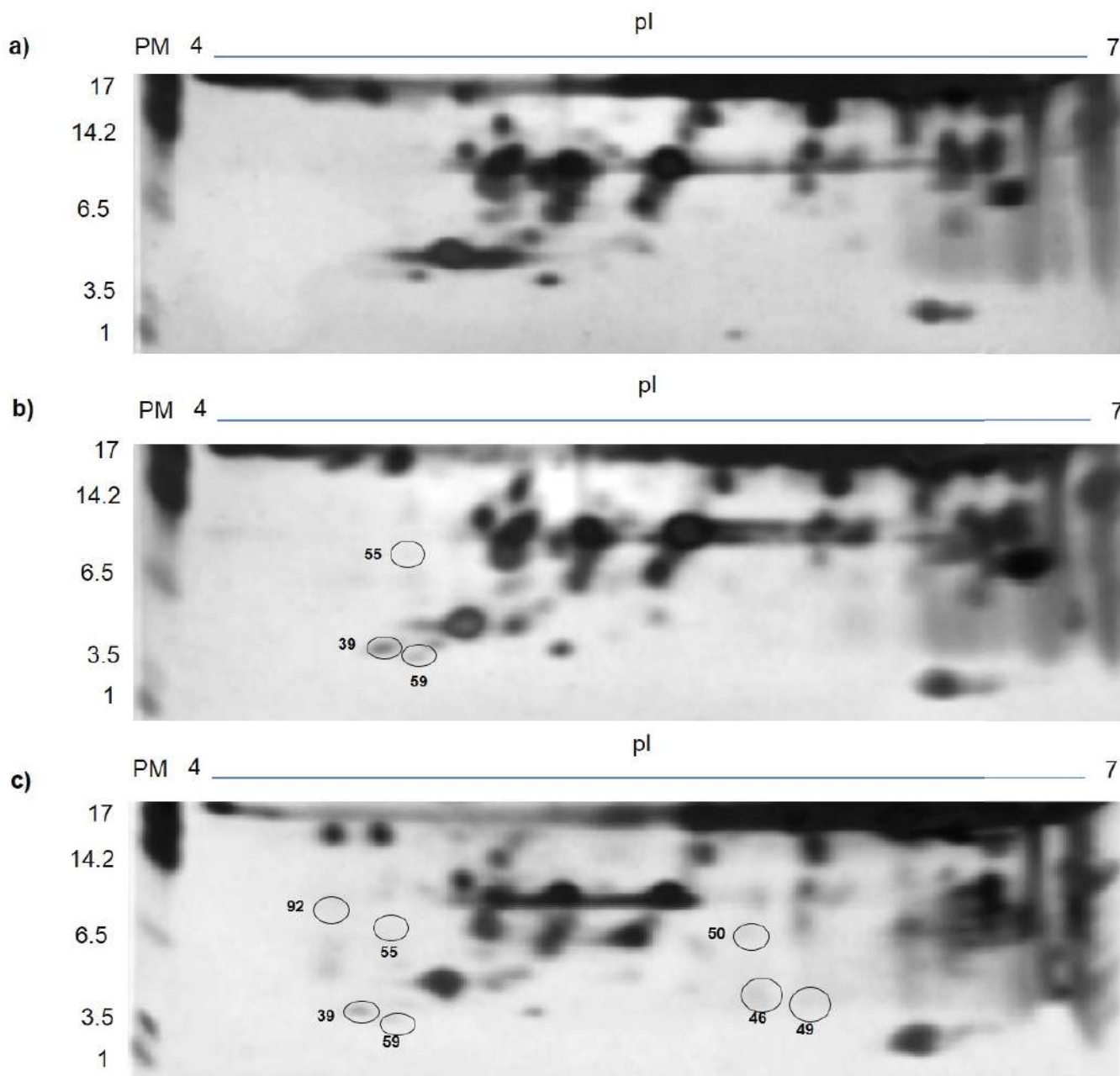


Figura 4. Análisis de electroforesis 2D de la hemolinfa de larvas de *G. mellonella* sin reto, PBS y retada con *L. (V) panamensis*. A. Hemolinfa sin reto. B. Hemolinfa de larvas inoculadas con tampón PBS. C. Hemolinfa de larvas retadas con *L. (V) panamensis* (1×10^6 parásitos/mL). Los números indican las señales (manchas) diferenciales que no están en control sin reto (círculos negros).

con la prueba T-Student ($p < 0,05$), se encontraron diferencias significativas entre la fracción 1, 3 y 4 ($p = 0,034$, $p = 0,0081$ y $p = 0,0177$, respectivamente). Entre las fracciones 2 no se obtu-

vieron diferencias ($p = 0,644$) (figura 5). Estos datos sugieren un aumento de la actividad leishmanicida en tres de las fracciones de hemolinfa obtenidas después del reto con los promastigotes.

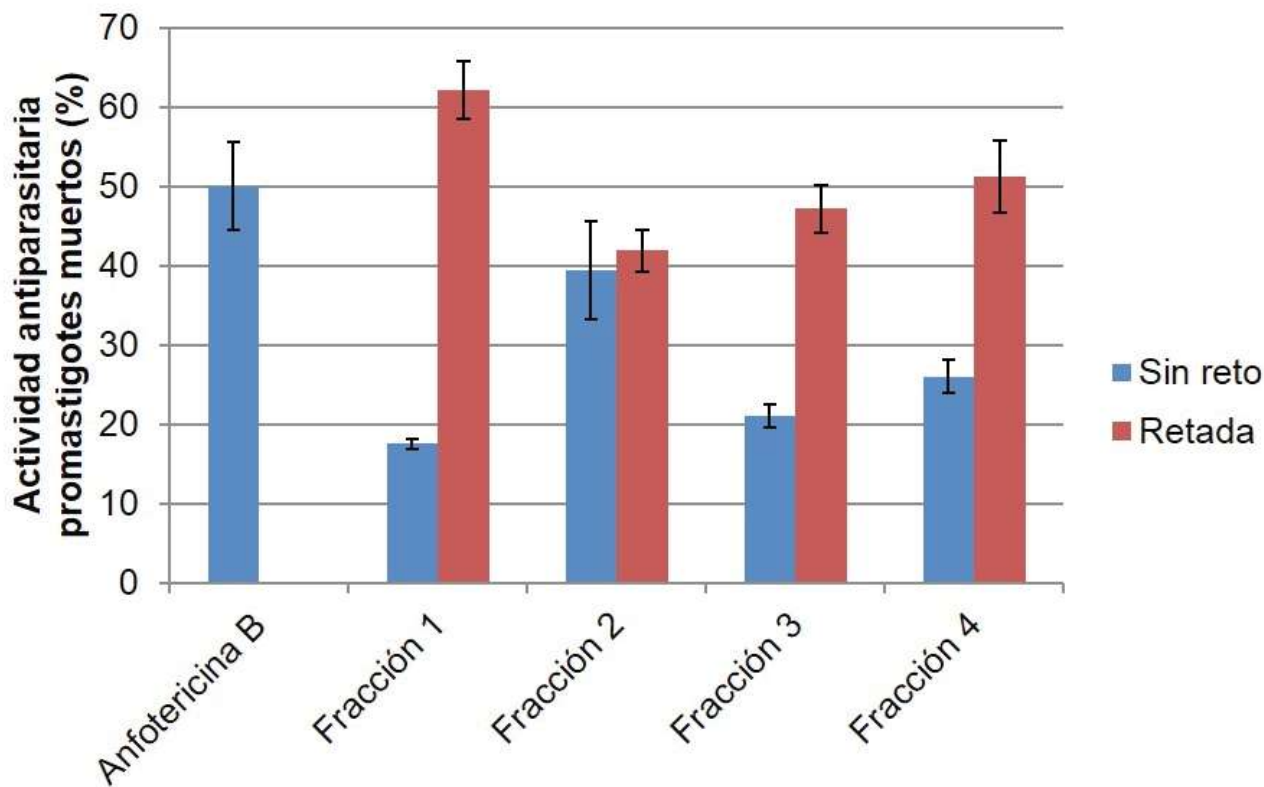


Figura 5. Actividad leishmanicida de fracciones de RP-HPLC de hemolinfas no retada (PBS) y retada con *L. (V) panamensis*. Control positivo: Anfotericina B (3 µg/mL). Las barras verticales representan las desviaciones estándar.

DISCUSIÓN

La respuesta inmune innata de insectos como *G. mellonella* hacia los microorganismos invasores está mediada por una batería de proteínas y péptidos antimicrobianos (Bergin et al. 2006, Cook y McArthur 2013). Estas moléculas son constituyentes de la hemolinfas del insecto, que es el equivalente a la sangre de los mamíferos (Wyatt 1961). Muchos estudios han registrado la inducción de PAMs luego de infectar las larvas de *G. mellonella* con diferentes microorganismos como *E. coli* y *M. luteus* (Brown et al. 2009, Cytrynska et al. 2007, Mak et al. 2010). Adicionalmente, en larvas que fueron inmunizadas con el hongo *Beauveria bassiana*, la hemolinfas presentó una respuesta anti-fúngica, pero no una respuesta antibacteriana (Wojda et al. 2009). Estos estudios han concluido que en *G. mellonella* se da una expresión diferencial e inducible de PAMs, que depende del tipo de patógeno usado para la inmunización.

En esta investigación, el primer paso fue determinar el inóculo y el tiempo al cual se daba una inducción de péptidos de bajo peso molecular en la hemolinfas de las larvas inoculadas con promastigotes de *L. (V) panamensis*. Luego de la inoculación, no se pre-

sentó mortalidad como causa del reto inmunológico con ninguna de las tres concentraciones evaluadas; con estos resultados se observó que hasta con la concentración más alta evaluada (1×10^8 promastigotes/ml) las larvas de *G. mellonella* son capaces de sobrevivir al reto con este parásito por 72 horas, que fue el tiempo máximo evaluado. Posteriormente, se determinó que a las 48 horas pos-infección y con un inóculo 1×10^6 promastigotes/ml, se presentó un aumento en las proteínas de bajo peso molecular (figura 3). Con los resultados de SDS-PAGE se observó un cambio en la abundancia de las proteínas por debajo de los 6 kDa (figura 2B y figura 3, carril 6 y 10). Estos resultados muestran que hay una inducción de péptidos a diferentes intervalos de tiempo durante el curso de la infección con los promastigotes. Esto datos están en concordancia con lo publicado en el año 2010 por Mak y colaboradores, quienes reportaron un aumento en algunos péptidos como Cecropina y Defensina en *G. mellonella* a las 24 horas luego del reto con *E. coli*. Además, demostraron que al inyectar las larvas con otro microorganismo como *Fusarium oxysporum* se daba la mayor expresión de estos mismos péptidos, pero 72 horas pos-inoculación (Mak et al. 2010). El análisis 2D se centró en encontrar las posibles diferencias de las hemolinfas. El análisis de los perfiles proteicos mostró cuatro nuevas señales (manchas)

(figura 4) presentes únicamente en la hemolinfa de larvas inoculadas con parásitos, indicando una posible inducción de péptidos como consecuencia del reto. Por otro lado, tres señales (figura 4) se identificaron en las hemolinfas de las larvas que recibieron la punción para inocular los promastigotes o por la inyección del PBS. La punción en el abdomen de las larvas genera un trauma a nivel celular en donde la barrera tegumentaria es parcialmente interrumpida. Se ha registrado que los eventos de trauma generados en las larvas de insecto inducen la producción de PAMs como las Cecropinas y Defensina (Brey et al. 1993, Hoffmann y Hetru 1992). Adicionalmente, cuando la hemolinfa fue fraccionada por RP-HPLC, se obtuvieron fracciones que presentaron actividad antiparasitaria, generando más de un 40% de mortalidad de los parásitos con las fracciones de hemolinfa retada. Las fracciones 1, 3 y 4 (figura 5) presentaron diferencias significativas al ser comparadas con las mismas fracciones obtenidas de hemolinfa control sin reto, pero inyectadas con PBS; este aumento en la actividad leishmanicida puede deberse a la inducción de proteínas o péptidos que fueron inducidos por el reto inmunológico y no por el trauma causado en la larva. La inducción de PAMs en insectos en presencia de parásitos de *Leishmania* ha sido registrada en *Phlebotomus duboscqi* (Boulanger et al. 2004). Estos resultados demuestran que el reto con promastigotes de *L. (V) panamensis* indujo la expresión de cuatro señales solo en las larvas que fueron retadas (geles 2D) con el parásito y que la hemolinfa posee actividad leishmanicida. Sin embargo, se necesita una posterior caracterización para identificar las proteínas encontradas y los genes expresados y responsables de esta actividad antiparasitaria. Con los resultados obtenidos en esta investigación se estableció, por primera vez, que se presenta una respuesta a la inducción de proteínas o péptidos en larvas de *G. mellonella* luego de inocular las larvas con promastigotes de *L. (V) panamensis*. Estos estudios preliminares abren una ventana para hacer identificación de nuevas moléculas que tengan un uso potencial como agentes leishmanicidas.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación, Colciencias a través del Proyecto Cód. 111556933368.

REFERENCIAS

- Andrejko M, Mizerska-Dudka M, Jakubowicz T. 2009. Antibacterial activity in vivo and in vitro in the hemolymph of *Galleria mellonella* infected with *Pseudomonas aeruginosa*. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 152 (2): 118–23. DOI: 10.1016/j.cbpb.2008.10.008
- Bergin D, Murphy L, Keenan J, Clynes M, Kavanagh K. 2006. Pre-exposure to yeast protects larvae of *Galleria mellonella* from a subsequent lethal infection by *Candida albicans* and is mediated by the increased expression of antimicrobial peptides. Microbes and Infection, 8 (8): 2105–12. DOI: 10.1016/j.micinf.2006.03.005
- Blum J, Desjeux P, Schwartz E, Beck B, Hatz C. 2004. Treatment of cutaneous Leishmaniasis among travellers. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 53 (2): 158–66. DOI: 10.1093/jac/dkh058
- Boulanger N, Lowenberger C, Volf P, Ursic R, Sigutova L, Sabatier L, Svobodova M, Beverley SM, Spath G, Brun R, Pesson B, Bulet P. 2004. Characterization of a defensin from the sand fly *Phlebotomus duboscqi* induced by challenge with bacteria or the protozoan parasite *Leishmania Major*. Infection and Immunity, 72 (12): 7140–46. DOI: 10.1128/IAI.72.12.7140-7146.2004
- Brey PT, Lee W J, Yamakawa M, Koizumi Y, Perrot S, François M, Ashida M. 1993. Role of the integument in insect immunity: epicuticular abrasion and induction of cecropin synthesis in cuticular epithelial cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 90 (13): 6275–79.
- Brogden KA, Ackermann M, McCray PB, Tack BF. 2003. Antimicrobial peptides in animals and their role in host defenses. International Journal of Antimicrobial Agents, 22 (5): 465–78.
- Brown SE, Howard A, Kasprzak AB, Gordon K H, East PD. 2008. The discovery and analysis of a diverged Family of Novel Antifungal Moricin-like Peptides in the Wax Moth *Galleria Mellonella*. Insect biochemistry and Molecular Biology, 38 (2): 201–12. DOI: 10.1016/j.ibmb.2007.10.009
- Brown SE, Howard A, Kasprzak, AB, Gordon, KH, East PD. 2009. A Peptidomics Study Reveals the Impressive Antimicrobial Peptide Arsenal of the Wax Moth *Galleria Mellonella*. Insect biochemistry and molecular biology 39 (11): 792–800. DOI: 10.1016/j.ibmb.2009.09.004
- Bulet P, Charlet M, Hetru C. 2003. Antimicrobial Peptides in Insect Immunity. En: Ezekowitz RAB, Hoffmann JA, editores. Innate Immunity. Totowa (U.S.A): Humana Press. p. 410 (89–107).
- Chicharro C, Granata C, Lozano R, Andreu D, Rivas L. 2001. N-Terminal Fatty Acid Substitution increases the leishmanicidal activity of CA(1-7) M(2-9), a Cecropin-Melittin Hybrid Peptide. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 45 (9): 2441–49.
- Cook SM, McArthur JD. 2013. Developing *Galleria mellonella* as a model host for human pathogens. Virulence, 4 (5): 350–53. DOI: 10.4161/viru.25240
- Cytrynska M, Mak P, Zdybicka-Barabas A, Suder P, Jakubowicz T. 2007. Purification and characterization of eight peptides from *Galleria mellonella* immune hemolymph. Peptides, 28 (3): 533–46. DOI: 10.1016/j.peptides.2006.11.010
- Díaz-Achirica P, Ubach J, Guinea A, Andreu D, Rivas L. 1998. The Plasma Membrane of *Leishmania Donovanii* Promastigotes Is the Main Target for CA(1-8) M(1-18), a Synthetic Cecropin A-Melittin Hybrid Peptide. The Biochemical Journal, 330 (Pt 1): 453–60.
- Frézard F, Demicheli C, Ribeiro RR. 2009. Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs. Molecules (Basel, Switzerland), 14 (7): 2317–36. DOI: 10.3390/molecules14072317
- Hancock REW, Sahl HG. 2006. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. Nature Biotechnology, 24 (12): 1551–57. DOI: 10.1038/

nbt1267

- Hoffmann JA, Hetru C. 1992. Insect defensins: Inducible antibacterial peptides. *Immunology Today*, 13 (10): 411–15. DOI: 10.1016/0167-5699(92)90092-L
- Lewis DJ. 1971. Phlebotomid sandflies. *Bulletin of the World Health Organization*, 44 (4): 535–51.
- Mak P, Zdybicka-Barabas A, Cytrynska M. 2010. A different repertoire of *Galleria mellonella* antimicrobial peptides in larvae challenged with bacteria and fungi. *Developmental and Comparative Immunology*, 34 (10): 1129–36. DOI:10.1016/j.dci.2010.06.005
- Olliaro PL, Bryceson AD. 1993. Practical progress and new drugs for changing patterns of Leishmaniasis. *Parasitology Today (Personal ed.)*, 9 (9): 323–28.
- Rogers ME, Ilg T, Nikolaev AV, Ferguson MAJ, Bates PA. 2004. Transmission of cutaneous Leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. *Nature*, 430 (6998): 463–67. DOI: 10.1038/nature02675
- Schoofs L, Holman GM, Hayes TK, Nachman RJ, De Loof A. 1990. Locustatachykinin I and II, two novel insect neuropeptides with homology to peptides of the vertebrate tachykinin family. *FEBS letters* 261 (2): 397–401. DOI: 10.1016/0014-5793(90)80601-E
- Sundar S, Chakravarty J. 2010. Antimony toxicity. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 7 (12): 4267–77. DOI: 10.3390/ijerph7124267
- de Vries HJC, Reedijk SH, Schallig HDFH. 2015. Cutaneous Leishmaniasis: recent developments in diagnosis and management. *American Journal of Clinical Dermatology*, 16 (2): 99–109. DOI: 10.1007/s40257-015-0114-z
- WHO. 2016. Organización mundial de la salud, Leishmaniasis [internet]. Fecha de acceso: 16 de agosto 2016. Disponible en: <<http://www.who.int/es/>>
- Wojda I, Patryk-Kowalski I, Jakubowicz T. 2009. Humoral immune response of *Galleria mellonella* larvae after infection by *Beauveria bassiana* under optimal and heat-shock conditions. *Journal of Insect Physiology*, 55 (6): 525–31. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2009.01.014
- Wortmann G, Zapor M, Ressler R, Fraser S, Hartzell J, Pierson J, Weintrob A, Magill, A. 2010. Liposomal amphotericin B for treatment of cutaneous Leishmaniasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 83 (5): 1028–33. DOI: 10.4269/ajtmh.2010.10-0171
- Wyatt GR. 1961. The biochemistry of insect hemolymph. *Annual Review of Entomology*, 6 (1): 75–102.
- Yeaman MR, Yount NY. 2003. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacological Reviews*, 55 (1): 27–55. DOI: 10.1124/pr.55.1.2
- Zhao J, Zhao C, Liang G, Zhang M, Zheng J. 2013. Engineering antimicrobial peptides with improved antimicrobial and hemolytic activities. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53 (12): 3280–96. DOI: 10.1021/ci400477e