Estudio de la interacción molecular huésped-patógeno utilizando el modelo insecto-hongo *Galleria mellonella-Fusarium oxysporum*, mediante la caracterización de genes, proteínas y péptidos de defensa provenientes de la respuesta humoral innata y del ataque fúngico

Amalia Muñoz Gómez

Universidad de Antioquia
Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias
Medellín
2015

Estudio de la interacción molecular huésped-patógeno utilizando el modelo insecto-hongo *Galleria mellonella-Fusarium oxysporum*, mediante la caracterización de genes, proteínas y péptidos de defensa provenientes de la respuesta humoral innata y del ataque fúngico

Amalia Muñoz Gómez

Tesis presentada para obtener el título de:

Doctor en Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias

Asesor:

Dr. Carlos A. Peláez Jaramillo Ph.D.

Universidad de Antioquia
Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias
Medellín
2015

RESUMEN

En este trabajo se estudiaron aspectos involucrados en el ataque del hongo *Fusarium oxysporum* a larvas de *Galleria mellonella* (Lepidóptera), y el proceso de defensa que se desencadena en el sistema inmune innato del huésped. Los insectos responden al desafío de agentes microbianos o a lesiones, mediante la rápida y transitoria síntesis de potentes compuestos antimicrobianos. Numerosas proteínas del sistema inmune provenientes de insectos que inhiben microorganismos han sido identificadas caracterizadas y clonadas *in vitro*, la mayor parte de las cuales exhiben actividad antibacteriana, mientras que en otras se demostró que afectaban a hongos. Los genes más estudiados de *F. oxysporum* son aquellos que producen toxinas, y en el caso de *G. mellonella*, son muy pocos los genes identificados, provenientes de su respuesta inmune innata. Para ambas especies es aún muy somera la caracterización de sus respectivos proteomas.

Para la comprensión de la relación huésped patógeno (insecto-hongo), las estrategias metodológicas seguidas incluyeron, la estandarización de la colonia de *G. mellonella* y del proceso de inoculación del hongo en larvas del insecto; la identificación de temperaturas óptimas de mantenimiento de las larvas y las concentraciones sub-letales de microconidias del hongo donde se produjo la mayor supervivencia de las larvas; el empleo de la tecnología iTRAQ (*Isobaric tags for relative and absolute quantitation*). Esta última permitió identificar y cuantificar las proteínas expresadas, además, mediante la utilización de ARN mensajero se identificaron genes expresados en condiciones deseadas. Finalmente, se llevó a cabo la identificación *in vivo* de células activas de las larvas atacadas por *F. oxysporum*, mediante microscopía láser confocal.

Se determinó que el crecimiento radial del hongo presentó correlación con la temperatura, presentando menor crecimiento a 37 que a 30°C. Las larvas sobrevivieron en mayor proporción al reto fúngico de 10^4 y 10^6 microconidias/mL, cuando fueron incubadas a 37°C durante las 48 horas post-infección y presentaron mayor supervivencia, cuando habían sido preinoculadas con *Lactobacillus plantarum.* Se observó diferenciación celular en la hemolinfa de larvas con reto fúngico. Se identificaron 59 proteínas en cada tratamiento iTRAQ 8-plex, 20 corresponden a *G. mellonella*, 20 a otras lepidópteras, las restantes a otras órdenes Insecta, otros invertebrados, bacterias, protozoos y hongos.

Se concluye que la estandarización tanto del sistema de crianza, manipulación e inyección de larvas de *G. mellonella* fueron consistentes, así como también el cultivo y mantenimiento de *F. oxysporum*. Las larvas son capaces de sobrevivir a elevadas concentraciones de microconidias/mL, cuando son incubadas a 37°C y cuando son pre-inoculadas con *L. plantarum*, antes del reto fúngico. La herramienta iTRAQ constituyó un método consistente para detectar proteínas asociadas con el sistema inmune innato de *G. mellonella* en respuesta a la infección por *F. oxysporum.* Además, iTRAQ es un enfoque proteómico cuantitativo fiable para detectar y cuantificar los niveles de expresión de proteínas del sistema inmune y péptidos, que muestra expresiones diferenciales a diferentes temperaturas y concentraciones de microconidias. Nuestro estudio proteómico nos permitió un seguimiento del mejoramiento de la respuesta inmune de *G. mellonella* contra el reto fúngico a 37°C. Se encontró que con 10^4 microconidias / mL a 37°C se sobre expresaron muchas más proteínas que con otros tratamientos.

Palabras claves: *Galleria mellonella, Fusarium oxysporum*, hemolinfa, microconidias, iTRAQ, proteomica.

ABSTRACT

In this work it was investigated different molecular and physiological aspects related with attack of pathogen *Fusarium oxysporum* (fungus) and the immune defense of *Galleria mellonella* (Lepidoptera). The challenge of insect is to reply the attack of microbial pathogens or make the improvements to the lesions, producing rapidly and transitory a large number of proteins and antimicrobial compounds. Many proteins and peptides of innate immune system from insect that inhibit microorganisms, were previously in vitro identified, characterized and cloned, most of them has antibacterial activity, while another ones are related with fungi defense. The most studied genes in F. oxysporum are the responsible of toxins. For the case of *G. mellonella* not so much genes were identified and the immune system genes are essentially poorly studied. Both organisms are poorly studied to the proteomics level.

For the best comprehension of the relationship host-pathogen (insect-fungus), the methodological strategy was follow the next steps: G. mellonella colony culture standardization, the right procedure of injection of fungus microconidia into insect, the identification of the best temperature for the maintenance of larvae, the best sublethal microconidia concentration for producing more larvae survivors and the usefulness of iTRAQ technology (Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation). This last technique allowed identify and quantify a large number of expressed proteins (up or down regulated), furthermore, isolating mRNA those proteins identified were correlated with gene expression under suitable conditions. Finally, It was carry out the in vivo identification of hemocoel active cells from larvae challenged *F. oxysporum*, by confocal microscopy.

It was stablished by fungus radial grown, where *F. oxysporum* grows in correlation with temperature, exhibiting low grow at 37 that at 30°C. The larvae survive in best proportion to the challenge of microconidia from 10^4 to 10^6 microconidia/mL, when were incubated at 37°C, during 48 h post-infection, and present best surviving when were pre-inoculated with Latobacillus platarum. Also, it was observed cellular differentiation into hemolymph larvae with fungus-challenge. Using iTRAQ 8-plex were identify 59 proteins, which 20 belong to *G. mellonella*, 20 were identified using other lepidotera species and the remained were identified using other species from bacteria, protozoan and fungus.

In conclusion, the standardization of breeding system, the handling and the injection of *G. mellonella* larvae with *F. oxysporum* microconidia were reliable and consistent, as well as the maintenance and culture of *F. oxysporum* was meticulous. The larvae survived with high microconidia/mL concentration, when the temperature incubation was 37°C, especially when the larvae were pre-inoculated with *L. plantarum*, before the fungus challenge. iTRAQ was a reliable method and consistent for detecting proteins related to innate immune system from G. mellonella in response to the pathogen F. oxysporum. In fact, iTRAQ as a regard of quantitative proteomics analytic method allowed quantify protein and and peptides, therefore allow to study their differential expression and improvement of the immune system from G. mellonella through the treatmet from the low to high of microconidia concentration and from the 25 to 37°C. Our proteomic study allowed following the improvement of immune response in G. mellonella against to fungus challenge at 37°C. In conclusion it was found that using 10^4 microconidia/mL at 37°C, over-expressed much more proteins than other treatments.

Keywords: *Galleria mellonella, Fusarium oxysporum*, hemolymph, microconidia, iTRAQ, proteomics.

AGRADECIMIENTOS

Al Doctor Carlos Peláez, por su confianza y por acogerme en el grupo Interdisciplinario de Estudios Moleculares para la realización de este trabajo y brindarme su apoyo y constante asesoría.

Al Doctor Edwin Patiño por sus invaluables consejos y su asesoría permanente.

Al Doctor César Segura, por su asesoría y sus importantes consejos.

A los profesores del posgrado en Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias de la Facultad de Química farmacéutica de la Universidad de Antioquia, por la formación académica que me brindaron.

Al posgrado de Biología de la Universidad de Antioquia y al profesor Jean Paul Delgado por facilitarme el uso del Microscopio Láser Confocal.

A todos y cada uno de los integrantes del GIEM, por su apoyo y por toda la colaboración que siempre recibí de parte de todos.

Al todos mis compañeros del GEBIOMIC y especialmente a su director Dr. Mauricio Corredor, por su dedicación y acompañamiento.

Al CIDBIO y a su director el Dr. Alfonso Benítez por sus invaluables ideas, consejos y aportes.

A la Doctora Nora Restrepo por su orientación y acertados consejos.

A la Profesora Beatriz Henao, por sus consejos y por sus enseñanzas con respecto a *Galleria.*

A Reina Bilbao por su constante ayuda y consejo.

A Miguel Acevedo por sus acertados consejos y por toda su colaboración.

A David Rodas por brindarme su amistad y por animarme siempre a seguir adelante en todas las circunstancias.

TABLA DE CONTENIDO GENERAL

		Pág.
INTRODUCCIÓN		1
HIPOTÉSIS		7
OBJETIVOS		8
MARCO TEÓRICO		9
Capítulo 1	Establecimiento de una colonia de *galleria mellonella* (l. pyralidae) como huésped modelo para ensayos biológicos de patogenicidad fúngica	16
Capítulo 2	Patogenicidad fúngica del género fusarium: *fusarium oxysporum* patógeno trans-reino	50
Capítulo 3	Interacción huésped-patógeno: *galleria mellonella-fusarium* oxysporum: sistema modelo de patogenicidad para estudios de inmunidad innata	80
Capítulo 4	Estudio de la respuesta celular de larvas de *galleria mellonella* frente al reto con *fusarium oxysporum* mediante microscopía confocal láser	118
Capítulo 5	Desarrollo de proteómica cuantitativa usando itraq basada en la respuesta inmunológica de larvas de *galleria mellonella* desafiadas con *fusarium oxysporum*	142
Capítulo 6	Perfiles de expresión transcripcional	189
Hipótesis	Hipótesis molecular y celular	218
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS		222

INDICE DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1. Dieta artificial para alimentar larvas de *G. mellonella* 35
Figura 2. Selección de las larvas. 35
Figura 3. Ciclo biológico de larvas de *G. mellonella* en condiciones controladas. 36
Figura 4 Proporción de machos, hembras y pupas 37
Figura 5. Manipulación de las larvas para la inyección de patógenos o de controles 38

Capítulo 2

Figura 1. Morfología de la cepa de *F. oxysporum* 68
Figura 2. Cultivo de *F. oxysporum* en medio PDA y V8 69
Figura 3. Recuento de microconidias/ de *F. oxysporum.* 70
Figura 4. Viabilidad de las microconidias de *F. oxysporum.* 71
Figura 5. Determinación del crecimiento radial de *F. oxysporum* a 30 y 37°C 72

Capítulo 3

Figura 1. Supervivencia de larvas evaluada con tres concentraciones de microconidias a 25 y 37°C. 95
Figura 2. Modelo de calibración para supervivencia versus microconidias 96
Figura 3. Supervivencia de larvas retadas con dosis sub-letales de microconidias a 25 y 30°C. 97
Figura 4. Actividad anti-fúngica de la hemolinfa de larvas retadas. 98
Figura 5. Aspecto del crecimiento radial de *F. oxysporum* en medio PDA 99
Figura 6. Análisis de varianza y verificación de supuestos. 100
Figura 7. Prueba de diferencia de medias. 101
Figura 8. Supervivencia de larvas de *G. mellonella inoculadas* con *L. plantarum* y luego retadas con hongo 102
Figura 9. Efecto de las hemolinfas inoculadas con *L. plantarum* y luego retadas con hongo 103
Figura 10. Ensayo de difusión por siembra en superficie (discos) para *E. coli* y *S. aureus* 105
Figura 11. Halo de inhibición de *F. oxysporum* 106
Figura 12. Ensayo de difusión con discos para *F. oxysporum* 107
Figura 13.Halo de reacción de larvas enteras retadas contra *F. oxysporum* 108
Figura 14. Halos de reacción (mm). 109
Figura 15. Halos de reacción (mm) observados con los diferentes tratamientos de hemolinfa 109

Capítulo 4

Figura 1. Tipos de hemocitos involucrados en la inmunidad de insectos 124
Figura 2. Características morfológicas de las microestructuras de *F. oxysporum* 126
Figura 3. Observación de microconidias del hongo y de células de la hemolinfa. 130
Figura 4. Granulocitos de *G. mellonella* y microconidias de *F. oxysporum* 131
Figura 5. Observación de diferentes tipos de hemocitos de *G. mellonella.* 132
Figura 6. Observación de hemocitos pasadas 24 horas post-infección 133
Figura 7. Hemocitos de larvas retadas con 10^6 microconidias/mL de F. oxysporum / 37°C 134
Figura 8. Aspecto de los hemocitos provenientes de la infección con 10^4 microconidias/mL 135
Figura 9. Aspecto de los hemocitos provenientes de la infección con 10^4 microconidias/mL / 25°C: 136

Capítulo 5

Figura 1. Análisis de datos de los péptidos de 17 proteínas seleccionadas 153
Figura 2. Resultados de expresión de las 17 proteínas 155
Figura 3. Proceso biológico de las 17 proteínas 156
Figura 4. Actina 4, alineamiento y estructura 3D hipotética 161
Figura 5. Proteína de unión a ácido retinoico celular o lipocalina 163

Figura 6. Alineamiento entre las proteínas HSP90 de *Fusarium oxysporum* ……..165
Figura 7. Comparación estructural de alineamientos 166
Figura 8. Alineamientos estructural de HSP90 167
Figura 9. Gráfica de los datos correspondientes a las tasas x:x de 119 y 121 169

Capítulo 6

Figura 1. Representación de los valores de la tabla 7 de las proteínas seleccionadas……..…203
Figura 2. Estandarización de la qPCR de oligos específicos para ferritina 204
Figura 3. Estandarización de la qPCR de oligos específicos para serpina.....204
Figura 4. Gráfica de inicio y terminación de ciclos de amplificación de los 7 genes utilizados en el estudio 205
Figura 5. Amplificación de ADNc de *G. mellonella* sin tratar.....206
Figura 6. Expresión media en términos de cuantificación relativa (RQ) de las amplificaciones por qPCR....209
Figura 7. Comparación de *Fold-changes* entre qPCR y iTRAQ de los tres genes y proteínas.....209
Figura 8. Validación de los datos de expresión obtenidos por iTRAQ comparados con qPCR 210
Figura 9. Valores finales de Log2 de qPCR y las relaciones de las tasas de iTRAQ 211

Hipótesis molecular y celular

Figura 1. Red funcional realizada con las 17 proteínas a 37°C, 104-106 microconidia/mL 218
Figura 2. Resultados de análisis de las 17 proteínas con el programa de Cytospcape.....219
Figura 3. Modelo de interacción celular y molecular (interactoma).....221

INDICE DE TABLAS

Capítulo 1
Tabla 1. Proporción de los ingredientes empleados para la dieta de las larvas de *G. mellonella* 33
Tabla 2. Resumen estadístico del ciclo biológico de *G. mellonella* 37
Capítulo 3
Tabla 1. Identificación de muestras de hemolinfa con reto fúngico 90
Tabla 2. Identificación de muestras de hemolinfa inoculada con *L. plantarum* y con *F. oxysporum* 91
Tabla 3. Identificación de las muestras para ensayo de inhibición del crecimiento radial del hongo 92
Capítulo 4
Tabla 1. Condiciones de adquisición de las imágenes. 129
Capítulo 5
Tabla 1. Cuantificación de proteínas totales por el método Bradford 140
Tabla 2. Listado de las proteínas identificadas por iTRAQ 158
Capítulo 6
Tabla 1. Mezcla para la eliminación de ADN cromosómico 198
Tabla 2. Lista de compuesto para la síntesis de la primera cadena de ADNc 198
Tabla 3. Mezcla para la síntesis de la segunda cadena de ADN 199
Tabla 4. Lista de primers diseñados y utilizados 199
Tabla 5. Componentes de la reacción en cadena de la polimerasa para realizar la PCR 200
Tabla 6. Tratamientos de iTRAQ 201
Tabla 7. Resultados de iTRAQ 202
Tabla 8. Valores de los CT (ciclos umbral, *cycle trhesold*) para cada gen estudiado 207
Tabla 9. Valores de los CT (ciclos umbral, *cycle trhesold*) para los genes endógenos 208

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN 2
1. ANTECEDENTES 2
2. DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA 3
3. JUSTIFICACIÓN 5
4. PROPÓSITO DE LA INVESTIGACIÓN 6
5. HIPOTESIS 7
6. OBJETIVOS 8
6.1 OBJETIVO GENERAL 8
6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 8
7. MARCO TEÓRICO 9
7.1 Los insectos 9
7.2 La respuesta inmune innata de insectos y mamíferos 9
7.3 Defensa de los insectos ante el ataque de hongos 10
7.4 La patogénesis fúngica 11
7.5 Necesidad de un modelo de huésped no mamífero 11
7.6 Modelos de hospedero para estudiar patogénicidad fúngica 12
8. BIBLIOGRAFÍA 12

INTRODUCCIÓN

1. ANTECEDENTES

El análisis *in vivo* de patógenos causantes de enfermedades es un paso crucial en el logro de una mayor comprensión de interacciones huésped-patógeno y de la biología de patógenos. En la última década se ha visto un marcado incremento en el número de investigadores desarrollando modelos de insectos paradigmas como medio para el estudio de microorganismos patógenos. El uso de los modelos mamíferos tradicionales tiene varios inconvenientes, aparte del debate ético, son costosos y requieren una importante inversión de tiempo en la obtención de la aprobación ética, y en asegurar los estándares apropiados de bienestar de los animales mantenidos (Kemp & Massey, 2007).

Tanto los mamíferos como los insectos son susceptibles al ataque de microorganismos, y los medios por los cuales los patógenos establecen infección (es decir, adhesión, invasión, propagación sistémica y evasión de la respuesta inmune) es la misma en ambos. En respuesta a estas infecciones, han desarrollado una serie de mecanismos para protegerse a sí mismos. Aunque algunos de estos mecanismos (tales como la adaptación del sistema inmune) están restringidas a metazoos de orden superior, las barreras físicas a la infección y los sistemas inmunes innatos son comunes a mamíferos e insectos y muestran un alto grado de homología en la función (Hoffmann *et al.*, 1999; Silverman & Maniatis, 2001; Salzet, 2001; Kemp & Massey, 2007; Levitin & Whiteway, 2008).

La investigación sobre la respuesta inmune innata de los mamíferos ha revelado similitudes con el sistema inmunológico de invertebrados. Los insectos han desarrollado una respuesta aguda que se asemeja a la observada en los seres humanos, que implica a efectores similares, receptores y regulación de la expresión génica (Salzet, 2001). Los mejillones han desarrollado la fagocitosis intracelular que se asemeja a la observada en neutrófilos mamíferos, utilizando péptidos catiónicos antibacterianos en los fagolisosomas (Lehrer & Ganz, 1999). Las sanguijuelas como los anfibios, producen o sintetizan péptidos antibacterianos y estimuladores inmunes que se derivan del procesamiento de los precursores de neuropéptidos. Este patrón de similitudes sugiere que la respuesta inmune innata de vertebrados se asemeja a un mosaico de las respuestas observadas en varios modelos de invertebrados (Lehrer & Ganz, 1999; Huttner & Bevins, 1999; Salzet, 2001).

En los últimos años, los hongos oportunistas se han convertido en las principales causas de morbilidad y mortalidad en individuos inmunocomprometidos (Nucci & Marr, 2005). Este problema se ve agravado por la aparición de varias especies de hongos con sensibilidad reducida a los agentes antifúngicos actuales (Apidianakis *et al.*, 2004; Chamilos *et al.*, 2006; Kemp & Massey, 2007).

Las especies de *Fusarium* están distribuidas en todo el mundo y pueden recuperarse de diversos sustratos. Estos microorganismos son fitopatógenos y pueden ser patógenos

oportunistas en el humano (Nelson *et al*., 1994), causando un espectro importante de infecciones. En los pacientes inmunocompetentes, la queratitis y la onicomicosis son las infecciones más comunes. Puede existir infección en pacientes con pérdida de la barrera cutánea, como los sujetos quemados o en los que tienen cuerpos extraños como lentes de contacto. Otras infecciones en pacientes inmunocompetentes incluyen sinusitis, neumonía y fungemia (Kurien *et al*., 1992; Madhavan *et al*., 1992) Los pacientes inmunodeprimidos tienen mayor riesgo de enfermedad diseminada, sobre todo los que padecen neutropenia profunda y deficiencia celular; en estos pacientes la fusariosis es típicamente una enfermedad diseminada e invasiva (Nucci & Anaissie, 2002).

Galleria mellonella (con una cutícula intacta) es impermeable a la exposición ambiental con bacterias patógenas tales como *P. aeruginosa*, pero es muy sensible a la administración sistémica de patógenos, puesto que poca cantidad de bacterias puede causarle la muerte (Jander *et al*., 2000). Varios investigadores han utilizado esta sensibilidad para desarrollar modelos para pruebas *in vivo*, de patogenicidad de bacterias y hongos. (Cotter *et al*, 2000; Kemp & Massey, 2007).

2. DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA

Fusarium oxysporum es un hongo del suelo que provoca marchitez vascular en más de cien especies diferentes de plantas (Armstrong & Armstrong, 1981; Lugo & Sanabria, 2001; Ortoneda *et al*., 2004; Navarro-Velasco *et al*., 2011; Ciampi, *et al*., 2009). *F. oxysporum* es considerado un patógeno oportunista en humanos, siendo el principal causante de onicomicosis (Gupta *et al*., 2000). Dada la ubicuidad de especies de *Fusarium* en el medio ambiente, las fusariosis pueden ser potencialmente adquiridas en la comunidad, como sugiere la presencia de conidios fusariales en muestras de aire de exteriores. Se han recuperado especies de *Fusarium* a partir agua (tanques de almacenamiento, drenajes, duchas, aireadores y grifos) y del aire de hospital y otros entornos (Nucci & AnaissieE, 2007).

En los seres humanos, las especies de *Fusarium* causan un amplio espectro de infecciones, tanto superficiales (queratitis y onicomicosis), como infecciones invasivas a nivel local o diseminadas; esto último ocurre casi exclusivamente en pacientes con inmunodepresión grave. También puede causar enfermedades alérgicas (sinusitis) en individuos inmunocompetentes y micotoxicosis en humanos sanos y en animales, después de la ingestión de alimentos contaminados con toxinas de *Fusarium* spp. (Nucci & Anaissie, 2007; O'Donnell *et al*., 2008; Tortorano *et al*., 2008).

Dado el problema que representan las micotóxinas de *Fusarium* que atacan plantas, insectos, mamíferos y humanos se hace necesaria una mayor comprensión de los procesos infecciosos producidos por *Fusarium* y de los mecanismos de respuesta del huésped especialmente del sistema inmune innato, mediante la modelización *in vivo*. El empleo de modelos mamíferos tradicionales tiene varias desventajas, como se mencionó anteriormente. Aunque los insectos no sean modelos aplicables para el estudio de todos los

patógenos, pueden ser utilizados de manera apropiada, dado que ellos proporcionan una gama de ventajas al investigador. Los insectos no están sujetos al riguroso control regulador y al debate ético; existen varios modelos de insectos bien definidos y genéticamente manejables que pueden ser fácilmente propagados y conducen a resultados rápidos (Hoffmann *et al.*, 1999; Silverman & Maniatis, 2001; Kemp & Massey, 2007).

Una limitación en el estudio de la patogénesis de *Fusarium* spp. es la disponibilidad de hospederos apropiados para estudiar la virulencia de hongos. Dos modelos de ratón han sido desarrollados para *Fusarium* spp. (Mayayo *et al*., 1999) sin embargo, las cuestiones éticas y los gastos asociados a utilizar estos modelos pueden ir en contra de su uso en el laboratorio. Para evitar estos problemas, las larvas de la polilla mayor de la cera, *G. mellonella*, se han desarrollado como un modelo hospedero para investigar la virulencia de *Fusarium* spp. Este organismo ha servido como huésped modelo para otros hongos patógenos de importancia clínica (Cotter *et al*., 2000; Mylonakis *et al*., 2005), incluyendo *Aspergillus* (Kavanagh and Reeves. 2004). La inmunidad innata juega un papel importante en la defensa contra las infecciones por mohos, aunque hay poca información disponible sobre las defensas del huésped contra las especies de *Fusarium*. Las fusariosis invasivas comparten muchas características con las aspergilosis invasivas y con otras infecciones por mohos, incluyendo su aparición en pacientes que reciben dosis altas de corticoides y aquellos con prolongada y profunda neutropenia (Nucci & Anaissie, 2007).

Es importante destacar que muchos de los factores de virulencia de los hongos médicamente importantes, que se requieren para infectar mamíferos, también son necesarios para la infección en *G. mellonella* (Brennan *et al.*, 2002; Mylonakis *et al.*, 2005). Mediante el uso de este sistema-modelo (insecto-hongo), se ha descubierto que los aislados de *Fusarium* spp. son más virulentos a temperaturas más bajas, y a partir de muestras clínicas de *Fusarium* y que aislamientos identificados como patógenos de plantas, también son capaces de matar a *G. mellonella* (Coleman *et al*., 2011).

Otro aspecto importante a tener en cuenta, es el uso sin control y la poca investigación básica sobre biopesticidas, que ha llevado a proponer el empleo de hongos peligrosos como *F. oxysporum* para fumigar cultivos ilicitos en Colombia (Garces de Granada *et al*., 2001). Utilizar este patógeno en regiones como Urabá acabaría prácticamente con los cultivos de banano pues es un patógeno en primera línea de esta planta, dado que el agente causante de la enfermedad de Panamá. *F. oxysporum* es un patogeno trans-reino, que pasa sin ninguna dificultad a través de plantas y animales, propagándose con todo éxito sobre plantas, mamíferos o insectos. Su efecto puede ser grave pues la misma cepa puede invadir los pulmones de un humano, como el xilema y el floema de un tomate. Emplear este hongo indiscriminadamente sin estudiarlo a fondo, puede tener un alto costo sanitario y social (González Posso, 2003).

3. JUSTIFICACIÓN

La investigación frente a la virulencia de patógenos en humanos, está sesgada por las limitaciones y los aspectos éticos asociados al uso de seres humanos como huéspedes experimentales susceptibles. En consecuencia, mamíferos como monos y ratones, han sido explotados como modelos huéspedes alternativos en la microbiología médica. El crecimiento del conocimiento público y la conciencia, ha demandado el empleo de huéspedes modelo, más aceptables éticamente. Por lo tanto, los insectos, son objeto de creciente atención como modelo para descifrar las interacciones huésped-patógeno (Vilcinskas, 2011).

Aunque no todos los microorganismos son fáciles de analizar en insectos modelo, existe un interés significativo y creciente en su empleo para modelizar enfermedades causadas por patógenos a humanos. Los insectos incuban y desarrollan la enfermedad rápidamente, son económicos y fáciles de manejar, y su empleo reduce el uso discutido de mamíferos. El aumento en la comprensión de la inmunidad de insectos, y conclusiones recientes que correlacionan los efectos de microorganismos patógenos en insectos y en mamíferos, han establecido estos modelos como herramientas promisorias en el estudio de enfermedades infecciosas (Kemp & Massey, 2007).

Varios estudios han mostrado que infectando insectos con los microorganismos patógenos, se obtienen datos que presentan fuerte correlación con los obtenidos de modelos de murinos. Estas conclusiones indican que los datos obtenidos de modelos de insecto pueden trasladarse a humanos así como los obtenidos comúnmente cuando se usan murinos y otros modelos de pequeños mamíferos. (Kemp & Massey, 2007).

Un aspecto importante de investigar en la interacción huésped-patógeno *Galleria-Fusarium,* es que los dos organismos son considerados modelo: *Fusarium* es modelo de patogenicidad fúngica tanto en plantas como en mamíferos y en insectos y *Galleria* es un modelo de huésped para desarrollar una respuesta homologable a la de mamíferos, además, se conoce poco de los mecanismo inmunogenéticos (inmunogenes) involucrados, tanto del patógeno como del huésped (Fuchs & Mylonakis, 2006; Fuchs *et al.*, 2010).

A pesar de que *Galleria* no ofrece todas las ventajas clásicas como huésped modelo (p.ej. un genoma secuenciado, aún en proceso), realmente ofrece la gran ventaja de poderse mantener bajo varias condiciones de temperaturas entre 25 a 37°C. La posibilidad de estudiar patógenos a 37°C, permite el estudio de rasgos de virulencia relacionados con la temperatura. Notablemente, la supervivencia a temperaturas de mamíferos no es un rasgo compartido por otros sistemas non-mamíferos. Las larvas de *Galleria* también tiene la ventaja de ser fácilmente inoculadas por inyección o uso tópico. Las inoculaciones por inyección proporcionan la vía de entrega de una cantidad exacta de células fúngicas, que es más ventajoso que el método alimenticio de inoculación utilizado con la mayor parte de otros huéspedes non-mamíferos. La hemolinfa de *Galleria,* que contiene seis tipos de hematocitos (prohemocitos, coagulocitos, esferulocitos, oenocitoides, plasmatocitos y granulocitos), desempeña un papel en la defensa contra patógenos fúngicos, siendo la

densidad de hematocitos y la supervivencia de *Galleria,* indicadores de patogenicidad (Fuchs & Mylonakis, 2006).

Por todo lo anteriormente expuesto, el modelo de estudio *Galleria-Fusarium* se encuentra robustamente sostenido, primero, en el grave problema que representa este hongo para el hombre, plantas y animales; y segundo, en las ventajas que representa la herramienta *G. mellonella* al poderla infectar fácilmente con el hongo. En nuestra investigación, el sistema-modelo unido a estudios de proteómica y transcriptómica de esta relación huésped-patógeno, permitió hacer un aporte importante y rápido, al contribuir a dilucidar el mecanismo de defensa del insecto y el mecanismo de ataque del patógeno, con fin de encontrar en el futuro, estrategias de control del hongo donde la farmacología actual aún no tiene aciertos a pesar del uso de los mejores antifúngicos, pues en el caso de las infecciones fúngicas, estas siguen siendo una causa significativa de morbilidad y mortalidad entre los pacientes inmunológicamente comprometidos. Este problema se ha complicado por la aparición de varias especies fúngicas con sensibilidad reducida a agentes anti fúngicos.

G. mellonella y modelos menos desarrollados como *Manduca sexta* y *Bombix mori* están poco caracterizados genéticamente en comparación con *D. melanogaster*, aunque estudios adicionales de caracterización, similar a aquellos de Bergin *et al.* (2003) con el tiempo podrán remediar esta deficiencia. La talla relativamente grande y el gran volumen de hemolinfa de estos insectos, los hace más fáciles de manejar que *D. melanogaster*, cuando se requieren inyecciones repetidas de microorganismos o de compuestos antimicrobianos. Los volúmenes grandes de hemolinfa permiten que el análisis bioquímico sea más fácil, y el hecho que puedan ser incubados a 37°C, demuestra que son modelos más exactos de interacción con patógenos de humanos, que *D. melanogaster* (Kemp & Massey, 2007).

4. PROPÓSITO DE LA INVESTIGACIÓN

El presente trabajo pretende buscar e identificar los péptidos antimicrobianos y proteínas, producidos por *Galleria mellonella*, en respuesta al ataque de *Fusarium oxysporum*. Esta investigación también quiere contribuir a la compresión de los mecanismos moleculares implicados en la respuesta humoral inmune de insectos del genero Lepidóptera, y así consolidar a *G. mellonella* como modelo biológico en estudios de enfermedades infecciosas causadas por microorganismos patógenos, dado que a pesar de que los insectos no presentan respuesta inmune adaptativa como los mamíferos (por ejemplo, producción de anticuerpos), si presentan una respuesta inmune humoral en la cual la hemolinfa contiene células capaces de inmovilizar y matar los microorganismos invasores y además generan una serie de proteínas y péptidos antimicrobianos que confieren un grado de inmunidad ante una amplia gama de microorganismos (Kavanagh & Reeves, 2004).

5. HIPOTESIS

Dado el problema que representa *F. oxysporum*, el cual ataca tanto a plantas como animales y humanos, y aprovechando la sensibilidad de *G. mellonella* frente a éste hongo; es necesario elucidar el mecanismo doble vía huésped-patógeno. Por ello, *G. mellonella-F. oxysporum* es un sistema modelo interesante para estudios de patogenicidad, el cual puede ayudar a dar respuestas en relación a las estrategias de defensa que usa el huésped, e igualmente, de las empleadas por el patógeno. Con base a todo lo anteriormente expuesto las preguntas que trata de responder esta investigación soportada en la metodología propuesta son: ¿Cuáles son los mecanismos del sistema inmune innato de *G. mellonella* implicados en la defensa contra el ataque del hongo? ¿Cuáles son los mecanismos empleados por *F. oxysporum para* invadir al insecto? ¿Cuáles son los mecanismos moleculares implicados en la interacción huésped-patógeno?

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo General

Identificar proteínas y genes de *Galleria mellonella* y *Fusarium oxysporum* que se expresan durante el proceso de invasión fúngica-defensa del huésped, con el fin de establecer un modelo de la relación huésped-patógeno.

6.2 Objetivos específicos

1- Estandarizar la cría y manejo de la colonia de *G. mellonella* a nivel del laboratorio.

2- Establecer una metodología para la inyección de las larvas de *G. mellonella* que permita la inyección cuantitativa de diferentes concentraiones de inóculo fúngico.

3- Estandarizar el cultivo y mantenimiento de la cepa de *F. oxysporum* y la obtención de diferentes concentraciones de microconidias.

4- Identificar la concentración letal y sub-letal de microconidias de *Fusarium oxysporum* inoculadas en *G. mellonella*, para establecer la dosis donde se presenta mayor supervivencia de las larvas a la infección fúngica.

5- Determinar la actividad anti-fúngica de la hemolinfa de larvas con reto inmunológico

6- Observar el efecto que a nivel celular producen las microconidias de *F. oxysporum* en larvas de *G. mellonella*, utilizando microscopía confocal láser.

7- Identificar proteínas de *G. mellonella* y *F. oxysporum* por iTRAQ/MS-MS en larvas sobrevivientes al reto fúngico, con diferentes concentraciones de microconidias y a dos temperaturas diferentes de incubación de las larvas.

8- Estudiar la expresión de genes de *G. mellonella* producidos en defensa a la invasión fúngica, por medio de qPCR y pérfiles de expresión transcripcional.

9- Establecer un modelo celular y molecular de la relación huésped-patógeno de las proteínas involucradas, mediante el empleo de herramientas bioinformáticas.

7. MARCO TEÓRICO

7.1 Los insectos

Los insectos son organismos evolutivamente exitosos que ocupan casi todos los hábitats en la naturaleza, poseen un sistema inmunológico muy eficaz, cuyo funcionamiento se basa en los mecanismos innatos humoral y celular. Ellos están continuamente expuestos a microorganismos potencialmente patógenos y a parásitos eucariotas, siendo capaces de reaccionar con una respuesta inmunitaria eficaz contra estos invasores. Desde el primer informe de la respuesta inmune innata de *Hyalophora cecropia* (Lepidoptera: *Saturniidae*), muchos taxones de insectos han sido objeto de estudios de la respuesta inmune innata a la lesión séptica (Bulet *et al*., 1999). En las últimas décadas, la inmunidad innata se ha estudiado ampliamente en los insectos, con énfasis en el manejo de plagas de insectos en la agricultura, el descubrimiento de moléculas bioactivas y la revelación de las raíces evolutivas de la inmunidad innata (Lee *et al*., 2004). Las reacciones celulares, p.ej. fagocitosis, nodulación y encapsulación, son mediadas por hemocitos, mientras que los péptidos antimicrobianos y las proteínas son los componentes más importantes de la respuesta humoral inmune (Mak *et al*., 2010). Uno de los mecanismos más estudiados de la inmunidad innata en los insectos es la producción de péptidos antimicrobianos (AMPs), que son sintetizados en el cuerpo graso (equivalente funcional del hígado en mamíferos) durante la respuesta sistémica contra patógenos, y son entonces secretados en la hemolinfa (equivalente a la sangre). Los insectos pueden producir una variedad de AMPs en respuesta a la infección microbiana o lesiones del cuerpo, y la mayoría de estos péptidos son sintetizados por el cuerpo de graso, que es entonces un importante tejido del insecto implicado en la respuesta inmune. Los AMPs se secretan en la hemolinfa y son responsables de la detención del crecimiento del microbio en una etapa temprana en la respuesta inmune (Hoffmann, 1995; Mak, *et al*., 2010; Silva *et al*., 2010).

7.2 La respuesta inmune innata de insectos y mamíferos

Drosophila, como otros insectos, responde a la lesión séptica por la síntesis rápida y transitoria de una batería de potentes péptidos antibacterianos. El principal sitio de la síntesis de estos péptidos es el cuerpo graso. La defensa del insecto huésped carece de especificidad y memoria, y se ha argumentado que es homóloga a la respuesta de fase aguda de mamífero (Fehlbaum *et al*., 1994).

En mamíferos el sistema inmune innato tiene tres componentes principales: barreras anatómicas, barreras fisiológicas y barreras fagocitarias. Los insectos como *D. melanogaster*, posen un sistema inmunológico innato bien caracterizado y conformado por la respuesta celular y humoral a la invasión microbiana. Las barreras anatómicas de mamíferos están en la epidermis, que proporcionan una barrera física contra el ataque microbiano y la producción de secreciones como el moco para retirar microbios libres por lavado (Salzet, 2001; Kemp & Massey, 2007). La cutícula de insectos actúa de modo similar a la epidermis mamífera, al constituirse como la primera barrera protectora del organismo y las células de las extensiones digestivas y genitales de los insectos también producen secreciones protectoras, los insectos también producen factores solubles como

péptidos antimicrobianos (Tzou *et al.*, 2000; Onfelt Tingvall *et al.*, 2001; Kemp & Massey, 2007).

Hoffmann *et al.* (1999) hablan de analogías de inmunidad entre insectos y mamíferos, y propone que proteínas distintas reconocen patrones moleculares característicos asociados con clases particulares de patógenos y preferentemente activan la producción de péptidos que matan al patógeno en cuestión. Las proteínas que reconocen y se unen a componentes de la pared celular de bacterias u hongos, activan zimógenos de proteasas que se han caracterizado en otros invertebrados (Iwanaga *et al.*, 1998; Hoffmann *et al.*, 1999).

7.3 Defensa de los insectos ante el ataque de hongos

El mecanismo de reconocimiento de agentes extraños y la captura de invasores por el sistema inmune de los insectos es desconocido. Los insectos poseen mecanismos de defensa contra las agresiones de los patógenos fúngicos, que involucran barreras físicas, defensas humorales, defensas celulares y de comportamiento social (Marmaras *et al*., 1994-1996; Hoffmann *et al.*, 1999; Levitin & Whiteway, 2008; Téllez-Jurado *et al.*, 2009).

La respuesta inmune innata prototípica de los insectos se ha estudiado en *Drosophila melanogaster*, quien es particularmente resistente a las infecciones microbianas. Tres mecanismos contribuyen a esta resistencia: (i) la fagocitosis de los microorganismos invasores por las células de la hemolinfa, (ii) cascadas proteolíticas que conducen a la coagulación localizada de la hemolinfa, la formación de melanina, y la opsonización, y (iii) la síntesis transitoria de péptidos antimicrobianos potentes. Estas reacciones se llevan a cabo dentro de un corto período después de la lesión séptica. Considerando que la información sobre la participación de las células de la hemolinfa (hemocitos) y de las cascadas proteolíticas en la inmunidad de *Drosophila* sigue siendo fragmentaria, se ha aprendido mucho en los últimos años sobre la estructura y expresión regulada de los péptidos antimicrobianos inducibles (Hultmark, 1983; Boman, 1995; Hoffmann 1997). Además de esta respuesta sistémica, *Drosophila* también produce péptidos antimicrobianos localmente, en los epitelios de barrera (Hoffmann, 1999; Hetru & Hoffmann, 2003).

Desde el descubrimiento de los péptidos antimicrobianos inducibles en la polilla de la *H. cecropia* por Steiner *et al.*, en 1981, se ha informado de 400 péptidos que participan en la inmunidad innata, no sólo en insectos, sino en todos los organismos multicelulares que fueron investigados, incluyendo seres humanos y plantas. Entre estos péptidos, las defensinas, que conforma un grupo compacto (3-5 kD) de moléculas resistentes a las proteasas con tres o cuatro puentes disulfuro. Las defensinas tienen amplio espectro de actividad dirigido contra diversos tipos de bacterias, hongos y virus con envoltura (Ganz & Lehrer, 1998; Hoffmann, 1999).

Drosophila es capaz de discriminar entre varias clases de microorganismos invasores, por ejemplo bacterias y hongos, produciendo preferentemente péptidos que destruyen al patógeno reconocido. Las moscas, por ejemplo, que están infectadas naturalmente por exposición a hongos entomopatógenos exhiben una respuesta adaptada al activar selectivamente la vía de *Toll* para producir péptidos con actividades antifúngicas

(Hoffmann *et al.*, 1999). La disponibilidad de mutaciones de las rutas reguladoras que controlan la expresión de los péptidos antimicrobianos sirve para evaluar no sólo su inducción, sino también su relevancia en la defensa del huésped insecto. En particular, las mutaciones que afectan la vía de *Toll,* notablemente, la expresión del péptido antifúngico drosomicina, producen menor resistencia a hongos, pero no a las bacterias. A la inversa, las mutaciones que afectan predominantemente a la inducción de péptidos antibacterianos dan lugar a reducción de la supervivencia por exposición a bacterias, con un efecto menos marcado en el caso de la infección por hongos (Lemaitre *et al.*, 1996). Aunque estos datos subrayan el papel que la inducción selectiva de la síntesis de péptido antifúngico y antibacteriano, juega en la resistencia a la infección en *Drosophila*, los resultados con mutantes defectuosos en la hematopoyesis y la melanización confirman que los hemocitos y la cascada de fenoloxidasa contribuyen significativamente a esta resistencia (Braun, 1998).

7.4 La patogénesis fúngica

Una característica sobresaliente de los organismos fúngicos es la biosíntesis de una diversidad de metabolitos secundarios todavía poco explorados. Dado el aumento del conocimiento sobre los mecanismos genéticos moleculares que subyacen a la regulación estricta de la formación de metabolitos secundarios, se ha sugerido repetidamente que esta maquinaria metabólica se ve favorecida por la selección natural porque los productos formados constituyen un arsenal químico que aumenta la vitalidad en condiciones ecológicas desafiantes. Las interacciones antagonistas con otros organismos que co-ocurren en el hábitat fúngico, tienen un impacto fuerte sobre todo en el crecimiento fúngico y la reproducción, es decir, sobre la aptitud evolutiva (Rohlfs & Churchill, 2011).

7.5 Necesidad de un modelo de huésped no mamífero

Los modelos de invertebrados son herramientas valiosas para el estudio de la patogénesis fúngica. Dentro de este campo de estudio, la polilla *G. mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) es un modelo emergente de hospedero para patógenos. El hábitat natural de este insecto son colmenas donde se alimentan de polen, miel y cera de abejas. Dentro de su entorno natural, sin duda, se encuentra con varios microbios para los cuales ha evolucionado su respuesta inmune. Su susceptibilidad a la infección, así como la posibilidad de desencadenar una respuesta de defensa hacen de *G. mellonella* un huésped interesante para el estudio de la patogénesis microbiana. La forma larval del insecto ha sido empleada para estudiar hongos tales como *A. flavus*, *A. fumigatus*, *Candida* spp. y *Cryptococcus neoformans*. En el presente estudio nos centramos en la infección fúngica causada por *F. oxysporum* (Mylonakis *et al*., 2005; Bergin *et al*., 2003).

Dado que la respuesta inmune innata es la línea principal de defensa contra muchos patógenos microbianos, tanto en vertebrados como en invertebrados, se han enfocado muchos esfuerzos examinando la respuesta a la infección microbiana en mamíferos y en insectos y se ha demostrado una correlación fuerte entre ambos sistemas. Actualmente se comienza a apreciar la eficacia de la respuesta del insecto a la infección. Un estudio más cercano a la respuesta inmune del insecto, demuestra que se trata de un sistema sumamente adaptado y eficaz, que es capaz de tratar con una amplia gama patógenos bacterianos, fúngicos y protozoarios y con unas cargas microbianas que serían fatales para vertebrados.

En los últimos años se ha dado un reconocimiento de la homología entre los sistemas inmunológicos innatos de insectos y de mamíferos y que un conocimiento de la respuesta del insecto a la infección podría proporcionar información valiosa del funcionamiento del sistema inmune innato de mamíferos. También puede haber un motivo ulterior en el estudio de la respuesta inmune del insecto, ya que esto podría ser usado para diseñar insecticidas más eficaces o nuevos que funcionen por inhibición de la respuesta inmune del insecto a patógenos microbianos. Considerando el papel de la respuesta inmune innata en protección de mamíferos contra la infección microbiana y el alto grado de semejanza que existe entre las respuestas inmunes innatas de mamíferos y de insectos, el estudio de la respuesta del insecto a la infección, pueden proporcionar datos comparables a los que pueden ser obtenidos usando mamíferos (Kavanagh & Reeves, 2004).

En humanos, algunos péptidos antimicrobianos son producidos por las células epiteliales de revestimiento del aparato respiratorio, tracto gastrointestinal, tracto urogenital y de la piel. Otros, como las ß-defensinas humanas, son abundantes en ciertas células fagocitarias migratorias, que puede rodear, ingerir y matar al invasor microbiano (Salzet, 2001). Los insectos, como la *Drosophila* (Díptera) y *Galleria* (Lepidóptera) responden al ataque de microorganismos, sintetizando rápidamente péptidos antimicrobianos. Es interesante que los distintos péptidos antimicrobianos que han sido descritos, parezcan tener especificidad en la inducción de la expresión de varios péptidos dependiendo del agente infeccioso. Tanto *D. melanogaster* como *G. mellonella* puede discriminar entre varios grupos de microorganismos y desencadenar algún tipo de respuesta inmune adaptativa (Fallon *et al*., 2001; Mak, *et al*., 2010).

7.6 Modelos de hospedero para estudiar patogénicidad fúngica

Las larvas de *G. mellonella*, son cada vez más usadas como un modelo para evaluar la virulencia de una amplia gama de microorganismos. Dado que estas larvas ofrecen varias ventajas, tales como su gran tamaño (mayores de 250 mg, 30 mm de longitud), este modelo se encuentra disponible en el comercio y puede ser mantenido por una fracción del costo asociado con los mamíferos usados en pruebas convencionales de patogenicidad *in vivo* (Kavanagh & Reeves, 2004). Las larvas son fáciles de infectar y la inoculación sistémica se puede realizar con un mínimo de entrenamiento. Además, es importante destacar que las larvas de tipo salvaje de *G. mellonella* son susceptibles a infecciones por hongos y agentes antifúngicos. En este sentido, el sistema de *G. mellonella* es diferente de lo observado en *D. melanogaster*, pues las moscas son capaces de sobrevivir a altos inóculos de hongos, a menudo haciendo necesario el uso de mutantes para el estudio de la patogénesis (Mylonakis, 2008).

8. BIBLIOGRAFÍA

Alspaugh J, Cavallo LM, Perfect JR, Heitman J. RAS1 regulates filamentation, mating and growth at high temperature of *Cryptococcus neoformans*. Mol. Microbiol. 2000;36(2):352–65.

Apidianakis Y, Rahme LG, Heitman J, Ausubel FM, Calderwood SB, Mylonakis E. and Role of the Innate Immune Response. Eukaryot Cell. 2004;3(2):413–419.

Bergin D, Brennan M, Kavanagh K. Fluctuations in haemocyte density and microbial load may be used as indicators of fungal pathogenicity in larvae of Galleria mellonella. Microbes Infect. 2003;5(15):1389–1395.

Boman HG. Peptide Antibiotics and their Role in Innate Immunity. Annu. Rev. Immunol. 1995;13:61-92.

Braun A, Hoffmann J, Meister M. Analysis of the Drosophila host defense in domino mutant larvae, which are devoid of hemocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998 Nov 24;95(24):14337–14342.

Brennan M, Thomas DY, Whiteway M, Kavanagh K. Correlation between virulence of Candida albicans mutants in mice and Galleria mellonella larvae. FEMS Immunol Med Microbiol. 2002;34(2):153–7.

Bulet P, Stöcklin R, Menin L. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. Immunol. Rev. 2004;198:169–184.

Bulet P, Hetru C, Dimarcq JL, Hoffmann D. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. Dev. Comp. Immunol. 1999;23(4-5):329–344.

Chamilos G, Lionakis MS, Lewis RE, Kontoyiannis DP. Role of mini-host models in the study of medically important fungi. Lancet Infect Dis. 2007;7:42–55.

Coleman JJ, Muhammed M, Kasperkovitz PV, Vyas JM, Mylonakis E. *Fusarium* pathogenesis investigated using *Galleria mellonella* as a heterologous host. Fungal Biol. 2011;115(12):1279–1289.

Cotter G, Doyle S, Kavanagh K. Development of an insect model for the in vivo pathogenicity testing of yeasts. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 2000;27(2):163–169.

Fallon, P.G. *et al*. Primitive Toll signalling: bugs, flies, worms and man. Trends Immunol. 2001;22:63–66.

Fehlbaums P, Bulets P, Michauts L, Lagueuxs M, Broekaerto WF, Hetrus C, *et al*. Insect Immunity Septic injury of *Drosophila* induces the synthesis of a potent antifungal peptide with sequence homology to plant antifungal peptides. J Biol Chem. 1994;269(52):33159–33163.

Fuchs BB, O'Brien E, El Khoury JB, Mylonakis E. Methods for using Galleria mellonella as a model host to study fungal pathogenesis. Virulence. 2010;1(6):475–482.

Fuchs BB, Mylonakis E. Using non-mammalian hosts to study fungal virulence and host defense. Curr. Opin. Microbiol. 2006;9(4):346–351.

Gupta AK, Baran R, Summerbell RC. *Fusarium* infections of the skin. Curr. Opin. Infec. Dis. 2000;13:121-128.

Haine ER, Moret Y, Siva-Jothy MT, Rolff J. Antimicrobial defense and persistent infection in insects. Science. 2008;322(5905):1257–1259.

Hetru C, Troxler L, Hoffmann J. *Drosophila melanogaster* antimicrobial defense. J Infect Dis. 2003;187(Suppl 2):S327–334.

Hoffmann J, Kafatos FC, Janeway C, Ezekowitz R. Phylogenetic perspectives in innate immunity. Science. 1999;284(5418):1313–1318.

Hoffmann JA. Immune responsiveness in vector insects. Proc Natl Acad Sci USA. 1997;94:11152–11153.

Hultmark D, Engstrom A, Andersson K, Steiner H, Bennich H, Boman HG. Insect immunity. Attacins, a family of antibacterial proteins from *Hyalophora cecropia.* EMBO J. 1983;2(4):571–576.

Huttner KM, Bevins CL. Antimicrobial peptides as mediators of epithelial host defense. Pediatr Res. 1999;45(6):785–794.

Iwanaga S, Kawabata S, Muta T. New types of clotting factors and defense molecules found in horseshoe crab hemolymph: their structures and functions. J. Biochem. 1998;123:1–15.

Jander G, Rahme LG, Ausubel FM. Positive correlation between virulence of *Pseudomonas aeruginosa* mutants in mice and insects. J. Bacteriol. 2000;182(13):3843–3845.

Kavanagh K, Reeves EP. Exploiting the potential of insects for in vivo pathogenicity testing of microbial pathogens. FEMS Microbiol. Rev. 2004;28(1):101–112.

Kemp MW, Massey RC. The use of insect models to study human pathogens. Drug Discov. Today Dis. Model. 2007;4(3):105–110.

Kurien M, Anandi V, Raman R, Brahmadathan KN. Maxillary sinus fusariosis in immunocompetent hosts. J. Laryngol. Otol. 1992;106:733-736.

Lee YS, Yun EK, Jang WS, Kim I, Lee JH, Park SY, *et al*. Purification, cDNA cloning and expression of an insect defensin from great wax moth, *Galleria*. Insect Mol. Biol. 2004;13(1):65–72.

Lehrer RI, Ganz T. Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence. Curr. Opin. Immunol. 1999;11: 23–27.

Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann J. The dorsoventral regulatory gene cassette spätzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. Cell. 1996;86(6):973–983.

Levitin A, Whiteway M. *Drosophila* innate immunity and response to fungal infections. Cell Microbiol. 2008;10(5):1021–1026.

Li D, Scherfer C, Korayem a M, Zhao Z, Schmidt O, Theopold U. Insect hemolymph clotting: evidence for interaction between the coagulation system and the prophenoloxidase activating cascade. Insect Biochem. Mol. Biol. 2002;32(8):919–928.

Lussenhop J, Wicklow DT. Interaction of competing fungi with fly larvae. Microb Ecol. 1985 Jun;11(2):175–182.

Madhavan M, Ratnakar C, Veliath AJ, Kanungo R, Robinson SS, Bhat S. Primary disseminated fusarial infection. Postgrad. Med. J. 1992;68:143-144.

Mak P, Zdybicka-Barabas A, Cytryńska M. A different repertoire of Galleria mellonella antimicrobial peptides in larvae challenged with bacteria and fungi. Dev Comp Immunol. 2010;34(10):1129–1136.

Marmaras VJ, Charalambidis ND, Zervas CG. Immune response in insects: the role of phenoloxidase in defense reactions in relation to melanization and sclerotization. Arch. Insect Biochem. Physiol. 1996;31: 119-133.

Marmaras VJ, Charalambidis ND, Lambropoulou M. Cellular defense mechanisms in C. capitata: recognition and entrapment of E. coli by hemocytes. Arch. Insect Biochem. Physiol. 1994 Jan;26(1):1–14.

Mayayo E, Pujol I, Guarro J. Experimental pathogenicity of four opportunist *Fusarium* species in a murine model. J. Med. Microbiol. 1999;48(4):363–366.

Mylonakis E. *Galleria mellonella* and the study of fungal pathogenesis: making the case for another genetically tractable model host. Mycopathologia. 2008;165:1–3.

Mylonakis E, Moreno R, El Khoury JB, Idnurm A, Heitman J, Calderwood SB, *et al*. *Galleria mellonella* as a Model System To Study *Cryptococcus neoformans* Pathogenesis. Infect Immun. 2005;73(7):3842–3850.

Nelson PE, Dignani MC, Anaissie EJ. Taxonomy, Biology, and Clinical Aspects of Fusarium Speciest. Clin. Microbiol. Rev. 1994;7(4):479–504.

Nucci M, Anaissie E. Fusarium infections in immunocompromised patients. Clin. Microbiol. Rev. 2007;20(4):695–704.

Nucci M, Marr K.A. Emerging fungal diseases. Clin. Infect. Dis. 2005;41: 521–526.

Nucci M, Anaissie E. Cutaneous infection by Fusarium species in healthy and mmunocompromised hosts: implications for diagnosis and management. Clin. Infect. Dis. 2002;35: 909-920.

Pucheta Díaz M, Flores Macías A, Rodríguez Navarro SY, De la Torre YM. Mecanismo de los hongos entopatógenos. Interciencia. 2006;31(12):1–11.

Rohlfs M, Churchill ACL. Fungal secondary metabolites as modulators of interactions with insects and other arthropods. Fungal Genet. Biol. 2011;48(1):23–34.

Salzet M. Vertebrate innate immunity resembles a mosaic of invertebrate immune responses. Trends Immunol. 2001;22(6):285–8.

Silva JLC, Barbosa JF, Bravo JP, de Souza EM, Huergo LF, Pedrosa FO, *et al*. Induction of a gloverin-like antimicrobial polypeptide in the sugarcane borer *Diatraea saccharalis* challenged by septic injury Induction of a gloverin-like antimicrobial polypeptide in the sugarcane borer Diatraea saccharalis challenged by septic injury. 2010;43(May):431–436.

Silverman N, Maniatis T. NF-kappaB signalling pathways in mammalian and insect innate immunity. Genes. Dev. 2001;15: 2321–2342.

St. Leger R, Joshi L, Bidochka MJ, Roberts DW. Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996;93(13):6349–54.

S**teiner H, Hultmark D, Engström Å, Bennich H.** Sequence and Specificity of Two Antibacterial Proteins Involved in Insect. Nature. 1981;292:246-248.

Téllez-Jurado A, Cruz Ramírez MG, Mercado Flores Y, Asaff Torres A, Arana-Cuenca A. Mecanismos de acción y respuesta en la relación de hongos entomopatógenos e insectos. Rev. Mex. Micol. 2009;30:73–80.

Tingvall TÖ, Roos E, Engström Y. expression in Drosophila barrier epithelia. EMBO Rep. 2001;2(3):239–43.

Tzou P, Ohresser S, Ferrandon D, Capovilla M, Reichhart JM, Lemaitre B, *et al*. Tissue-specific inducible expression of antimicrobial peptide genes in *Drosophila* surface epithelia. Immunity. 2000 Nov;13(5):737–748.

Vilcinskas A. Insects emerge as valuable model hosts to explore virulence. Virulence. 2011;2(5):376–378.

Vining LC. Function of secondary metabolites. Ann. Rev. Microbiol. 1990;44: 395–427.

CONTENIDO

ESTABLECIMIENTO DE UNA COLONIA DE *GALLERIA MELLONELLA* (L. PYRALIDAE) COMO HUÉSPED MODELO PARA ENSAYOS BIOLÓGICOS DE PATOGENICIDAD FÚNGICA 18
RESUMEN 18
1. INTRODUCCIÓN 19
1.1 Sistema inmune innato de insectos y mamíferos 19
1.2 Sistema inmune innato de insectos 19
1.3 Inducción de la respuesta inmune innata en insectos 19
1.4 Mecanismos de defensa de los insectos en orden de actuación 20
1.4.1 La cutícula. 20
1.4.2 La Hemolinfa. 20
1.5 Elementos celulares de la hemolinfa 20
1.5.1 La fagocitosis. 21
1.5.2 La nodulización. 22
1.5.3 La encapsulación. 22
1.6 Inmunidad humoral 23
1.6.1 Mecanismos de producción de coagulo (clotting). 23
1.6.2 La melanización. 23
1.6.3 Producción de péptidos antimicrobianos. 24
1.6.3.1 Los péptidos antimicrobianos efectores de la inmunidad innata. 25
1.6.3.2 Aspectos estructurales de los péptidos antimicrobianos (AMPs). 25
1.6.3.3 Mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos. 26
1.7 Similitudes entre la inmunidad de mamíferos y de insectos 26
1.8 Insectos modelos empleados en estudios de patogenicidad de hongos 27
1.8.1 *Drosophila melanogaster*. 27
1.8.2 Lepidópteros como modelos emergentes. 28
1.8.3 *Galleria mellonella.* 28
1.9 Comparación entre modelos para estudios de patogenicidad 29
1.9.1 Ventajas de *D. melanogaster.* 29
1.9.2 Desventajas de *D. melanogaster* y otros huéspedes. 29
1.9.3 Ventajas al emplear *G. mellonella* para estudios de patógenos fúngicos. 29
1.9.4 Desventajas del uso de *G. mellonella.* 30
1.10 Ciclo Biológico de *G. mellonella* 30

1.11 Cría de *G. mellonella* con dieta artificial 31
2. METODOLOGÍA 31
2.1 Desarrollo de la colonia a nivel de laboratorio 31
2.1.1 Materiales y Equipos. 31
2.1.2 Condiciones ambientales de cría. 32
2.2 Inicio y mantenimiento de la colonia 32
2.3 Renovación de la colonia 33
2.4 Alimentación de las larvas 33
2.5 Ciclo de vida de *G. mellonella* 33
2.5.1 Relación de machos y hembras 33
2.6 Análisis estadístico 33
2.7 Manejo de las larvas para inyección 34
3. RESULTADOS 34
3.1 Desarrollo de la colonia a nivel de laboratorio 34
3.1.1 Dieta GIEM. 34
3.1.2 Huevos. 35
3.1.3 Larvas. 35
3.2 Ciclo de vida de *G. mellonella* 36
3.2.1 Relación de machos y hembras. 36
3.3 Análisis estadístico 37
3.4 Manejo de las larvas para inyección 38
4. DISCUSIÓN 38
4.1 Ventajas de la cría en el laboratorio 39
4.2 Manejo de la colonia a nivel de laboratorio 39
4.3 Ciclo de desarrollo en el laboratorio 40
4.4 Manejo de las larvas para inyección 41
5. CONCLUSIONES 41
6. BIBLIOGRAFÍA 42

ESTABLECIMIENTO DE UNA COLONIA DE *Galleria mellonella* (L. PYRALIDAE) COMO HOSPEDERO MODELO PARA ENSAYOS BIOLÓGICOS

RESUMEN

La respuesta inmune innata de las larvas de lepidópteros se ha investigado durante más de 40 años y dado que las larvas son fáciles de criar en el laboratorio, se han utilizado ampliamente para la investigación de la fisiología y bioquímica de insectos. La presencia de bacterias o de hongos en el hemocele estimula la respuesta celular y la humoral. Las larvas de *Galleria mellonella*, criadas en condiciones controladas son grandes (mayores de 250 mg), ofreciendo la ventaja de un gran volumen de hemolinfa para análisis bioquímicos y estudios de la función de hemocitos. Este modelo disponible en el comercio, muestra promisoria significación, en particular en el campo de la selección de virulencia. *G. mellonella* posee un sistema de defensa con varias semejanzas con mamíferos, teniendo un sistema circulatorio y una compleja respuesta inmune innata. Las larvas de *G. mellonella* son capaces de sobrevivir a la temperatura fisiológica de los mamíferos (37°C), lo cual permite la expresión de ciertos factores de virulencia de patógenos fúngicos regulados por la temperatura. Se han desarrollado diferentes dietas artificiales para la propagación masiva de *G. mellonella* para su uso como huésped tanto de bacterias como de hongos, parasitoides y nemátodos. Se evaluó el efecto de la dieta artificial estandarizada en nuestro laboratorio y de todas las demás condiciones de cría sobre el ciclo biológico de *G. mellonella* y se determinó la duración de cada estadio, estableciéndose un tiempo total para el ciclo de vida, de 87.8 días (SD=11.8) repartidos en 9.1 días (SD=2.4) para la eclosión de los huevos, seguida del estadio larval que duró 40.3 días (SD=2.1), la fase de pupa se llevó a cabo en 21.5 días (SD=2.4), finalizando la etapa adulta en 16.9 días (SD=2.0). Finalmente se determinó la proporción de machos y hembras obtenidos por nuestro sistema de cría, encontrando una relación de 1.48 machos por cada hembra. También se estableció que el sistema de cría es estadísticamente reproducible, con poca variabilidad en el proceso experimental.

Palabras claves: Lepidóptera, *Galleria mellonella*, larva, pupa, imago.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Sistema inmune innato de insectos y mamíferos

Los insectos son uno de los grupos de animales más exitosos y geográficamente más extendidos sobre Tierra. Se encuentran en casi todos los hábitats y han tenido éxito en la colonización de lugares inaccesibles, o inutilizables por otras formas de vida animal. Estimaciones conservadoras sugieren que existen 750,000 especies de insectos pero en realidad esta cifra puede ser más cercana al 1.000.000, haciendo de ellos la forma de vida animal más abundante y diversa de todos los tiempos (Ratcliffe, 1985; Vilmos & Kurucz, 1998). A partir de una perspectiva evolutiva, los insectos y vertebrados divergieron hace aproximadamente 500 millones de años, sin embargo muchos aspectos de su fisiología permanecen similares (Boman & Hultmark, 1987). El sistema inmunológico innato (Klein, 1997; Arala-Chaves & Sequeira, 2000), de insectos y mamíferos, a diferencia del sistema inmunológico adaptable de mamíferos, comparte un alto grado de similaridad estructural y funcional (Ratcliffe, 1985; Hoffman, 1995). En particular, un número de rasgos de la respuesta inmune innata son comunes a mamíferos y a insectos (Hoffman, 1995; Fallon & Sun, 2001) y el análisis de respuestas de insecto a patógenos puede proporcionar indicios de la respuesta a la infección en vertebrados (Hoffman, 1995; Kimbrell & Beutler, 2001). Dado que la respuesta inmune innata es la línea principal de defensa de los vertebrados contra muchos patógenos microbianos (Levy, 2001), los esfuerzos se han enfocado en el examen de las respuestas de mamíferos y de insectos a la infección microbiana y se ha demostrado una fuerte correlación entre ambos sistemas (Salzet, 2001). La respuesta antimicrobiana hacia patógenos ha sido conservada en el curso de evolución. Sin embargo, las respuestas antimicrobianas no son idénticas entre plantas, invertebrados y vertebrados. El punto convergente de muchos estudios durante las dos décadas pasadas, es que la respuesta innata en vertebrados parece a un mosaico de diferentes mecanismos inmunes de invertebrados, hacia patógenos (Salzet, 2001).

1.2 Sistema inmune innato de insectos

EI sistema inmunológico de los insectos es simple, eficiente, y todavía enigmático. Se ha observado hipervariabilidad somática de *Ig* en *Anopheles* y *Drosophila* (Dong *et al.,* 2006; Watson *et al.,* 2005) y puede representar versiones ancestrales de la inmunidad adaptativa, aunque su evolución e importancia funcional en este contexto no está claro. Los insectos emplean otros mecanismos bien caracterizados. Entre ellos se encuentran receptores de reconocimiento de patrones, que reconocen determinantes moleculares únicos para diferentes clases de microorganismos patógenos (Bischoff *et al.,* 2004; Janeway & Medzhitov, 2002; Lemaitre *et al.,* 1996).

1.3 Inducción de la respuesta inmune innata en insectos

Los insectos responden al desafío de agentes microbianos o a lesiones, mediante la rápida y transitoria síntesis de potentes compuestos antimicrobianos. Numerosas proteínas del sistema inmune provenientes de insectos que inhiben microorganismos *in vitro* han sido identificadas, caracterizadas y clonadas. La mayor parte de las cuales exhiben actividad antibacteriana, mientras que en otras se demostró que afectan a los hongos (Cociancich *et*

al., 1994; Hoffmann, 1995; Hoffmann *et al.*, 1996; Gillespie *et al.*, 1997). Sin embargo, existe evidencia de que la respuesta inmune humoral del insecto incluye la liberación de inhibidores de proteasas dentro de la hemolinfa (Boucias & Pendland, 1987; Vilcinskas & Wedde, 1997). Se cree que los inhibidores desempeñan múltiples funciones en el sistema de defensa del insecto, además de la regulación de las proteasas endógenas, por ejemplo, que participan en la activación de la cascada de la coagulación y la activación de mediadores profenoloxidasa, que podrían ser liberados durante la respuesta inmune humoral para inactivar las proteasas que son liberadas por los patógenos invasores (Kanost & Jiang, 1996).

1.4 Mecanismos de defensa de los insectos en orden de actuación

1.4.1 La cutícula.

La primera línea de defensa en insectos contra la mayoría de patógenos es la cutícula, que tiene una función análoga a la piel en mamíferos. La cutícula es una barrera estructural y químicamente compleja diseñada para prevenir o retardar la entrada de patógenos en el hemocele (la cavidad de cuerpo) (Clarkson & Charnley, 1996). La capa externa de la cutícula (la epicutícula) está cubierta por una capa serosa que contiene lípidos, ácidos grasos y esteroles, que puede mostrar propiedades antimicrobianas (Lecuona 1997). La cutícula en sí misma consiste en fibras de quitina integrando una matriz de proteínas. La cutícula intacta previene la entrada de patógenos microbianos, pero una vez que se rompe, por herida o degradación, aumenta la posibilidad de infección. La lesión puede ser tapada y posteriormente reparada para restaurar la integridad estructural y funcional de la cutícula (Teetor-Barsch & Roberts, 1983). La herida en la cutícula activa la respuesta humoral inmune, que conduce a la producción de cecropinas y atacinas, que muestran actividad antibacteriana (Kavanagh & Reeves, 2004).

1.4.2 La Hemolinfa.

La cavidad del cuerpo del insecto o hemocele, contiene la hemolinfa, con funciones análogas a la sangre en mamíferos, esto es, transporte de sustancias nutritivas, residuos y moléculas de señalización (Matha & Mracek, 1984) aunque no juega ningún papel en la respiración. Además, la hemolinfa contiene células y péptidos antimicrobianos capaces de inmovilizar y matar los microorganismos invasores (Vilmos & Kurucz, 1998; Salzet, 2001). El volumen de hemolinfa dentro de un insecto varía según la especie y aún dentro de una especie varía dependiendo la etapa del desarrollo individual del insecto (Ratcliffe, 1985). Se ha demostrado que la respuesta inmune del insecto ante los microorganismos, implica un cambio de la circulación y la población de hemolinfa y la síntesis de nuevas proteínas hemolinfáticas (Engstrom *et al.*, 1984). La hemolinfa es la principal fuente de respuesta inmune a microorganismos, dicha respuesta inmune innata consiste en los mecanismos celulares y humorales que están fuertemente interconectados (Kavanagh & Reeves, 2004).

1.5 Elementos celulares de la hemolinfa

La hemolinfa del insecto contiene hemocitos, que funcionan de una manera similar a los fagocitos de mamíferos. La mayoría de hemocitos circulan libremente dentro de la hemolinfa pero un número significativo (hasta el 30 % en algunas especies de insectos)

pueden ser encontrados asociado con órganos internos como el cuerpo graso, tráquea o sistema digestivo (Ratcliffe, 1985). La densidad de hemocitos varía según el grado de infección y el tipo de patógeno (Matha & Mracek, 1984; Gagen & Ratcliffe, 1976). Al menos seis tipos de hemocitos han sido identificados en lepidópteros (p.ej. *Galleria mellonella*) aunque pueden existir más tipos en otras especies (Boman & Hultmark, 1987). Se han clasificado los hemocitos como: prohemocitos, plasmatocitos, granulocitos (células granulares), coagulocitos, esferulocitos y oenocitoides (Price & Ratcliffe, 1974). Aunque estudios posteriores han proporcionado una clasificación alternativa que contiene nueve grupos. Los prohemocitos (6-13 µm de diámetro) son pequeñas células redondas con núcleos grandes, que se dividen y se pueden distinguir de otros tipos de células. Los plasmatocitos (40-50µm) y granulocitos (45µm) son células predominantemente fagocitarias. Los plasmatocitos contienen enzimas lisosomales y son el tipo de células más abundantes. Los granulocitos poseen un núcleo relativamente pequeño y gránulos ricos en citoplasma. Los esferulocitos son células ovales o redondas (25µm) con variación del número de pequeñas inclusiones esféricas**.** Los oenocitoides son células grandes, binucleadas, no fagocitarias que pueden contener profenoloxidasa. Los coagulocitos también han sido llamados hematocitos hialinos y están implicados en el proceso de producción de coagulo (*clotting*). Los adipohemocitos son caracterizados por la presencia de gotitas de grasas. Los plasmatocitos y granulocitos participan en la fagocitosis, la formación de nódulo y la encapsulación (Brehelin, 1986; Tojo *et al.,* 2000), que son elementos importantes de la defensa celular del insecto contra bacterias y hongos (Walters & Ratcliffe, 1983).

1.5.1 La fagocitosis.

A pesar de que el proceso de fagocitosis en insectos no está totalmente entendido, los receptores de la superficie de plasmatocitos y granulocitos son similares a los receptores de fagocitos de mamíferos (Vilmos & Kurucz, 1998). El proceso de fagocitosis en insectos y mamíferos parece ser muy similar. En ambos casos hay unión de ligandos opsónicos a la superficie de la partícula que entonces es seguida del reconocimiento por receptores específicos. Una cascada intracelular causa la internalización del cuerpo extraño. Al principio, se pensaba que sólo los plasmatocitos estaban implicados en la fagocitosis de material extraño en *G. mellonella*, sin embargo se ha demostrado que células granulares también estaban implicadas (Tojo *et al.,* 2000). La activación de la cascada profenoloxidasa (PPO) es requerida por las células granulares para unirse a materias extrañas y llevar a cabo la fagocitosis, mientras que se requiere calcio para la adherencia de plasmatocitos. La fagocitosis es un proceso mediado por lectinas y estas se encuentran en la hemolinfa del insecto junto con lisozima, una proteína antimicrobiana por lo general asociada con la respuesta humoral. La lisozima ha sido encontrada dentro de los hemocitos y los niveles de lisozima y lectina intra-haemolinfa se incrementan sobre la infección, lo que indica que este es un efecto de sinergia con el proceso de fagocitosis (Tojo *et al.*, 2000; Wilson & Ratcliffe, 2000).

En la invasión con bacterias Gram negativas, lectinas específicas como la N-acetylglucosamina (GlcNA; BDL-2) reconocen y se unen al peptigoglicano de la superficie de la célula bacterial. Estas lectinas se unen a plasmatocitos facilitando la fagocitosis. Al

mismo tiempo, la lisozima degrada la capa de peptidoglicano y liberan los azúcares, exponiendo el ácido teicóico y los lipomannanos que son reconocidos por las lectinas BDL-1. Este proceso da al insecto la capacidad de reconocer y engullir una gama de bacterias a pesar de la naturaleza cambiante de la superficie bacterial expuesta (Wilson & Ratcliffe, 2000). Esto también indica como las defensas celulares y humorales de los sistemas inmunológicos innatos cooperan para combatir la infección. La explosión oxidativa en el metabolismo asociado con la fagocitosis ha sido interpretada como indicación de que el oxígeno se ha convertido en productos antimicrobianos y en una verdadera fábrica de fagocitos. Se ha demostrado *in vitro*, una batería de intermediarios reactivos del oxígeno (ROI) para matar microorganismos (Morel *et al.*, 1991; Klebanoff, 1980). La producción de ROI también ha sido descubierta en la hemolinfa y hemocitos de muchos insectos. La generación *in vitro* de ROI fue estudiada por el método de reducción de azul de nitro-tetrazolium (Glupov *et al.*, 2001) y fue observada en hemocitos de *G. mellonella, Aporía crataegi, Dendrolimus sibiricus* y *Gryllus bimaculatus*. Con el empleo de una sonda fluorescente, se probó, tanto la producción de superóxido como la dismutación del peróxido de hidrógeno, producto que fue encontrado en plasmatocitos de larvas de *D. melanogaster* (Nappi & Vass, 1993) y de modo similar, utilizando *electron spin resonance spectroscopy* (ESRS), se demostró en *G. mellonella* (Slepneva *et al.*, 1999; Klebanoff, 1980; Morel *et al.*, 1991; Nappi & Vass, 1993; Slepneva *et al.*, 1999; Glupov *et al.*, 2001). Los estudios de peroxinitrito *in vitro*, muestran que es un oxidante fuerte que posee propiedades sumamente citotóxicas contra *E. coli* (Hurst & Lymar, 1997), parásitos como *Trypanosoma cruzi* (Denicola *et al.*, 1996) o en hongos como *Candida albicans* (Vázquez-Torres *et al.*, 1996).

1.5.2 La nodulización.

Los nódulos son formados en respuesta a invasión de un gran número de microorganismos (Dunn, 1986), están formados por hemocitos viables y degradados, por materiales extraños y residuos melanizados, que puede estar conectados al tejido o rodeados por los hemocitos. La formación de nódulo en insectos no ha sido totalmente caracterizada aunque se sabe que es mediada por lectinas (Vilmos & Kurucz, 1998). Una lectina, la Scolexin, se piensa, que está implicada en la formación de nódulo en *Manduca sexta*, donde es producida por células epidérmicas y del intestino medio sobre la infección del insecto, o después de la invasión por bacterias (Dunn, 1986; Kavanagh & Reeves, 2004).

1.5.3 La encapsulación.

Las estructuras grandes como protozoos, nemátodos, huevos y larvas de parásitos de insectos, entre otros, son encapsuladas, al ser rodeadas por capas de hemocitos, que forman la cápsula por superposición de capas de células (Boman & Hultmark, 1987). La formación de cápsula comienza a los 30 minutos de la entrada de los patógenos, inicialmente implica la unión de células granulares al objetivo, seguido por la unión de plasmatocitos que son atraídos al sitio por plasmatocitos que difunden péptidos (PSP), que son liberados por granulocitos e inducen la agregación (Vilmos & Kurucz, 1998). El estudio de Vilmos & Kurucz (1998) en *G. mellonella* mostró el enriquecimiento de una proteína de 47kDa en una etapa temprana de encapsulación, la secuencia de aminoácidos reveló que esta proteína compartía una fuerte homología entre la calreticulina, de humano y de *Drosophila* (Choi *et al.*, 2002). Los factores humorales también pueden estar implicados en la encapsulación

expresamente en el reconocimiento y unión a material extraño. Se ha demostrado que los receptores de reconocimiento humoral se unen al material extraño y estimulan la agregación de plasmatocitos al objetivo (Lavine & Strand, 2001; Choi *et al.,* 2002).

1.6 Inmunidad humoral

La respuesta humoral inmune de insectos consiste en procesos de la hemolinfa: melanización, producción de coagulo (clotting) y cicatrización en respuesta a la herida (Vilmos & Kurucz, 1998). Adicionalmente, la respuesta humoral también implica la síntesis de una gama de péptidos antimicrobianos y proteínas de choque térmico (Salzet, 2001). Aunque los insectos no produzcan anticuerpos, ellos son capaces de generar una serie de proteínas que confieren un grado de inmunidad no específica ante una amplia gama de microorganismos. Los factores humorales implicados en la inmunidad del insecto ante la infección, incluyen lisozimas, lectinas y la cascada de profenoloxidasa (Dunphy *et al.,* 1986), serin-proteasas y carbohidrasas (da Silva *et al.,* 2000; Salzet, 200).

1.6.1 Mecanismos de producción de coágulo (clotting).

Hay dos mecanismos característicos de la producción de coágulo en insectos, el primero implica la polimerización de proteínas coagulables y es catalizado por una transglutaminasa dependiente de calcio (Sritunyalucksana & Soderhal, 2000). Las proteínas coagulables son lipoforinas y proteínas tipo vitellogeneinas, que contienen una región rica en cisteína, homóloga al dominio "d" de las proteínas coagulables de mamíferos del factor de Von Willebrand (Vilmos & Kurucz, 1998) que está implicado en el proceso de coagulación de la sangre. El segundo mecanismo de coagulación es la cascada de coagulación de hemocitos derivados, donde las proteínas coagulables se liberan del citoplasma, los L-gránulos de los hemocitos en la hemolinfa, en respuesta a la activación por componentes de la pared celular de los microbios invasores. Las bacterias Gram negativas activan el factor C, mientras que los hongos activan el factor G que causa un cambio conformacional (Klein, 1997). Esto conduce a la ruptura del factor B por una serin-proteasa, que a su turno conduce a la escisión de la enzima pro-clotting (PCE), la cual cataliza la ruptura de la proteína soluble coagulogena, en coagulina que es un agregado insoluble que forma un coágulo parecido a un gel que atrapa patógenos (Sritunyalucksana & Soderhal, 2000).

1.6.2 La melanización.

El proceso de melanización es clave en la defensa contra una amplia gama de patógenos y causa la deposición de melanina sobre el microbio dentro de la hemolinfa (Ratcliffe, 1985). La formación de melanina es catalizada por la fenoloxidasa-monofenilo (PO) L-dopa, una oxígeno oxidoreductasa (CE 1.14.18.1). PO es encontrada en insectos en su forma inactiva pro-fenoloxidasa (ProPO) localizada en hemocitos como un zimógeno. Este es liberado a partir de hemocitos por la ruptura y es activamente transportado a la cutícula o depositado alrededor de heridas o actúa encapsulando el parásito. PO cataliza la o-hidroxilación de monofenoles y oxidación de fenoles para las quininas que entonces polimerizan no enzimáticamente para formar melanina (Soderhall & Cerenius, 1998). La ProPO del insecto tiene una secuencia similar a la región tiolester de las proteínas de complemento C3 y C4 de vertebrados. En vertebrados, seguido de la escisión por activación de la proteasa de la región del éster de tiol que se hace activa y puede reaccionar con hidroxilos o grupos amino

sobre superficies biológicas que conducen a immobilización de la molécula sobre el material extraño. El proceso de melanización es iniciado por receptores de reconocimiento de patrones que se unen a las superficies del objetivo, así, la iniciación de la cascada de serin-proteasa que conduce a la ruptura de ProPO a PO y en última instancia, a la reticulación y a la melanizacion de proteínas. Este proceso es mencionado con frecuencia como la activación del sistema Profenoloxidasa (ProPO-AS). Los receptores de reconocimiento de patrones (RRPs) activan el sistema de complemento en vertebrados y el sistema ProPO-AS en insectos. Un número de RRPs están presentes en insectos, e incluye: las lectinas tipo C las cuales se unen a LPS bacterial, la proteína de reconocimiento de peptidoglucano, que es expresada en el cuerpo graso, hemocitos y células epiteliales y la unión de la proteína B-1,3-glucano, reconoce glucano fúngico y activa la vía de ProPO-AS. La cascada de serin-proteasa que controla la ruptura de ProPO o PO es altamente controlada y contrabalanceada por inhibidores de proteasas, ya que la reacción debe ser mantenida cerca del sitio de invasión porque el PO activo puede producir intermedios de oxígeno sumamente reactivos y perjudiciales (Soderhall & Cerenius, 1998; Kavanagh & Reeves, 2004).

Las células inmunes de mamíferos expresan varios receptores tipo *Toll* (TLR) que son considerados PPRs celulares, porque reconocen directamente lipopolisácaridos (LPS) y otros productos microbianos. En el genoma de *Drosophila*, han sido identificados genes *Toll* y varios genes adicionales relacionados (*Toll -3-8*, *18 wheeler*) y el gen de inmunodeficiencia (*imd*) (Imler & Hoffmann, 2000). En 1997 Medzhitov *et al.,* clonaron el homólogo humano de *Toll* (TLR4) y hasta la fecha, diez miembros de la familia TLR se han identificado en seres humanos (Heine & Lein, 2003).

1.6.3 Producción de péptidos antimicrobianos.

La investigación sobre los sistemas inmunitarios de invertebrados, como insectos, ha mostrado que ellos han desarrollado una batería de péptidos naturales antibacterianos, como defensinas y cecropinas (Bulet *et al.,* 1999; Steiner *et al.,* 1981) como parte su respuesta innata a bacterias. Adicionalmente, los péptidos antibacterianos han sido identificados en las células glandulares de piel anfibia (p.ej. magaininas, dermaseptinas y ranalexina), en humanos (p.ej. defensinas, hadrurina y hepcidina), en plantas (p.ej. tioninas) péptidos antifúngicos de las semillas de *Phytolacca americana* (PAFP-S), reflejan la naturaleza universal de tales mecanismos de defensa natural (Lehrer & Ganz, 1999; Huttner & Bevins, 1999).

Los insectos constan de por lo menos 30 millones de especies y colonizan todos los nichos ecológicos terrestres (exposición a la casi totalidad de microorganismos), es fácil imaginar el formidable arsenal terapéutico potencial representado por los péptidos antimicrobianos de insectos (Dimarcq *et al.,* 1998; Boman, 2003). En los insectos, el papel de los péptidos anti-infecciosos se demostró principalmente en *D. melanogaster*, donde el estudio de mutantes y varias mutagénesis sucesivas han permitido poner en evidencia el papel de diversos genes que codifican para los péptidos antimicrobianos que aseguran la defensa del organismo frente a los patógenos (Hoffmann, 2003; Hetru *et al.,* 2003).

Aunque las respuestas celulares y humorales anteriormente descritas, sean eficaces contra la invasión microbiana, está totalmente claro que el hemocele es incapaz de defenderse si entra un gran número de microorganismos. La última línea de defensa, es la síntesis de una gama de péptidos antimicrobianos, que son liberados en la hemolinfa donde ellos atacan los elementos de la pared celular bacterial o fúngica (Ratcliff, 1985). Estos péptidos juegan un papel crucial en el combate de la infección y clases similares de proteínas son encontradas en vertebrados, invertebrados y plantas (Vilmos & Kurucz, 1998; Salzet, 2001). Los sitios principales de síntesis de péptidos antimicrobianos en el insecto son el cuerpo graso, los hemocitos, la vías digestivas, las glándulas salivales y el tracto reproductivo. Las funciones del cuerpo graso como órgano biosintético, son análogas al hígado en mamíferos, allí son producidos un buen número de péptidos y todos son anfipáticos, es decir, son moléculas básicas que actúan de una manera parecida a un detergente sobre las membranas de células causando la muerte del microorganismo por lisis celular. Los péptidos antimicrobianos son sintetizados como pre-proproteinas en un rango hasta 100 veces más rápido que la inmunoglobulinas IgM en mamíferos (Lowenberger, 2001). Su pequeño tamaño permite la difusión por la haemolinfa para neutralizar la invasión de patógenos (Salzet, 2001; Kavanagh & Reeves, 2004).

1.6.3.1 Los péptidos antimicrobianos efectores de la inmunidad innata.

Los péptidos antimicrobianos son uno de los elementos clave de la defensa inmunitaria innata, llamada no adaptativa de los organismos multicelulares animales y vegetales. Son las principales moléculas efectoras de la inmunidad innata. Ellos aseguran la defensa de los organismos multicelulares contra la mayoría de los patógenos terrestres. En los insectos, ellos actúan en cooperación con las células tipo macrófagos. En respuesta a una agresión, la expresión de los genes que codifican para estos péptidos anti-microbianos presentan diferentes perfiles y puede ser: local o sistémica constitutiva o bien, inducida (Hoffmann *et al.*, 1999; Lehrer & Ganz, 1996; Ganz & Lehrer, 1998). En la mayoría de los casos, la expresión de péptidos antimicrobianos es local: células fagocitarias, epitelio (cutáneo, respiratorio, digestivo, urinario, aparato genital) y secreción en los animales; semillas, raíces y hojas en el caso de las plantas. Los insectos son la excepción a la regla puesto que son los únicos en producir péptidos antimicrobianos dentro del cuadro de una respuesta sistémica inducible (Hoffmann *et al.*, 1999). Los péptidos son así secretados en la hemolinfa en respuesta a una agresión microbiana. Es de señalar que los insectos, que están desprovistos de toda inmunidad adquirida, no poseen lifoncitos ni anticuerpos (Hoffman *et al*, 1999; Andrès & Dimarcq, 2007).

1.6.3.2 Aspectos estructurales de los péptidos antimicrobianos (AMPs).

Se trata de un vasto conjunto de péptidos, más de 500 AMPs han sido identificados, compuestos en promedio de 20 a 50 aminoácidos, únicamente de tipo levógiro, que comparten un carácter catiónico y con propiedades anfifílicas. Su diversidad estructural es grande, dan originen a tres grandes familias de péptidos antimicrobianos catiónicos:

● Péptidos lineales que forman hélices (Boman, 1998; Berkowitz *et al.,* 1990)
● Péptidos ricos en cisteína con uno o varios puentes disulfuro (Dimarcq *et al.,* 1998; Lehrer & Ganz, 1996; García-Olmedo *et al.,* 1998)
● Péptidos que contenien un porcentaje elevado de un solo tipo de aminoácido (van Abel *et al.,* 1995; Bulet *et al.,* 1999).

Las cecropinas (4 kDa) y las magaininas (2 kDa) son los prototipos de péptidos fuertemente catiónicos, formando hélices α (Boman, 1998; Berkowitz *et al.,* 1990) Las cecropinas fueron los primeros péptidos antimicrobianos catiónicos enteramente caracterizados, a partir de ninfas de la mariposa *H. cecropia,* a comienzo de los años 1980 por (Boman, 1998). Dentro de las familias del segundo grupo de péptidos ricos en cisteína (de 2 a 5 kDa) figuran las defensinas α y β de mamíferos (Lehrer & Ganz, 1996), de insectos y de plantas (Dimarcq *et al.,* 1998; García-Olmedo *et al.,* 1998). El elemento de base de estas moléculas incluyen une hélice α y hojas β estabilizadas por puentes disulfuro (Hoffman, 2003; Andrès & Dimarcq, 2007).

1.6.3.3 Mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos.

El mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos es bien conocido para los péptidos de hélices alfa tales como las cecropinas y las magaininas (aisladas del xénope). Estos péptidos matan los microorganismos al permeabilizar su membrana por un efecto tipo detergente que puede estar acompañado de la formación de poros (Hancock & Rozek, 2002; Hwang & Vogel, 1998). Se debe señalar que este mecanismo de acción es muy rápido, la concentración puede ser dependiente e independiente de la interacción con un blanco molecular único, de donde se observa la ausencia potencial del fenómeno de resistencia (Hancock, 2001). Así, la defensina de *Phormia* desestabiliza instantáneamente la membrana citoplasmática de *Micrococcus luteus*, que conduce a una pérdida de potasio y una parada de la respiración que conduce a la muerte del microorganismo en menos de un minuto (Cociancich *et al.,* 1993). La especificidad de acción de los péptidos antimicrobianos reposa principalmente sobre las diferencias de composición y de las propiedades fisicoquímicas que distinguen las membranas microbianas de las membranas de las células del huésped. Es importante subrayar que un número creciente de estudios indican que los péptidos antimicrobianos pueden tener otras actividades biológicas en la lucha contra los microorganismos (Andrès & Dimarcq, 2007).

1.7 Similitudes entre la inmunidad de mamíferos y de insectos

Tanto los mamíferos como los insectos, son susceptibles a la depredación por microorganismos, y a los mecanismos por los cuales los patógenos establecen la infección (p. ej. la adherencia, la invasión, la extensión sistémica y la anulación de la respuesta inmune). En respuesta a estas infecciones, tanto mamíferos como insectos, han desarrollado una gama de mecanismos para protegerse. Algunos de estos mecanismos son la armadura del sistema inmunológico adaptable o adaptativo, barreras físicas a la infección y sistemas inmunológicos innatos que son comunes tanto a mamíferos como a insectos y muestran homología en la función (Hoffmann *et al.,* 1999; Silverman & Maniatis, 2001).

La inmunidad innata de *D. melanogaster* emplea receptores de reconocimiento de patrones (RRPs), un mecanismo evolutivamente primitivo, para descubrir la invasión de organismos extranjeros (Janeway, 1989). Los RRPs descubren un pequeño número de patrones moleculares asociados a patógenos, sumamente conservados o PAMPs, estas estructuras son encontradas sobre la superficie de microorganismos invasivos. La detección de PAMPs por los RRPs presenta una serie de vías específicas de señalización, esto causa la producción selectiva de AMPs y especies reactivas de oxígeno, el cual juega un papel importante en el sistema inmunológico innato del insecto (Royet, 2004). Dos vías, *Toll* e *Imd*, controlan la producción AMPs y otras proteínas immuno-reactivas en el cuerpo graso de *D. melanogaster* adulta (Imler & Hoffmann, 2000). Ambas vías contienen componentes con homología a la de su contraparte en mamíferos: el receptor TIR interleukina 1/*toll-like* y el factor de necrosis tumoral (Hoffmann *et al.,* 1999; Hoffmann, 2003). *D. melanogaster* produce al menos siete distintos AMPs (Bulet *et al.,* 1999; Ekengren & Hultmark, 1999), donde la expresión del AMP Drosomicina parece ser controlada por la vía *Toll* (Tzou *et al.,* 2000). No es claro, como la expresión antibacteriana de este AMP es controlada, las evidencias experimentales indican que aquellas interacciones ocurren entre la vía *Toll* y la vía *Imd* (Hedengren-Olcott *et al.,* 2004) donde parece que la vía *Imd* principalmente responde a bacterias Gram negativas y la vía *Toll* a bacterias Gram positivas (Royet, 2004; Imler & Hoffmann, 2000; Hoffmann & Reichhart, 2002). En contraste, la fagocitosis de los microorganismos invasores es realizada por varios tipos de células de mamífero, un grupo principal son los neutrófilos. La hemolinfa de insecto ha mostrado que contiene una gama de hemocitos que parece desempeñar un papel similar a los neutrófilos humanos. Estudios recientes han indicado que el mecanismo de fagocitosis empleado por los hemocitos de *G. mellonella* contra las bacterias, implican la producción de especies reactivas de superóxido por inducción de la NADPH oxidasa, tal como se observa en neutrófilos de mamíferos (Bergin *et al.,* 2005). *D. melanogaster* también posee un robusto ARN de interferencia (RNAi), sistema homólogo al silenciamiento de genes post-transcripcional (PTGS). El RNAi inicialmente fue identificado en plantas, empleado como un mecanismo de defensa contra virus y más tarde se identificó en animales. Se ha demostrado que un RNAi es usado por *D. melanogaster* como medio para combatir infecciones virales (Zambon *et al.,* 2006; Tzou *et al.,* 2000; Onfelt-Tingvall *et al.,* 2001; Kemp & Massey, 2007).

1.8 Insectos modelos empleados en estudios de patogenicidad de hongos

1.8.1 *Drosophila melanogaster*.

D. melanogaster es un modelo eficaz para el estudio de patogénesis fúngica, dado que varias herramientas genéticas están disponibles para este organismo, incluyendo el genoma secuenciado (Adams *et al.,* 2000) y microarreglos de ADN, de las moscas desafiadas por el hongo, para detección de genes de la defensa inmune (Irving *et al.,* 2001). En el laboratorio, *D. melanogaster* puede ser infectado por patógenos fúngicos, utilizando varios métodos, como inyección, rociado directo de esporas fúngicas o por ingestión de la mosca. Este modelo de insecto ha proporcionado el entendimiento de varios mecanismos de la defensa del huésped, incluyendo barreras físicas como la cutícula y membrana quitinosa, fagocitosis, vía *Toll* y vía *Imd* (Ausubel, 2005). La vía *Toll*, que ha mostrado ser eficaz para responder y defenderse contra patógenos fúngicos, así como contra algunas bacterias

(Irving *et al.,* 2001; Alarco *et al.,* 2004; Lemaitre *et al.,* 1996), es conservada en mamíferos (Hoffmann *et al.,* 1999).

Los estudios en esta mosca han arrojado luz sobre los componentes clave del sistema inmune innato que se aplican incluso a los mamíferos, y prometen proporcionar enfoques útiles para la investigación de fármacos antifúngicos y proporcionan conocimientos fundamentales y nuevos enfoques prácticos a las preguntas acerca de la relación hongo-patógeno y tratamiento (Levitin & Whiteway, 2008)

1.8.2 Lepidópteros como modelos emergentes.

La respuesta inmune innata de las larvas (orugas) de lepidópteros se ha investigado durante más de 40 años, igualmente se había mencionado que una ventaja de las larvas de polillas para los análisis bioquímicos y estudios de la función de hemocitos, es su tamaño y gran volumen de hemolinfa, que son mucho mayores que la mayoría de los insectos. Estas especies son fáciles de criar en el laboratorio y se han utilizado ampliamente para la investigación en la fisiología y la bioquímica de insectos. Las larvas de gusano de seda, *Bombyx mori,* y de *M. sexta*, están siendo investigados como modelos potenciales en estudios de patógenos de humanos. El empleo de *M. sexta*, permite que el modelo pueda ser incubado en 37°C, que es la temperatura fisiológicamente relevante para patógenos de mamíferos. *B. mori* ha sido empleado *in vivo* para evaluar la eficacia de antibióticos contra las bacterias patógenas humanas, *Pseudomonas aeruginosa, Vibrio cholerae, Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* (Kaito *et al.,* 2002). La presencia de bacterias o de hongos en el hemocele de *M. sexta* estimula la respuesta celular y la humoral (Kanost *et al.,* 2004).

1.8.3 *Galleria mellonella.*

Las larvas de la polilla de cera mayor, *Galleria mellonella*, criadas en condiciones controladas son grandes (mayores de 250 mg), este modelo disponible en el comercio, muestra promisoria significación, en particular en el campo de la selección de virulencia (Jander *et al.,* 2000). Aunque no se encuentra totalmente caracterizado como *D. melanogaster*, *G. mellonella* posee un sistema de defensa con varias semejanzas con mamíferos, teniendo un sistema circulatorio y una compleja respuesta inmune innata que implica la producción de superóxido por células fagocitarias y la producción de proteínas antimicrobianas (Bergin *et al.,* 2005; Jander *et al.,* 2000; Mullett *et al.,* 1993). *G. mellonella* (con una cutícula intacta) parece ser bastante impermeable a la exposición ambiental, a bacterias patógenas como *P. aeruginosa*, pero es exquisitamente sensible a la administración sistémica, es así que una baja concentración de una bacteria puede ser suficiente para causar muerte (Jander *et al.,* 2000; Mullett *et al*., 1993). Varios investigadores han utilizado esta sensibilidad para desarrollar modelos para pruebas *in vivo* de patogenicidad bacterial y fúngica. Cotter *et al.* (2000) usaron *G. mellonella* para estudiar la patogenicidad de cepas de *C. albicans y Sacchromyces cervisiae*. Otros trabajos demostraron una fuerte correlación en la virulencia encontrada en *G. mellonella* y datos obtenidos de los sistemas modelo murino (Brennan *et al.,* 2002). *G. mellonella* se ha empleado para investigar la patogenicidad de *A. fumigatus*, el cual es un patógeno fúngico que causa una significativa morbi-mortalidad en pacientes neutropénicos (Daly & Kavanagh, 2001; Reeves *et al*., 2004; Kavanagh & Reeves, 2004).

Mylonakis *et al.*, (2005) investigaron la respuesta inmune del huésped a la infección y los efectos de compuestos antifúngicos sobre *G. mellonella* infectada por *C. neoformans*. Los datos de este estudio mostraron varios genes (CAP59, GPA1, RAS1, and PKA1), implicados en la virulencia de *C. neoformans* en mamíferos y que también jugaban un papel importante en la infección en *G. mellonella* (Kemp & Massey, 2007).

1.9 Comparación entre modelos para estudios de patogenicidad

1.9.1 Ventajas de *D. melanogaster*.

D. melanogaster es actualmente el modelo de primera opción para los estudios detallados de la respuesta inmune innata del huésped al desafío microbiano, interacciones de célula de huésped-patógeno, y es el único modelo de insecto actualmente utilizado para modelar las interacciones de virus con el huésped insecto (Bergin *et al.*, 2005; Kemp & Massey, 2007). Además, la secuenciación de la totalidad de su genoma (de Gregorio *et al.*, 2001) y la creación de bibliotecas de RNAi (Foley & O'Farrell, 2004), permiten la desactivación selectiva de genes específicos y la disponibilidad de cepas mutantes, facilitando los estudios de diferentes aspectos de su respuesta inmune a patógenos fúngicos (Arvanitis *et al.*, 2013).

1.9.2 Desventajas de *D. melanogaster* y otros huéspedes invertebrados.

Las desventajas principales de *D. melanogaster* como modelo, son su pequeño tamaño y el poco volumen de hemolinfa que se puede obtener, lo que hace que el manejo técnico de la mosca pueda limitar su empleo en usos que hacen necesario análisis bioquímico de la hemolinfa o inyección de compuestos antimicrobianos (Kemp & Massey, 2007). Además, *D. melanogaster* tiene que ser propagado a aproximadamente 22°C, que no es una temperatura ideal para investigar las interacciones con los patógenos de mamíferos, que por lo general ocurren a 37°C. Tanto *D. melanogaster* como *Caenorhabditis elegans*, no facilitan la prueba a 37°C y por lo tanto los hongos no se estudian en las condiciones de temperatura en la que son patógenos para el huésped humano, además las variaciones de temperatura pueden afectar la expresión génica (Chamilos *et al.*, 2007; Fuchs *et al.*, 2010).

1.9.3 Ventajas al emplear *G. mellonella* para estudios de patógenos fúngicos.

Las larvas de insectos lepidópteros, tales como la polilla de cera de mayor *G. mellonella* y el gusano de seda *B. mori* han sido utilizados con éxito como modelos de patogénesis fúngica debido a su tamaño relativamente grande (alrededor de 2 cm y 5 cm de largo, respectivamente), que permite la inyección de inóculos fúngicos estandarizados para estudios de la farmacodinámica (Mylonakis *et al.*, 2005; Brennan *et al.*, 2002; Hamamoto *et al.*, 2004). Además, los estudios *in vivo* de la función de las células fagocíticas son factibles con estos invertebrados (Bergin *et al.*, 2003; Bergin *et al.*, 2005). Es importante destacar que, aunque su temperatura óptima de crecimiento y mantenimiento es 29°C, las larvas de *G. mellonella* son capaces de sobrevivir a la temperatura fisiológica de los mamíferos (37°C), lo cual permitiría la expresión de ciertos factores de virulencia de patógenos fúngicos regulados por la temperatura. Sin embargo, los efectos del aumento de la temperatura en la respuesta inmune de *G. mellonella* no han sido estudiados en detalle. Algunos autores han demostrado que *G. mellonella* muestra un aumento de la susceptibilidad a los hongos patógenos a la temperatura fisiológica de mamíferos

(Mylonakis *et al.*, 2005). Por el contrario, en todos los demás modelos invertebrados, los experimentos de infección se hacen típicamente a las temperaturas óptimas de cría, que van desde 22°C a 30°C (Pradel & Ewbank, 2004).

1.9.4 Desventajas del uso de *G. mellonella.*

G. mellonella y modelos menos desarrollados como *M. sexta* y *B. mori* están poco caracterizados genéticamente en comparación con *D. melanogaster*, aunque estudios adicionales de caracterización, similar a aquellos de Bergin *et al*., (2006) y nuevos estudios genéticos y proteómicos, sumados a la utilización de nuevas tecnologías de biología computacional, ayudarán a llenar los vacíos existentes (Kemp & Massey, 2007; Chamilos *et al.*, 2007; Vogel *et al.*, 2011).

1.10 Ciclo Biológico de *G. mellonella*

La polilla mayor de la cera, *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) es una lepidóptera que se distribuye ampliamente en todo el mundo, excepto en climas muy fríos y en grandes altitudes (Cardoso *et al.*, 2007; Ellis *et al.*, 2013). Es una de las plagas más importantes de las colmenas de las abejas. Se alimentan de la cera, la miel y el polen almacenados en los panales de las colonias activas de abejas dónde construye galerías y puede destruir por completo la colmena (Nurullahoglu & Susurluk, 2001). Es una especie muy utilizada en los estudios de patología y fisiología de los insectos (Coskun *et al*., 2006), de genómica, de proteómica y en una variedad de campos de la genética molecular y también se cría para utilizar a las larvas como cebo para peces o alimento para reptiles y anfibios (Ellis *et al.*, 2013). El ciclo biológico de *G. mellonella* varía de acuerdo a las condiciones de temperatura, pudiendo ser de 30 a 60 días con temperaturas óptimas que van desde los 26 a 38ºC, o de 5 meses con temperaturas más bajas. Del ciclo se distinguen las siguientes etapas: huevo, larva, pupa e imago-adulto (Cardoso *et al.*, 2007).

Los huevos son de color blanco nacarado o rosa claro y tiene una textura rugosa, y eclosionan rápidamente a temperaturas cálidas (29-35°C) y más lentamente por unos 30 días a temperaturas bajas (18°C). Los huevos no sobreviven a temperaturas extremadamente frías (menores de 0°C por 4,5 horas) o a temperaturas superiores a 46°C durante 70 minutos (Ellis *et al.*, 2013). Al eclosionar, las larvas son de color blanquecino y de 1-3 mm de longitud; las larvas recién nacidas inmediatamente comienzan a comer. Las patas torácicas están bien desarrolladas cuando la larva emerge, pero las patas abdominales no son visibles hasta que la larva tiene 3 días de edad. Las larvas mudan 7 veces a lo largo de su desarrollo. La mayor parte del crecimiento y el incremento de tamaño ocurren durante los dos últimos estadios. El desarrollo larvario dura 6-7 semanas a 29-32°C y alta humedad. Las larvas maduras miden aproximadamente 20 mm de longitud. Su cuerpo es de color gris con un escudo pro-torácico marrón con una banda ancha a través de ella. La cabeza es ligeramente puntiaguda, pequeña y de color rojizo con una abertura de la línea en forma de V hacia la parte delantera de la cabeza. Después de encontrar un lugar en la colmena para pupar, en hendiduras excavadas, la larva comienza a hilar la seda que se convertirán en el capullo (Paddock, 1918; Ellis *et al.*, 2013). La etapa de desarrollo pupal varía con la temporada y la temperatura entre 6-55 días (Williams, 1997). Las pupas presentan un tamaño de 5 a 7 mm de diámetro y de 12 a 20 mm de longitud (Paddock, 1918). El adulto

mide aproximadamente 15 mm de largo con una envergadura media de 31 mm. Las alas son de color gris, aunque la tercera parte del ala trasera, normalmente oculta, es de color bronce (Ferguson, 1987) Los machos son un poco más pequeñas que las hembras, de color más claro, las antenas de las hembras son 10-20% más largas que las del macho. Los imagos emergen en la tarde y buscan un lugar protegido para expandir y secar sus alas. Los adultos no se alimentan, y las hembras viven alrededor de 12 días, mientras que los machos cerca de 21 días (Paddock, 1918). El apareamiento se produce poco después de la emergencia de adultos, los machos atraen a las hembras mediante la producción de señales cortas de ultrasonidos. (Jones *et al.,* 2002). Las hembras buscan una grieta para poner los huevos, extendiendo su cuerpo con el fin de llegar con su aparato ovipositor tan profundo en la grieta como sea posible. En estudios de laboratorio, las hembras continuaron la oviposición de 3-13 días (Paddock, 1918). La hembra puede ovipositar más de 2.000 huevos en su vida, aunque el promedio es de aproximadamente 700 huevos (Warren y Huddleston, 1962).

1.11 Cría de *G. mellonella* con dieta artificial

Dado que este lepidóptero tiene diversos usos, existen un sinnúmero de métodos de cría disponibles en la literatura científica, por lo que es difícil de reconocer un método como el "estándar" de crianza. Sin embargo, la mayoría de los métodos de crianza son muy similares y comparten componentes comunes (Ellis *et al.,* 2013), tales como dietas multigranos, fuente de proteínas (Metwally *et al.,* 2012; Vilcinskas *et al.,* 1997), cera de abejas Coskun *et al*., 2006) y fuente de carbohidratos (Realpe-Aranda *et al.,* 2007), algunas dietas incluyen compuestos antimicrobianos para inhibir flora saprofita (Severine, 1992). Se han desarrollado diferentes dietas artificiales para la propagación masiva de *G. mellonella* para su uso como huésped tanto de bacterias (Mukherjee *et al.,* 2010) como de hongos (Vilcinskas *et al.,* 1997), parasitoides (Coskun *et al.,* 2006) y nematodos (Metwally *et al.,* 2012; Realpe-Aranda *et al.,* 2007).

2. METODOLOGÍA

2.1 Desarrollo de la colonia a nivel de laboratorio

2.1.1 Materiales y Equipos.

- Cámara para eclosión de los huevos: recipiente acrílico con soportes externos de caucho y tapa de muselina.
- Cámara de alimentación larval: recipiente acrílico con soportes externos de caucho y tapa provista de malla metálica.
- Cámara de apareamiento y ovoposición: frasco de vidrio con tapa provista de malla metálica.
- Recipientes plásticos grandes con tapa para preparación y almacenamiento de la dieta.
- Recipientes plásticos pequeños con tapa para almacenamiento de las tiras de huevos.
- Bandejas grandes y pequeñas para colocar las cámaras acrílicas.
- Tiras de papel parafinado plegado (1x10 cm) y dispuestas en zig-zag.
- Termómetro.
- Incubadora.

- Gabinetes con puerta no hermética para permitir la ventilación.
- Balanza.
- Estereoscopio.
- Refrigerador.

2.1.2 Condiciones ambientales de cría.

- Temperatura: de 28-32ºC para los huevos, entre 25 a 30ºC para la cría de larvas y adultos.
- Condiciones de oscuridad permanente y humedad cercana al 70%
- Asepsia (manejo de las larvas y del alimento con guantes de látex desinfectados)
- Desinfección (en recipientes de preparación de la dieta, en las cámaras y demás implementos para la cría de las larvas).

2.2 Inicio y mantenimiento de la colonia

Se adquirieron huevos de *G. mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) en el Centro de Agricultura Tropical CIAT de Palmira. Los huevos se colocaron cubiertos con alimento en la cámara de eclosión, de forma rectangular de 25x10x7cm, la cual es de material acrílico, la cámara se recubrió con muselina para permitir la aireación y evitar el paso de las diminutas larvas, la cámara se llevó a la incubadora y se mantuvo a 28-30 ºC.

Una vez se produjo la eclosión de los huevos, se mantuvieron en incubadora en la cámara de eclosión (28-30ºC) hasta que las larvas alcanzaron un tamaño adecuado (mayor de 3 mm) que impidiera su paso a través de la malla metálica de la cámara de alimentación larval, la cual consiste en un recipiente acrílico de 20x30x10 cm con tapa, provista de malla metálica debido a que las larvas poseen un aparato bucal capaz de atravesar el plástico y las telas de nylon, una vez allí las larvas, se les colocó diariamente alimento fresco en cantidad moderada, la cámara se situó sobre una bandeja con trampa de agua, se recubrió la parte externa de la cámara con vaselina para impedir el paso de hormigas y se mantuvo en oscuridad permanente a temperatura de 25-30ºC. Cuando las larvas llegaron a su último estadio de desarrollo larval, es decir, cuando comienzaron a subir a la tapa de la cámara y a producir la pupa y además alcanzaron el peso adecuado para los experimentos (230-330 mg), fueron colectadas para realizar los ensayos.

Se empleó un grupo de pupas para continuar la colonia, colocando alrededor de 30 pupas en la cámara de apareamiento y ovoposición, la cual consiste en frascos de vidrio de boca ancha de 20X15 cm, con tapa provista de malla metálica, de la cual se suspendió una mota de algodón con un gancho metálico; dentro de los frascos se colocaron tiras plegadas de papel parafinado de 10 cm de largo x 1 cm de ancho, dispuestas en zigzag para la postura de los huevos. Una vez, emergieronn los adultos, se depositó en el algodón una solución de miel de abejas al 10% todos los días para alimentarlos, las tiras fueron removidas cada 3 días, colocando una nueva tira, las tiras con huevos se llevaron a la cámara de cría, se cubrieron con alimento y se colocaron en la incubadora (28-30ºC) para recomenzar otro ciclo de crianza. Los adultos se descartaron cada 3-5 días; algunas tiras se conservaronn en refrigeración a 4°C durante máximo 8 días para evitar la pérdida de viabilidad de los huevos.

2.3 Renovación de la colonia

La colonia fue renovada cada seis meses con huevos adquiridos, a dos proveedores diferentes, en el Centro de Agricultura Tropical (CIAT) en Palmira, y con la empresa Productos Biológicos Perkins Ltda, Palmira.

2.4 Alimentación de las larvas

Las larvas fueron criadas con una dieta artificial desarrollada en el GIEM, compuesta por levadura seca, salvado de trigo, harina de maíz amarillo, leche en polvo, germén de trigo, miel de abejas, glicerina, cera de abejas. Las proporciones de cada uno de los componentes de la dieta se presentan la tabla 1. Los ingredientes sólidos se mezclaron en un recipiente plástico de 20x20x50 cm, con una cuchara de teflón hasta completa homogenización. Luego se adicionó gradualmente la miel de abejas, luego la glicerina y por último el formaldehido, con agitación continua, hasta que se obtuvo una mezcla pastosa homogénea. En un recipiente metálico se calentó suavemente la cera de abejas hasta la solubilización y se incorporó lentamente a la mezcla anterior, con agitación constante. El alimento preparado se conservó refrigerado a 4-8°C, por un mes (Vilcinskas *et al.*, 1997; Renwick *et al.*, 2006).

Tabla 1. Proporción de los ingredientes empleados para la dieta de las larvas de *G. mellonella*

Ingrediente	Proporción (%)
Levadura seca	5.54
Salvado de trigo	22.17
Harina de maíz amarillo	11.09
Leche en polvo	11.09
Germén de trigo	5.54
Cera de abejas	3.88
Miel de abejas	17.65
Glicerina	22.70
Formaldehido	0.033

2.5 Ciclo de vida de *G. mellonella*

Teniendo en cuenta las condiciones descritas en los numerales 2.1.2 y 2.4, se criaron insectos desde la fase inicial (huevo) hasta alcanzar la etapa adulta. Se realizaron diez réplicas de todo el ciclo de vida.

2.5.1 Relación de machos y hembras

Para determinar la proporción entre imagos machos y hembras se realizó un ensayo por triplicado para el cual se colocaron pupas en cámaras de apareamiento y postura; una vez emergieron los imagos, se procedió a identificar y contar los individuos de cada sexo y las pupas no viables.

2.6 Análisis estadístico

Se realizó el análisis de varianza con diez repeticiones para cada una de las etapas del ciclo de vida del insecto, para establecer el grado de variabilidad del proceso de cría. También se

estableció la relación estadística entre machos y hembras en el recuento de los imagos. Se empleó el software Statgraphics Centurion XVI versión 16.2.04.

2.7 Manejo de las larvas para inyección

Para los ensayos de inyección se seleccionaron dos grupos de diez larvas que se encontraban en el último estadio de desarrollo larval y tenían un peso promedio entre 230-330 mg, las larvas fueron enfriadas por 5 min a 4ºC para anestesiarlas, luego se desinfectó la superficie con una solución de etanol del 70% (v/v). Para el primer grupo las larvas se inmovilizaron tomándolas entre los dedos índice y corazón y fueron inyectadas en el hemocele a través del último *proleg* (falsa pata) izquierdo, con 20 µL de solución estéril de Tween-80 (0.1% v/v). Se empleó una jeringa desechable de 1 ml graduada en microlitros con aguja de 31G x 8,0 mm aguja (BD Ultra-Fine™, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.). El segundo grupo de larvas no se inyectó. Las larvas se mantuvieron en cajas de Petri en la oscuridad durante 48 horas a 25°C. El ensayo se llevó a cabo por triplicado para los dos grupos de larvas. Se evaluó la mortalidad después de 48 horas, basándose en el desarrollo de color marrón de la cutícula (melanización) y en la ausencia de movimiento en respuesta a la estimulación (Renwick *et al.*, 2006; Fuchs *et al.*, 2010). Este ensayo tiene por objeto evaluar el efecto de la inyección del Tween-80 en las larvas, este surfactante es empleado para recoger las microconidias del hongo *F. oxysporum* en los ensayos posteriores.

3. RESULTADOS

3.1 Desarrollo de la colonia a nivel de laboratorio

3.1.1 Dieta GIEM.

En la figura 1 se aprecia la dieta recién preparada, la cual se colocó en la cámara de eclosión de huevos, en donde permanecieron las larvas hasta alcanzar un tamaño mayor a 3 mm (1er instar) y luego fueron trasladadas a la cámara de alimentación, hasta que las larvas llegaron a su último instar (7°) y comienzaron su etapa de pupa, la cual se caracteriza porque las larvas ascienden a la tapa de la cámara y comienzan a producir la pupa, en esta fase las larvas alcanzaron el tamaño y peso adecuado y fueron colectadas para realizar los experimentos de reto inmunológico. Un grupo de pupas, fue colectado cuidadosamente, para ser llevadas a la cámara de apareamiento y ovoposición donde continuaron su ciclo biológico para de este modo, asegurar la producción constante de huevos y el manteniendo de la colonia.

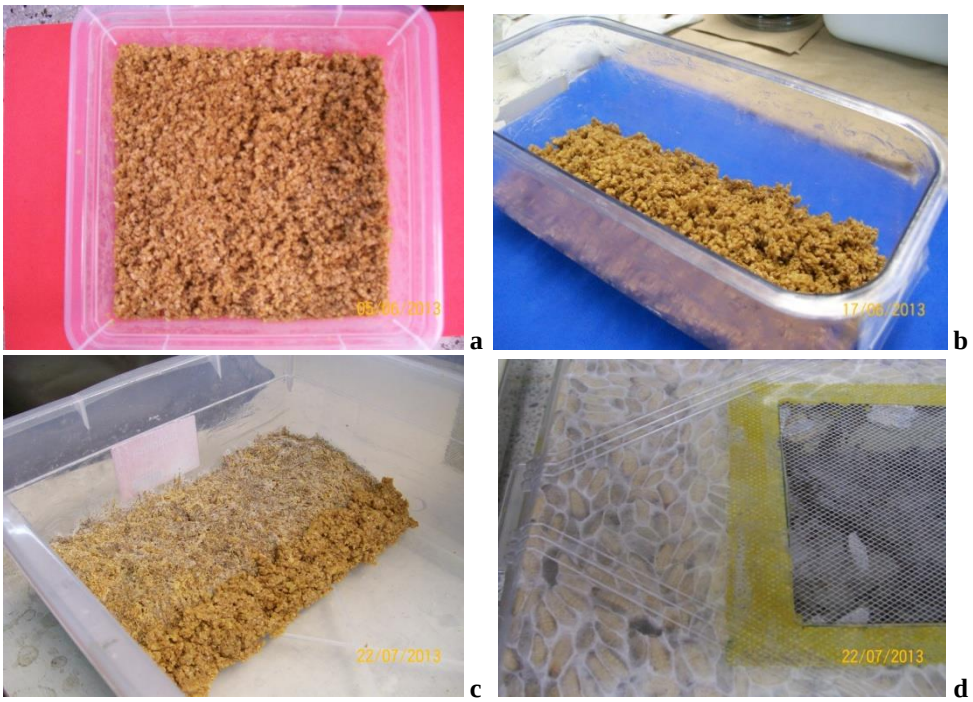


Figura 1. Dieta artificial para alimentar larvas de *G. mellonella.* (a) Preparación de la dieta; (b) cámara para eclosión de huevos y mantenimiento de las larvas durante su primer instar; c) Cámara de alimentación; d) larvas en su último estadío listas para ser colectadas.

3.1.2 Huevos.

Se renueva total o parcialmente, la colonia, cada seis meses, rotando la adquisición de los huevos con dos proveedores diferentes para evitar endogamia y mantener el rendimiento y vitalidad de la colonia.

3.1.3 Larvas.

Con la dieta y las condiciones de cría empleadas, se obtienen larvas vigorosas de peso y color amarillo-crema uniforme, ideales para ensayos biológicos de respuesta inmune, como se aprecia en la figura 2.

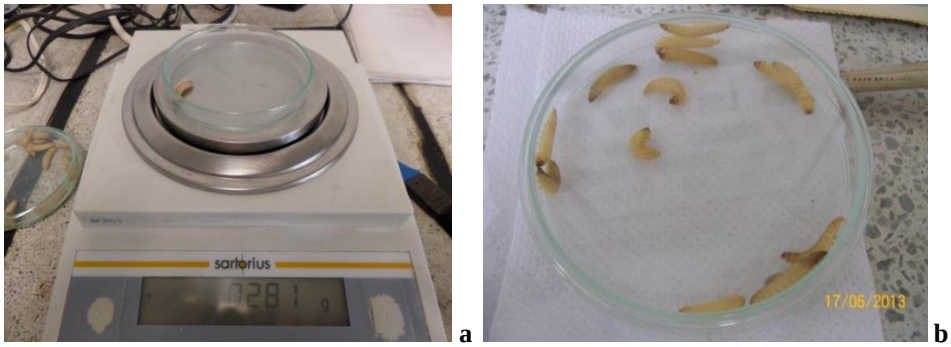
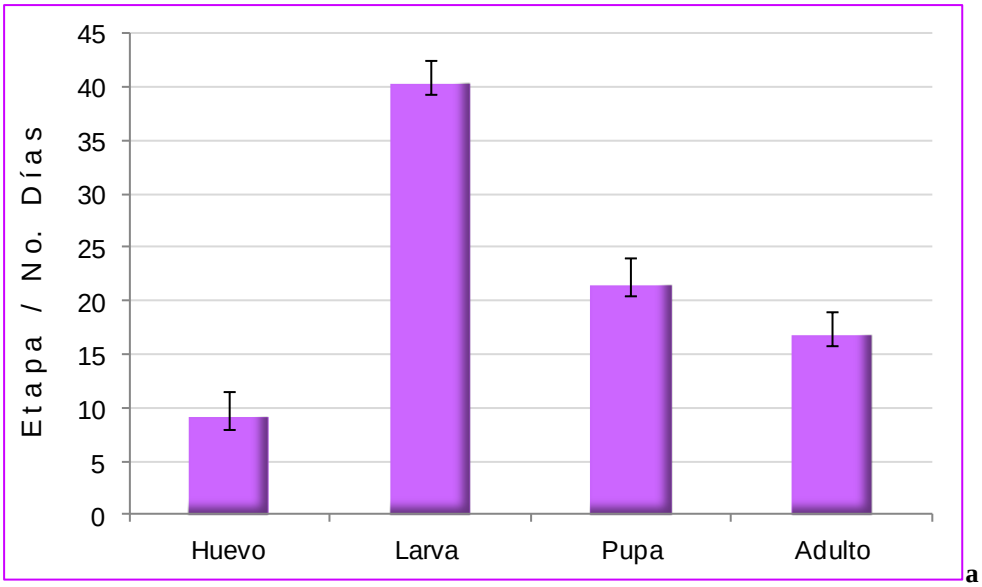


Figura 2. Selección de las larvas. Larvas obtenidas en el último instar larval (7°), seleccionadas por peso (a) y color (b) para los ensayos de respuesta inmune.

3.2 Ciclo de vida de *G. mellonella*

Los huevos son incubados por diez réplicas entre 28 a 32°C, la eclosión ocurrió dentro de un periodo de 6 a 13 días con un promedio de 9.1 días, obteniéndose abundante producción de individuos de color amarillo-crema uniforme y tamaño similar. Las larvas alcanzan un tamaño mayor o igual a 3 mm en promedio a los 9 días, las larvas necesitan 31.3 días más para completar el estadio larval con una duración total promedio de 40.3 días, la fase de pupa se completa en 21.5 días y los adultos viven en promedio 16.9 días. El ciclo total se completa en un promedio de 87.8 días (figura 3).



a

Figura 3. Ciclo biológico de larvas de *G. mellonella* en condiciones controladas. Tiempo promedio para cada una de las etapas, la primera etapa de huevo a larva tiene una duración de 9.1 días (SD=2.4). La etapa siguiente de larva a pupa se llevó a cabo en 40.3 días (SD=2.1) y la etapa de pupa a adulto se cumplió en 21.5 días (SD=2.4). El ciclo completo tuvo una duración en promedio de 87.8 días (SD=2.0).

3.2.1 Relación de machos y hembras.

La cantidad de imagos machos fue siempre mayor que la de hembras, en las tres réplicas del experimento. En la figura 4 se observa que el 54.95 % de los individuos contados correspondió al número de machos, el 36.94% al número de hembras y un 8.11% correspondió a las pupas no viables.

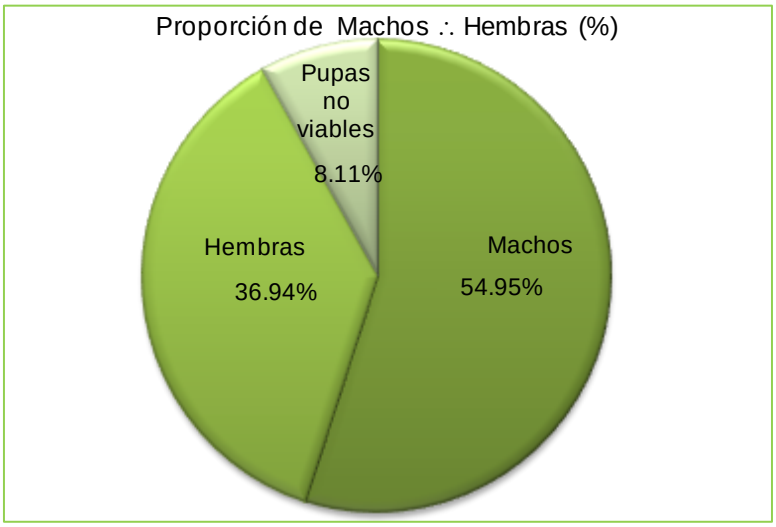


Figura 4. Proporción de machos, hembras y pupas no viables encontrados en las tres réplicas del recuento de imagos.

3.3 Análisis estadístico

Mediante la prueba de Levene se obtuvo en valor-p > 0.05, que confirma que no existen diferencias estadísticamente significativas en las desviaciones estándar dentro de cada etapa del ciclo biológico, con un nivel del 95% de confianza. La etapa de eclosión de huevos presentó el mayor coeficiente de variación (tabla 2) con respecto a las demás etapas del ciclo de cría, siendo la etapa larval la que tuvo menor coeficiente de variación de todo el ciclo. Tanto la etapa de pupa como la de adulto presentaron un coeficiente de variación similar.

Tabla 2. Resumen estadístico del ciclo biológico de *G. mellonella*

	Huevo	**Larva**	**Pupa**	**Adulto**
Recuento	10	10	10	10
Promedio	9.1	40.3	21.5	16.9
Desviación Estándar	2.4	2.1	2.4	2.0
Coeficiente de Variación	27.1%	5.3%	11.4%	11.9%
Mínimo	6	36	18	14
Máximo	13	44	25	20
Rango	7	8	7	6
Sesgo Estandarizado	0.244216	-0.41046	-0.433175	0.217709
Curtosis Estandarizada	-0.818963	0.752847	-0.731642	-0.866551

El análisis de varianza de la relación entre machos con respecto a las hembras, mostró que el valor-p de la prueba-F es menor que 0.05, indicando que existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de machos y la media de hembras, con un nivel del 95.0% de confianza. El valor-p para la prueba de Levene fue mayor de 0.05 lo que

indica que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar de machos y hembras, con un nivel del 95.0% de confianza.

3.4 Manejo de las larvas para inyección

En la figura 5 se observa la manera de manipular las larvas para lograr una inmovilidad total, colocando la larva entre los dedos índice, medio y pulgar, de modo que la larva quedara con el cuerpo inclinado hacia atrás, exponiendo su abdomen, lo que permitió la adecuada desinfección de la zona abdominal y la correcta inyección de microconidias del patógeno fúngico, en el último *proleg* izquierdo.

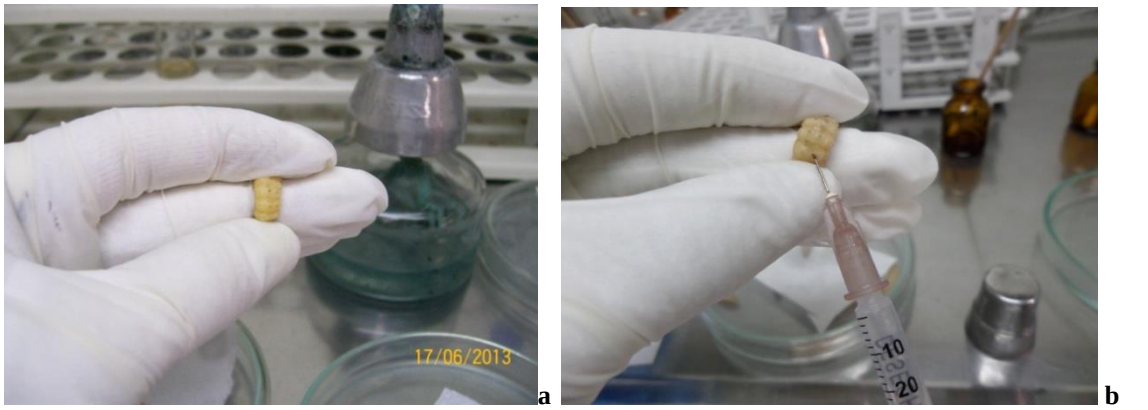


Figura 5. Manipulación de las larvas para la inyección de patógenos o de controles. Las larvas se sujetaron entre los dedos índice, medio y pulgar, como se observa en (a), de manera que la larva quedaba completamente inmovilizada y con el abdomen expuesto, lo que facilitó la desinfección de la zona de inyección y la precisión para localizar el último *proleg* izquierdo, como se observa en (b).

4. DISCUSIÓN

El estudio de los huéspedes invertebrados es un área de rápido crecimiento en el campo de la micología. La elección de un modelo sobre otro, depende principalmente de la finalidad específica del estudio. Por ejemplo, las respuestas inmunes celulares, tales como fagocitosis puede estudiarse fácilmente utilizando la ameba *Dictyostelium discoideum* o *G. mellonella* como huéspedes, mientras que *D. melanogaster* es un excelente modelo para el estudio de las vías inmunitarias innatas evolutivamente conservadas frente a patógenos fúngicos, y *C. elegans* es un modelo adecuado para la selección rápida de compuestos antifúngicos potenciales, así como para la identificación de importantes rasgos de virulencia de hongos. Sin embargo, debido a sus limitaciones, estos huéspedes modelo no pueden sustituir por completo a los modelos mamíferos en la experimentación con hongos. En lugar de ello, deberían servir como un método adicional fácil de utilizar en la detección rápida para ampliar el conocimiento sobre la patogénesis fúngica (Arvanitis *et al.,* 2013).

Las larvas de *G. mellonella,* fueron utilizadas por primera vez por Gotz *et al*, (1997) para estudiar hongos entomopatógenos, poco después se emplearon como modelo para el estudio de infecciones fúngicas en humanos (Cotter *et al*., 2000). Este modelo es cada vez más

popular para el estudio de la patogénesis fúngica. Las principales ventajas del modelo son, la facilidad para obtener las larvas, no se necesita un equipo especial de laboratorio y, lo más importante, y en contraste con los modelos descritos anteriormente, es que las larvas de *G. mellonella* puede mantenerse a 37°C, lo que es ideal para el estudio de las interacciones y la virulencia fúngica factores que sólo pueden estar presentes a esta temperatura (Mowlds & Kavanagh, 2008; Wojda *et al*., 2009), con la ventaja adicional, que las larvas son significativamente más grandes, lo que facilita la inyección directa del inóculo con una jeringa sin traumatizar significativamente el insecto, permitiendo la administración de una cantidad específica de un patógeno (Walters, N.A. Ratcliffe, 1983). Por otro lado, las limitaciones del modelo en comparación con los otros modelos anteriormente mencionados, son la ausencia de genoma totalmente secuenciado, aunque un transcriptoma completo de los genes que participan en su respuesta inmune ha sido identificado recientemente (Vogel *et al*., 2011), otra limitación, es que no existe ningún método establecido para crear cepas mutantes (Arvanitis *et al.*, 2013). Es importante destacar que este insecto modelo no requiere laboratorios ni equipos especiales, además, las larvas de tipo salvaje, son susceptibles a infecciones por hongos y los agentes antifúngicos se puede estudiar con facilidad. En este sentido, *G. mellonella* es un sistema diferente a *D. melanogaster*, que es capaz de sobrevivir muy altas concentraciones de inóculos de hongos, siendo necesario, en muchos casos, utilizar mutantes *Toll* para el estudio de la patogénesis fúngica (Mylonakis, 2008).

4.1 Ventajas de la cría en el laboratorio

Estudios preliminares han mostrado que la cría de *Galleria mellonella* ofrece varias ventajas, entre otras:

(1) Las larvas pueden criarse en dieta artificial de bajo costo
(2) No hay período de preoviposición presente.
(3) Las hembras no requieren ningún alimento adicional.
(4) Las hembras tienen gran fecundidad.
(5) La mayoría de los huevos son puestos en un corto periodo de tiempo.
(6) Huevos tiene un corion duro por lo cual son resistentes a la rotura.
(7) Los huevos son relativamente grandes (Marston *et al.*, 1975; Ellis *et al.*, 2013).

Una ventaja adicional radica en que se obtienen individuos de tamaño, peso y color uniforme sin manchas, cualidades muy importantes en los estudios de respuesta inmunológica a patógenos. Además, se dispone de larvas durante todo el año, resultándo más barato criarlas que comprarlas a proveedores externos, pues se eliminan los gastos ligados al transporte, así como posibles demoras en la entrega y se tiene total control sobre el tipo de nutrientes que reciben las larvas, pues el tipo de dieta y la manera de administrarla a las larvas incide directamente en la calidad de los especímenes obtenidos.

4.2 Manejo de la colonia a nivel de laboratorio

La renovación parcial o total de la colonia cada seis meses o menos, mejora la producción de larvas viables para los ensayos, es decir, se obtiene gran cantidad de larvas con peso ideal (230-320 mg) y coloración adecuada (sin melanización) para llevar a cabo los ensayos experimentales. La alimentación diaria aumenta el vigor de la colonia, además, las larvas

crecen más rápidamente, manteniendo un tamaño y color adecuados para los ensayos. Un factor fundamental a tener en cuenta es la revisión constante del alimento dentro de las cajas de engorde, para detectar el crecimiento de hongos de los géneros *Penicillium* o *Trichoderma* y proceder a combatir el hongo o en casos de infestación masiva del alimento, proceder a descartar la línea de larvas, pues el efecto del hongo en las larvas desencadenaría respuestas inmunológicas desconocidas, lo cual conduciría posteriormente a resultados erróneos en los diferentes ensayos experimentales que se realizan con las larvas. Para controlar los hongos, se debe mantener monitoreada la humedad y tener un estricto control de la asepsia y del paso de hormigas y ácaros, mediante la ubicación de trampas de agua en las bandejas donde se ubican las cámaras de engorde, y la adición de vaselina en las paredes de las cámaras de engorde. También es necesario en algunos casos, implementar la adición de agentes antimicrobianos como formaldehido e incluso antibióticos (Severin, 1992; Bauté *et al.,* 1981).

4.3 Ciclo de desarrollo en el laboratorio

La etapa de eclosión de huevos presentó el mayor coeficiente de variación (tabla 2) con respecto a las demás etapas del ciclo de cría, siendo la etapa larval la que tuvo menor dispersión de todo el ciclo. Tanto la etapa de pupa como la de adulto presentaron menos de la mitad de la variación en los datos con respecto a la fase de eclosión de huevos y el doble con relación al estadío larval, siendo entonces, la etapa de huevo la que representa el punto crítico de la cría en condiciones de laboratorio, lo cual se deduce observando el coeficiente de variación de 27.14% entre las diez repeticiones del ciclo biológico, debido principalmente a la gran sensibilidad de los huevos a los cambios de temperatura incluso si son leves y especialmente a temperaturas por debajo de 28°C (Elli *et al.,* 2013). Nosotros encontramos resultados similares a los obtenidos por Realpe Aranda *et al. (*2007), para la eclosión de huevos que ocurrió a los 9.1 días promedio a 30°C y para toda la etapa larval que tuvo una duración de 40.3 días a 25°C. La etapa larval presentó menor variabilidad en los resultados en cada ciclo de cría, es decir, la reproducibilidad de esta fase es estadísticamente significativa debido a que las larvas estuvieron expuestas a menos cambios de temperatura y humedad, además la uniformidad en la elaboración del alimento y la frecuencia de administración, proporciona a las larvas estabilidad metabólica que evita que modifiquen su ciclo biológico y entren es estado de dipausa (Koŝtál, 2006) o que pasen a pupa antes de tiempo, en ésta etapa, también influyó la densidad de larvas como lo demuestra el trabajo de Marston *et al.* (1975), la cual controlamos colocando aproximadamente mil huevos al inicio de cada ciclo (Ellis *et al*., 2013).

En el recuento de imagos adultos para los tres ensayos de diferenciación de sexo, se encontró una marcada diferencia entre la proporción de machos en relación a las hembras como reportan Marston *et al*., 1975 y Elli *et al*., 2013, encontrándose poca dispersión en los datos de los tres recuentos; el número de pupas no viables encontradas en las tres réplicas del ensayo fue similar y poco representativo del total de la población de imagos emergidos, lo que demuestra la fecundidad de éste lepidóptero.

Se ha establecido que la duración de los estadios larvales guarda una relación inversa con la temperatura, de modo que a medida que ésta aumenta, la duración del estadío es menor,

también se observa una mayor sobrevivencia de las larvas a medida que aumenta la temperatura; así, a 32°C se registra un 96,6 % de sobrevivencia (Cardoso *et al.*, 2007). Nosotros registramos poca mortalidad de larvas y pocas pupas no viables a la temperatura de cría empleada.

Se observó que las larvas que se ven sometidas a temperaturas bajas, entraron en estado de diapausa (Koŝtál, 2006), inducido por las condiciones ambientales difíciles, disminuyendo su morfogénesis y reduciendo o alterando sus actividades metabólicas, hecho que interfirió con su desarrollo hacia el estado adulto, dando como resultados individuos de bajo peso y bastante melanizados, que no cumplían los estándares de peso y coloración para ser utilizados en los ensayos.

4.4 Manejo de las larvas para inyección

La adecuada manipulación de las larvas y la correcta inmovilización, garantiza que siempre se inoculen las larvas en la misma zona, la cual funciona como una vía de ingreso al hemocele que impide la pérdida del inoculo una vez inyectado. También es muy útil este modo de inmovilizarlas pues de ser necesario re-inocular las larvas, se puede escoger otro *proleg*. Una vez inoculadas las larvas, se colocan durante un minuto en una caja de Petri provista de papel de filtro estéril, para que la larva se recupere de la inyección, con este procedimiento se aprecia el comportamiento de la larva y se puede observar cualquier efecto adverso producido en la larva por la inyección, lo cual permite descartar las larvas que hayan sido perforadas durante la inyección y que presenten graves pérdidas de hemolinfa. Luego de que recuperan su comportamiento habitual, son transferidas a la cámara de incubación. La inyección del surfactante Tween-80 al 0.1% (v/v) en el hemocele de las larvas, tiene por objeto asegurar que tanto el procedimiento de inyección, como el surfactante (solución esterilizada en la cual se recogen las microconidias del hongo para los ensayos de patogenicidad), no sean responsables de ninguna mortalidad.

5. CONCLUSIONES

Las medidas de control tomadas en nuestro laboratorio, contra ácaros y hormigas, además de la asepsia durante todo el proceso preparación de la dieta, así como el control de la humedad y temperatura, permiten el control de microflora saprófita, además de una dieta adecuada, nos ha permitido obtener resultados satisfactorios en la instalación, mantenimiento y propagación de la colonia de *G. mellonella*.

Criar las larvas de *G. mellonella* en el laboratorio, ofrece varias ventajas, entre las cuales se destaca el control de las condiciones de desarrollo de las larvas, mediante una dieta adecuada, cuidadosamente preparada y administrada, que incide directamente en la calidad de las larvas, que presentan homogeneidad en tamaño, peso y color, siendo un excelente huésped para estudios de patógenos microbianos, además, se dispone del modelo durante todo el año, sin intermediarios, lo que redunda en costos más bajos en la obtención de este modelo invertebrado.

Se estableció un sistema adecuado de manipulación de las larvas para inyectarlas, el cual es crucial para llevar a cabo estudios posteriores de infección con microorganismos patógenos.

Se determinó el tiempo total para ciclo de vida, de 87.8 días repartidos en 9.1 días para la eclosión de los huevos, seguida del estadío larval que duró 40.3 días, la fase de pupa se llevó a cabo en 21.5 días, finalizando la etapa adulta en 16.9 días.

La proporción de machos y hembras, obtenidos por nuestro sistema de cría, presentó una relación de 1.48 machos por cada hembra.

Se encontró que el sistema de cría es estadísticamente reproducible, con muy poca variabilidad en el proceso experimental.

Es necesario continuar con estudios de caracterización genética y proteómica, que sumados a la utilización de nuevas tecnologías de biología computacional, ayudarán a llenar los vacíos existentes en el conocimiento de *G. mellonella*, que permitan en un futuro cercano posicionarla como un modelo invertebrado de primera línea en la investigación de la patogenicidad fúngica.

6. BIBLIOGRAFÍA

Adams MD, Celniker SE, Holt RA, Evans CA, Gocayne JD, Amanatides PG. *et al*. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. Science. 2001;287:2185-2195.

Alarco AM, Marcil A, Chen J, Suter B, Thomas D, Whiteway M. Immune-deficient Drosophila melanogaster: a model for the innate immune response to human fungal pathogens. J. Immunol. 2004;172:5622-5628.

Andrès E, Dimarcq JL. Peptides antimicrobiens cationiques: de l'étude de l'immunité innée à la production de médicaments. Mise à jour. Med. Mal. Infect. 2007;37:194–199.

Arala-Chaves M, Sequeira T. Is there any adaptive immunity in invertebrates? Aquaculture. 2000; 191:247-258.

Arvanitis M, Glavis-Bloom J, Mylonakis E. Invertebrate models of fungal infection. Biochim. Biophys. Acta. 2013;832:1378–1383.

Ausubel FM. Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? Nat. Immunol. 2005;6: 973-979.

Baute R, Deffieux G, Merlet D, Baute M-A, Neveu A. New insecticidal cyclodepsipeptides from the fungus *Isaria feline*. I production, isolation and insecticidal properties of Isariins B, C and D. J. Antibiot. 1981;34(10):1261-1265.

Bergin D, Murphy l, Keenan J, Clynes M, Kavanagh K. Pre-exposure to yeast protects larvae of *Galleria mellonella* from a subsequent lethal infection by *Candida albicans* and ismediated by the increased expression of antimicrobial peptides. Microbes Infect. 2006;8:2105-2112.

Bergin D, Reeves EP, Renwick J, Wientjes FB, Kavanagh K. Superoxide production in *Galleria mellonella* hemocytes: identification of proteins homologous to the NADPH oxidase complex of human neutrophils. Infect. Immunol. 2005;73:4161–4170.

Bergin D, Brennan M, Kavanagh K. Fluctuations in haemocyte density and microbial load may be used as indicators of fungal pathogenicity in larvae of *Galleria mellonella*. Microbes Infect. 2003;5:1389–1395.

Berkowitz BA, Bevins CL, Zasloff MA. Magainins: a new family of membrane-active host defense peptides. Biochem. Pharmacol. 1990;39:625–629.

Bischoff V, Vignal C, Boneca IG, Michel T, Hoffmann JA, Royet J. Function of the drosophila pattern-recognition receptor PGRP-SD in the detection of Gram-positive bacteria. Nat. Immunol. 2004;5:1175–1180.

Boman HG. Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. J. Intern. Med. 2003;254:197–215.

Boman HG. Gene-encoded peptide antibiotics and the concept of innate immunity: an update review. Scand. J. Immunol. 1998;48:15–25.

Boman HG, Hultmark D. Cell-free immunity in insects. Ann. Rev. Microbiol. 1987;41:103-126.

Boucias DG, Pendland J. Detection of protease inhibitors in the hemolymph of resistant Anticarsia gemmatalis which are inhibitory to the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. Experientia. 1987;43:336–339.

Brehelin M. Immunity in invertebrates: cells, molecules and defence reactions. Springer -Verlag, Heidelberg. 1986;233-245.

Brennan M, Thomas DY, Whiteway M, Kavanagh K. Correlation between virulence of *Candida albicans* mutants in mice and *Galleria mellonella* larvae. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 2002;34:153–157.

Bulet P, Hetru C, Dimarcq JL, Hoffmann D. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. Dev. Comp. Immunol. 1999;23:329–344.

Cardoso A, De la Prata M, Furlong J, Prezoto F. Exigências Térmicas de Estágios Imaturos de *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) Ecology, Behavior and Bionomics. Neotrop. Entomol. 2007;36(5):657-661.

Chamilos G, Lionakis MS, Russell EL, Kontoyiannis DP. Role of mini-host models in the study of medically important fungi. Lancet Infect. Dis. 2007;7:42–55.

Choi JY, Whitten MMA, Cho MY, Lee KY, Kim MS, Ratcliffe NA, *et al*. Calreticulin enriched as an early stage encapsulation protein in wax moth *Galleria mellonella* larvae. Dev. Compar. Immun. 2002;26:335-343.

Clarkson JM, Charnley AK. New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. Trends Microbiol. 1996;4:197-203.

Cociancich S, Bulet P, Hetru C, Hoffmannn JA. The inducible antibacterial peptides of insects. Parasitol. Today. 1994;10:132–139.

Coskun M, Kayis T, Sulanc M, Ozalp P. Effects of Different Honeycomb and Sucrose Levels on the Development of Greater Wax Moth *Galleria mellonella* larvae. Int. J. Agric. Biol. 2006;8(6):855–858.

Cotter G, Doyle S, Kavanagh K. Development of an insect model for the *in vivo* pathogenicity testing of yeasts. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 2000;27:163–169.

da Silva CC, Dunphy GB, Rau ME. Interaction of *Xenorhabdus nematophilus* (Enterobacteriaceae) with anti-microbial defenses of the house cricket, *Acheta domesticus*. J. Invert. Pathol. 2000;76:285-292.

Daly P, Kavanagh K. Pulmonary aspergillosis: clinical presentation, diagnosis and therapy. Br. J. Biomed. Sci. 2001;58:197–205

De Gregorio E, Spellman PT, Rubin GM, Lemaitre B. Genome-wide analysis of the Drosophila immune response by using oligonucleotide microarrays, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2001;98:12590–12595.

Denicola A, Freeman BA, Trujillo M, Radi R. peroxynitrite reaction with carbon dioxide/bicarbonate: kinetics and influence on peroxynitrite-mediated oxidations. Arch. Biochem. Biophys. 1996;333:49-58.

Dimarcq JL, Bulet P, Hetru C, Hoffmann J. Cysteine-rich antimicrobial peptides in invertebrates. Biopolymers. 1998;47:465–477.

Dong Y, Taylor HE, Dimopoulos G. AgDscam, a hypervariable immunoglobulin domain-containing receptor of the *Anopheles gambiae* innate immune system. PLoS Biol. 2006;4:e229.

Dunn PE. Biochemical aspects of insect immunology. Ann. Rev. Entomol. 1986;31:321-339.

Dunphy G, Morton D, Kropinski A, Chadwick J. Pathogenicity of lipopolysaccharide mutants of *Pseudomonas aeruginosa* for larvae of *Galleria mellonella:* Bacterial properties associated with virulence. J. Invert. Pathol. 1986;47:48-55.

Ekengren S, Hultmark D. *Drosophila* cecropin as an antifungal agent. Insect Biochem. Mol. Biol. 1999;29:965–972.

Ellis JD, Jason RG, Mortensen A. Standard methods for wax moth research. J. Apic. Res. 2013;52(1):1-17.

Engstrom P, Carlsson A, Engstrom A, Tao Z, Bennich H. The anti-bacterial effect of attacins from the silk moth *Hyalophora cecropia* is detected against the outer membrane of *Escherichia coli.* EMBO J. 1984;3:3347-3351.

Fallon A, Sun D. Exploration of mosquito immunity using cells in culture. Insect Biochem. Molec. Biol. 2001;29:965-972.

Ferguson DC. Lepidoptera. In J R Borham (Ed.). Insect and mite pests in food: an illustrated key. USDA Agriculture Handbook 1987;655:231-244.

Foley E, O'Farrell PH. Functional dissection of an innate immune response by a genome-wide RNAi screen, PLoS Biol. 2004;2:E203.

Fraser JA, Giles SS, Wenink EC, Geunes-Boyer SG, Wright JR, Diezmann S, *al*. Same-sex mating and the origin of the Vancouver Island *Cryptococcus gattii* outbreak. Nature. 2005;437:1360-1364.

Fuchs BB, O'Brien E, El Khoury JB, Mylonakis E. Methods for using *Galleria mellonella* as a model host to study fungal pathogenesis. Virulence. 2010;1(6):475–82.

Fuchs BB, Mylonakis E. Using non-mammalian hosts to study fungal virulence and host defense. Curr. Opin. Microbiol. 2006;9(4):346–51.

Gagen SJ, Ratcliffe NA. Studies on the in vivo cellular reactions and fate of injected bacteria in *Galleria mellonella* and *Pieris brassicae* larvae. J. Invert. Pathol. 1976;28:17-24.

Ganz T, Lehrer RI. Antimicrobial peptides of vertebrates. Curr. Opin. Immunol. 1998;10:41–44.

García-Olmedo F, Molina A, Alamillo JM, Rodriguez-Palenzuela P. Plant defense peptides. Biopolymers. 1998;47:479–491.

Gillespie JP, Kanost MR, Trenczek T. Biological mediators of insect immunity. A. Rev. Ent. 1997;42:611–643.

Glupov VV, Khvoshevskaya MF, Lovinskaya YL, Dubovski IM, Martemyanov VV, Sokolova JY. Application of the nitroblue tetrazolium reduction method for studies on the production of reactive oxygen species in insect haemocytes. Cytobios. 2001;106:165-178.

Gotz P, Matha V, Vilcinskas A. Effects of the entomopathogenic fungus Metarhizium anisopliae and its secondary metabolites on morphology and cytoskeleton of plasmatocytes isolated from the greater wax moth, |, J. Insect. Physiol. 1997;43:1149–1159.

Hamamoto H, Kurokawa K, Kaito C, Koushirou K, Manitra O, *et al*. Quantitative evaluation of the therapeutic eff ects of antibiotics using silkworms infected with human pathogenic microorganisms. Antimicrob. Agents Chemother. 2004;48:774–779.

Hancock REW, Rozek A. Role of membrane in the activities of antimicrobial cationic peptides. FEMS Microbiol. Lett. 2002;206:143–149.

Hancock RE. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. Lancet Infect. Dis. 2001;1:156–64.

Hedengren-Olcott M, Olcott MC, Mooney DT, Ekengren S, Geller BL, Taylor BJ. Differential activation of the NFkappaB-like factors Relish and Dif in *Drosophila melanogaster* by fungi and Gram-positive bacteria. J. Biol. Chem. 2004;279:21121–21127.

Heine H, Lein, E. Toll-like receptors and their function in innate and adaptive immunity. Int. Arch. Allergy Immunol. 2003;130(3):180-192.

Hetru C, Troxler L, Hoffmann J. *Drosophila melanogaster* antimicrobial defense. J Infect Dis. 2003;187 Suppl (Suppl 2):S327–34.

Hoffmann JA. The immune response of *Drosophila*. Nature. 2003;426:33-38.

Hoffmann JA, Reichhart JM. Drosophila innate immunity: an evolutionary perspective. Nat. Immunol. 2002;3:121–126.

Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA, Ezekowitz RA. Phylogenetic perspectives in innate immunity. Science. 1999;284:1313–1318.

Hoffmann JA, Reichhart J-M, Hetru C. Innate immunity in higher insects. Curr. Opin. Immunol. 1996;8:8–13.

Hoffmann JA. Innate immunity of insects. Curr. Opin. Immunol. 1995;7:4-10.

Hurst JK, Lymar SV. Toxicity of peroxynitrite and related reactive nitrogen species toward Escherichia coli. Chem. Res. Toxicol. 1997;10:802-810.

Huttner KM, Bevins CL. Antimicrobial peptides as mediators of epithelial host defense. Pediatr Res. 1999;45(6):785–94.

Hwang PM, Vogel HJ. Structure-function relationships of antimicrobial peptides. Biochem. Cell. Biol. 1998;76:235–246.

Imler J-L, Hoffmann JA. Signalling mechanism in the antimicrobial host defence of *Drosophila*. Curr. Opin. Microbiol. 2000;3:16-22.

I**rving P, Troxler L, Heuer TS, Belvin M, Kopczynski C, Reichhart JM, *et al*.** A genome-wide analysis of immune responses in Drosophila. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001;98:15119-15124.

Jander G, Rahme LG, Ausubel FM. Positive correlation between virulence of *Pseudomonas aeruginosa* mutants in mice and insects. J. Bacteriol. 2000;182(13):3843–5.

Janeway CA, Medzhitov R. Innate immune recognition. Annu. Rev. Immunol. 2002;20:197–216.

Janeway CA. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 1989;54:1–13.

Jones G; Barabas A, Elliot W, Parsons S. Female greater wax moths reduce sexual display behaviour in relation to the potential risk of predation by echolocating bats. Behav. Ecol. 2002;13(3):375-380.

Kaito C, Nobuyoshi A, Haruo W, Kazuhisa S. Silkworm larvae as an animal model of bacterial infection pathogenic to humans. Microb. Pathog. 2002;32:183–190.

Kanost MR, Jiang H, Yu XQ. Innate immune responses of a lepidopteran insect, Manduca sexta. Immunol Rev. 2004;198:97–105.

Kanost MR, Jiang H. Proteinase inhibitors in invertebrate immunity. In: Soderhall, K., Iwanaga, S., Vasta, G.R. (Eds.) New Directions in Invertebrate Immunology. SOS, Fairhaven, NY. 1996;155–173.

Kavanagh K, Reeves EP. Exploiting the potential of insects for in vivo pathogenicity testing of microbial pathogens. FEMS Microbiol Rev. 2004;28(1):101–12.

Kemp MW, Massey RC. The use of insect models to study human pathogens. Drug Discov. Today Dis. Model. 2007;4(3):105–10.

Kimbrell DA, Beutler B. The evolution and genetics of innate immunity. Nat. Rev. Genet. 2001;2:256-267.

Klebanoff SJ. Oxygen metabolism and the toxic properties of phagocytes. Ann. Intern. Med. 1980;93:480-489.

Klein J. Homology between immune responses in vertebrates and invertebrates: does it exist? Scand. J. Immunol.1997;46:558-564.

Koŝtál V. Eco-physiological phases of insect diapauses. J. Insect Physiol. 2006;52:113–127.

Lavine MD, Strand MR. Surface characteristics of foreign targets that elicit an encapsulation response by the moth *Pseudoplusia includens*. J. Insect Phys. 2001;47:965-974.

Lecuona R, Clement JM, Riba G, Joulie C, Juarez P. Spore germination and hyphal growth of *Beauveria* sp. on insect lipids. J. Econ. Entomol. 1997;90:119-123.

Lehrer RI, Ganz T. Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence. Curr. Opin. Immunol. 1999;11: 23–27.

Lehrer RI, Ganz T. Endogenous vertebrate antibiotics. Defensins, protegrins, and other cysteine-rich antimicrobial peptides. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1996;797:228–39.

Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann J. The dorsoventral regulatory gene cassette spätzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. Cell. 1996;86(6):973–83.

Levitin A, Whiteway M. *Drosophila* innate immunity and response to fungal infections. Cell Microbiol. 2008;10(5):1021–1026.

Levy JA. The importance of the innate immune system in controlling HIV infection and disease. TRENDS Immunol. 2001;22:312-316.

Lowenberger C. Innate response of *Aedes aegyptii*. Insect Biochem. Molec. Biol. 2001;31:219-229.

Marston NL, Campbell B, Boldt P. Mass producing eggs of the greater wax moth, *Galleria mellonella* (L.). Agricultural Research Service, US Department of Agriculture Technical Bulletin. 1975;1510:1-15.

Matha M, Mracek Z. Changes in haemocyte counts in *Galleria mellonella* (L) (Lepidoptera: Galleriidae) larvae infected with *Steinernema* sp. (*Nematoda: steinernematidae*). Nematol. 1984;30:86-89.

Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway Jr CA. A human homologue of the *Drosophila*Toll protein signals activation of adaptive immunity, Nature. 1997;388:394-397.

Metwally HMS, Hafez GA, Hussein MA, Hussein MA, Salem HA, Saleh MME. Low Cost Artificial Diet for Rearing the Greater Wax Moth, *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) as a Host for Entomopathogenic Nematodes. Egyptian J. Biol. Pest Cont. 2012;22(1):15-17.

Morel F, Doussiere J, Vignais PV. The superoxide-generating oxidase of phagocytic cells. Physiological, molecular and pathological aspects. Eur. J. Biochem. 1991;201:523-546.

Mowlds P, Kavanagh K. Effect of pre-incubation temperature on susceptibility of *Galleria mellonella* to infection by *Candida albicans*. Mycopathologia. 2008;165:5-12.

Mukherjee K, Altincicek B, Hain T, Domann E, Vilcinskas A, Chakraborty T. *Galleria mellonella* as a model system for studying *Listeria* pathogenesis. Appl. Environ. Microbiol. 2010;76:310–317.

Mullett H, Ratcliffe NA, Rowley AF. Analysis of immune defences of the wax moth, *Galleria mellonella*, with anti-haemocytic monoclonal antibodies. J. Insect. Physiol. 1993;39:897–902

Mylonakis E. *Galleria mellonella* and the Study of Fungal Pathogenesis: Making the Case for Another Genetically Tractable Model Host. Mycopathologia. 2008;165:1–3.

Mylonakis E, Moreno R, El Khoury JB, Idnurm A, Heitman J, Calderwood SB, *et al*. *Galleria mellonella* as a Model System To Study *Cryptococcus neoformans* Pathogenesis. Infect Immun. 2005;73(7):3842–50.

Nappi AJ, Vass E. Melanogenesis and the generation of cytotoxic molecules during insect cellular immune reactions. Pigment Cell Res. 1993;6:117-126.

Nurullahoglu ZU, Susurluk Aİ. Fecundity of Turkish and German strains of *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae) reared on two different diets. S.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi Fen Dergisi. 2001;18:39–44.

Paddock FB. The beemoth or waxworm. Texas Agricultural Experiment Station, USA. Bulletin. 1918;231:44 pp. https://archive.org/stream/cu31924000013502#page/n1/mode/2up

Pradel E, Ewbank JJ. Genetic models of pathogenesis. Annu. Rev. Genet. 2004;38:347–363.

Price CD, Ratcliffe NA. A reappraisal of insect haemocyte classification by the examination of blood from fifteen insect orders. Z. Zellforsch.Mikrosk. Anat. 1974;147:537-549.

Ratcliffe N. Invertebrate immunity - a primer for the non-specialist. Immunol. Letts. 1985;10:253-270.

Realpe-Aranda FJ, Bustillo-Pardey AE, López-Nuñez JC. Optimización de la cría de *Galleria mellonella* (L.) para la producción de nematodos entomopatógenos parásitos de la broca del café. Cenicafé. 2007;58(2):142-157.

Reeves EP, Messina CG, Doyle S, Kavanagh K. Correlation between gliotoxin production and virulence of *Aspergillus fumigatus* in *Galleria mellonella*. Mycopathologia. 2004;158:73–79.

Renwick J, Daly P, Reeves EP, Kavanagh K. Susceptibility of larvae of *Galleria mellonella* to infection by *Aspergillus fumigatus* is dependent upon stage of conidial germination. Mycopathologia. 2006;161:377–384.

Royet J. Infectious non-self recognition in invertebrates: lessons from *Drosophila* and other insect models. Mol. Immunol. 2004;41:1063–1075.

Salzet M. Vertebrate innate immunity resembles a mosaic of invertebrate immune responses. TRENDS Immunol. 2001;22:285-288.

Severini M. Conseils pour la réalisation d´un milieu nutritif artificiel destiné à l´élevage de larves de lépidoptères. Insectes. 1992;B5(2):24-25.

Silverman N, Maniatis T. NF-kappaB signalling pathways in mammalian and insect innate immunity. Genes Dev. 2001;15: 2321–2342.

Slepneva IA, Glupov VV, Sergeeva SV, Khramtsov VV. EPR detection of reactive oxygen species in hemolymph of *Galleria mellonella* and *Dendrolimus superans sibiricus* (Lepidoptera) larvae. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1999;264:212-215.

Soderhall K, Cerenius L. Role of phenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. Curr. Opin. Immunol. 1998;10:23-28.

Sritunyalucksana K, Soderhal K. The proPO and clotting system in crustaceans. Aquaculture. 2000;191:53-69.

S**teiner H, Hultmark D, Engström Å, Bennich H.** Sequence and Specificity of Two Antibacterial Proteins Involved in Insect. Nature. 1981;292:246-248.

Teetor-Barsch A, Roberts DW. Entomogenous *Fusarium* species.Mycopathologia. 1983;43:423-429.

Tingvall TÖ, Roos E, Engström Y. expression in Drosophila barrier epithelia. EMBO Rep. 2001;2(3):239–243.

Tojo S, Naganuma F, Arakawa K, Yokoo S. Involvement of both granular cells and plasmatocytes in phagocytic reactions in the greater wax moth, *Galleria mellonella*. J. Insect Physiol. 2000;46:1129-1135.

Tzou P, Ohresser S, Ferrandon D, Capovilla M, Reichhart JM, Lemaitre B, *et al*. Tissue-specific inducible expression of antimicrobial peptide genes in *Drosophila* surface epithelia. Immunity. 2000 Nov;13(5):737–748.

van Abel RJ, Tang YQ, Rao VS, Dobbs CH, Tran D, Barany G., *et al*. Synthesis and characterization of indolicidin, a tryptophan-rich antimicrobial peptide from bovine neutrophils. Int. J. Pept. Protein Res. 1995;45:401–409.

Vazquez-Torres A, Jones-Carson J, Balish E. Peroxynitrite contributes to the candidacidal activity of nitric oxide-producing macrophages. Infect. Immun. 1996;64:3127-3133.

Vilmos P, Kurucz E. Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system. Immunol. Letts. 1998;62:59-66.

Vilcinskas A, Matha V. Götz P. Effects of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its secondary metabolites on morphology and cytoskeleton of plasmatocytes isolated from greater wax moth, *Galleria mellonella*. J. Insect Physiol. 1997;43:1149-1159.

Vilcinskas A, Wedde M. Inhibition of *Beauveria bassiana* proteases and fungal development by inducible protease inhibitors in the haemolymph of *Galleria mellonella* larvae. Biocontrol Sci. Technol. 1997;7:591–601.

Vogel H, Altincicek B, Glöckner G, Vilcinskas A. A comprehensive transcriptome and immune- gene repertoire of the lepidopteran model host *Galleria mellonella*. BMC Genomics. 2011;12:308.

Walters JB, Ratcliffe NA. Studies on the in vivo cellular reactions of insects: fate of pathogenic and non-pathogenic bacteria in *Galleria mellonella* nodules. J. Insect. Physiol. 1983;29:417-424.

Warren LO, Huddleston P. Life History of the Greater Wax Moth, *Galleria mellonella* L., in Arkansas. J. Kans. Entomol. Soc. 1962;35(1):212-216.

Watson FL, Puttmann-Holgado R, Thomas F, Lamar DL, Hughes M, Kondo M, *et al.* Extensive diversity of Ig-superfamily proteins in the immune system of insects. Science. 2005;309:1874–1878.

Williams JL. Insects: Lepidoptera (moths). In R Morse; K Flottum (Eds). Honey bee pests, predators, and diseases. The AI Root Company; Ohio, USA. 1997;121-141.

Wilson R, Ratcliffe NA. Effect of lysozyme on the lectin-mediated phagocytosis of *Bacillus cereus* by haemocytes of the cockroach, *Blaberus discoidalis*. J. Insect. Physiol. 2000;46(5):663-670.

Wojda I, Kowalski P, Jakubowicz T. Humoral immune response of *Galleria mellonella* larvae after infection by *Beauveria bassiana* under optimal and heat-shock conditions, J. Insect Physiol. 2009;55:525–531.

Zambon RA, Vakharia VN, Wu LP. RNAi is an antiviral immune response against a dsRNA virus in *Drosophila melanogaster*. Cell. Microbiol. 2006;8:880–889.

CONTENIDO

PATOGENICIDAD DEL GÉNERO FUSARIUM: *FUSARIUM OXYSPORUM* PATÓGENO TRANS-REINO 52
RESUMEN 52
1. INTRODUCCIÓN 53
1.1 Características de la infección fúngica 54
1.2 El género *Fusarium* 55
1.2.1 Características morfológicas más importantes. 55
1.2.2 Ubicuidad del género *Fusarium.* 56
1.2.3 Epidemiología y espectro clínico de la fusariosis. 57
1.2.4 Los factores de virulencia de *Fusarium.* 58
1.3 *Fusarium oxysporum* 58
1.3.1 Formas especiales (f. sp.) de *Fusarium oxysporum.* 59
1.3.2 Micotoxinas de *Fusarium oxysporum.* 59
1.4 Patogenicidad en plantas 60
1.5 Patogenicidad en humanos y animales 61
1.5.1 Asociación de *Fusarium* con cáncer y otras enfermedades crónicas en rumiantes y humanos. 62
1.6 *Fusarium oxysporum* como patógeno trans-reino 63
1.7 *F. oxysporum* organismo modelo fúngico para estudios de patogenicidad en múltiples huéspedes 63
2. MATERIALES Y MÉTODOS 64
2.1 Cepa de hongo 64
2.2 Purificación de la cepa por medio de cultivos monospóricos 64
2.3 Caracterización morfológica 64
2.3.1 Descripción de la colonia. 64
2.3.2 Descripción del hongo. 65
2.4 Mantenimiento de la cepa 65
2.4.1 Crecimiento y propagación de la cepa en diferentes medios de cultivo. 65
2.4.1.1 Agar PDA. 65
2.4.1.2 Medio V8. 65
2.5 Conservación de la cepa de *Fusarium oxysporum* en papel de filtro. 65
2.6 Prueba de almacenamiento 66

2.7 Recuperación del hongo almacenado 66
2.8 Caracterización fisiológica 66
2.8.1 Número de microconidias. 67
2.8.2 Viabilidad de microconidias. 67
2.9 Determinación del crecimiento radial de *Fusarium oxysporum* a 25 y 37ºC 67
2.10 Análisis Estadístico 67
3. RESULTADOS 68
3.1 Caracterización morfológica 68
3.2 Mantenimiento de la cepa en medio V8 68
3.3 Caracterización fisiológica 69
3.3.1 Recuento del número de microconidias. 69
3.3.1.1 Análisis estadístico. 70
3.3.2 Viabilidad de las microconidias. 70
3.3.2.1 Análisis estadístico. 71
3.4 Determinación del crecimiento radial de *Fusarium oxysporum* 71
3.4.1 Análisis estadístico. 72
4. DISCUSIÓN 73
4.1 Mantenimiento de la cepa en medio V8 73
4.2 Caracterización fisiológica de las microconidias 74
4.3 Determinación del crecimiento radial de *Fusarium oxysporum* 74
5. CONCLUSIONES 74
6. BIBLIOGRAFÍA 75

PATOGENICIDAD DEL GÉNERO FUSARIUM: *Fusarium oxysporum* PATÓGENO TRANS-REINO

RESUMEN

Los hongos forman un grupo eucariota grande y heterogéneo de organismos vivos con más de 1,5 millones de especies, de las cuales alrededor de 100.000 han sido descritas hasta el momento. Aunque la mayoría de especies son saprofitas, alrededor de 15.000 especies parasitan animales o plantas, causando enormes problemas debido a las enfermedades fúngicas. En humanos, en los últimos 20 años, la epidemiología de las infecciones fúngicas invasoras se ha incrementado, en pacientes inmunocomprometidos, en los cuales la mortalidad continúa siendo muy elevada. Los hongos patógenos se dividen en dos categorías, primarios y oportunistas, los primarios afectan a personas sanas con sistemas inmunes normales. Los patógenos oportunistas pueden producir enfermedad aprovechando anfitriones debilitados o inmunocomprometidos. Los mecanismos de la patogénesis primaria y la oportunista de hongos son complejos, por lo tanto se han dedicado esfuerzos considerables a la investigación tratando de identificar los factores que distinguen a los hongos patógenos de las especies saprofíticas y comensales. *Fusarium* spp. hace parte hoy día, de un creciente grupo de hongos septados filamentosos, considerados patógenos emergentes, que aunque son menos comunes, también pueden causar morbilidad y mortalidad en pacientes inmunocomprometidos. El presente estudio se enfoca en *F. oxysporum*, hongo cosmopolita que existe en muchas formas patogénicas, parasitando más de 100 especies de plantas y es un patógeno emergente en humanos inmunocomprometidos, además ha sido asociado a cáncer y otras enfermedades crónicas en rumiantes y humanos sanos y hoy en día hace parte del grupo de agentes patógenos denominados trans-reino. Desde otro punto de vista, *F. oxysporum* es considerado como modelo para estudios de patogenicidad fúngica. La metodología de este capítulo de *F. oxysporum* consistió principalmente en la caracterización fisiológica de las microconidias de una cepa del hongo aislada en campo, de la cual se evaluó el rendimiento en número de microconidias y la viabilidad de las mismas (porcentaje de germinación), para tres diferentes concentraciones. Además, se determinó el crecimiento radial a 25 y 37ºC. Los resultados de la caracterización fisiológica mostraron diferencias estadísticamente significativas para las tres concentraciones de microconidias evaluadas, además se estableció que los errores asociados al proceso de recuento y de estimación de la viabilidad en las tres suspensiones de microconidias, no presentaron diferencias estadísticamente significativas y que por lo tanto, el diseño experimental es reproducible. En cuanto al crecimiento radial de *F. oxysporum*, se determinó que la capacidad de la cepa para crecer a 30 y 37°C, presentó una correlación clara entre la disminución del crecimiento radial y el aumento de la temperatura. El medio de cultivo natural V8, resultó ser ideal para regenerar las condiciones de cultivo para *F. oxysporum*, que permitió propagar la cepa del hongo, y obtener cultivos vigorosos que producían gran cantidad de microconidias, y mantenían las características morfológicas del hongo sin presentar degeneramiento. La caracterización fisiológica de las microconidias de *F. oxysporum* mediante el recuento y la determinación del porcentaje de germinación de las microconidias es un método reproducible y preciso.

Palabras claves: *Fusarium oxysporum*, microconidias, trans-reino

1. INTRODUCCIÓN

Los hongos forman un grupo eucariota grande y heterogéneo de organismos vivos que se caracterizan su pared celular quitinosa y por carecer de pigmento fotosintético. Se ha estimado que el reino fúngico contiene más de 1,5 millones de especies, pero sólo alrededor de 100.000 se han descrito hasta el momento, siendo las levaduras, mohos y hongos, los más conocidos. Aunque la mayoría de especies de hongos son saprofitos, un número de ellos parasitan animales o plantas para completar su ciclo biológico, alrededor de 15.000 de ellos, la mayoría perteneciente a los Ascomycetes y Basidiomycetes, causan enfermedades en plantas En la agricultura, las pérdidas anuales de cosechas debido a las enfermedades fúngicas pre y post cosecha, son superiores a 200 billones de euros, y en USA, más de $ 600 millones de dólares son gastados anualmente en fungicidas (González-Fernández, *et al*, 2010).

En los últimos 20 años, la epidemiología de las infecciones fúngicas invasoras (IFInv), ha tendido a cambiar en los pacientes inmunocomprometidos, especialmente en aquellos con neoplasias hematológicas con neutropenia prolongada, receptores de trasplantes de células troncales hematopoyéticas y de órganos sólidos. La incidencia de IFInv en estos pacientes ha ido en aumento y la mortalidad continúa siendo muy elevada. Aunque hongos del género *Candida y Aspergillus* son los más frecuentes, en general, otros géneros de hongos, llamados emergentes, tanto levaduras como hongos filamentosos, son progresivamente más importantes en estas poblaciones de pacientes inmunocomprometidos cada vez más numerosas. Este cambio epidemiológico es multifactorial y está dado básicamente por el desarrollo de esquemas de quimioterapia e inmunosupresores nuevos y altamente potentes, un amplio uso de antibacterianos y el aumento de la utilización de anti-fúngicos profilácticos o como terapia empírica, resultando en la selección de hongos más resistentes (Olivares, *et al*., 2005).

El número de hongos médicamente importantes es relativamente bajo. El crecimiento de hongos en huéspedes animales y humanos, que produce enfermedades es colectivamente llamado micosis, mientras que la exposición, dérmica, respiratoria, en la dieta y otras exposiciones a metabolitos fúngicos tóxicos, producen las enfermedades colectivamente llamadas micotoxicosis (Bennett & Klich, 2003). La micosis va desde una simple molestia (pie de atleta) hasta representar peligro para la vida (aspergilosis invasiva). Los hongos que causan micosis puede dividirse en dos categorías, primaria: los agentes patógenos (*Coccidioides immitis* e *Histoplasma* capsulatum) y patógenos oportunistas (*Aspergillus fumigatus* y *Candida albicans.)* Los patógenos primarios afectan de otro modo a personas sanas con sistemas inmunes normales. Los patógenos oportunistas pueden producir enfermedad aprovechando anfitriones debilitados o inmunocomprometidos. En la mayoría de los humanos las micosis son causadas por hongos oportunistas (Van Burik & Magee, 2001, McGinnis et al., 1999).

Los mecanismos de la patogénesis primaria y de la oportunista de hongos son complejos, y los micólogos médicos han dedicado esfuerzos considerables a la investigación tratando de identificar los factores que distinguen a los hongos patógenos a partir de especies

saprofíticas y comensales (Dixon *et al.,* 1996). Algunas infecciones permanecen localizadas, mientras que otras progresan a infección sistémica. Para muchas micosis, el portal de entrada es a través del tracto pulmonar, pero la inoculación directa a través de contacto con la piel es frecuente. En contraste con las micosis, las micotoxicosis son ejemplos de "envenenamiento por medios naturales" y por lo tanto son análogas a las patologías causadas por la exposición a pesticidas o residuos de metales pesados. Los síntomas de una micotoxicosis dependerán del tipo de micotoxinas; la cantidad y la duración de la exposición, la edad, la salud, y el sexo de la persona expuesta, y poco se conoce de los efectos sinérgicos que implican la genética, el estado de nutrición, y las interacciones con otros agentes tóxicos. Así, la gravedad de intoxicación por micotoxinas puede verse agravada por factores como la deficiencia de vitaminas, la privación de calorías, el abuso del alcohol, y enfermedades infecciosas. A su vez, las micotoxicosis pueden aumentar la vulnerabilidad a las enfermedades microbianas, empeorar los efectos de la desnutrición, e interactuar de forma sinérgica con otras toxinas (Bennett & Klich, 2003).

El número de personas afectadas por micosis y micotoxicosis es desconocido, y actualmente es un grave problema de salud internacional. Las micosis oportunistas causadas por patógenos son en gran medida enfermedades del mundo desarrollado, por lo general ocurren en pacientes cuyo sistema inmunológico ha sido comprometido por el tratamiento médico avanzado, donde estas especies comensales patógenas se pueden presentar en quimioterapéutica antibacteriana, o con fármacos inmunosupresores, en la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana, o pueden habitar en los catéteres; por el contrario, las micotoxicosis, son más comunes en los países subdesarrollados (Bennett & Klich, 2003). Una de las características compartidas por la micosis y la micotoxicosis es que ninguna de estas categorías de enfermedad es transmisible de persona a persona. Las micosis son frecuentemente adquiridas a través de la inhalación de las microconidias a partir de un reservorio ambiental o por el crecimiento inusual de una especie comensal que residente normalmente en la piel humana o el tracto gastrointestinal. Por otro lado, la mayoría de micotoxicosis, son consecuencia de la ingestión de alimentos contaminados, contacto de la piel con sustratos infestados de hongos, inhalación de las toxinas llevadas por esporas. Excepto por la terapia de apoyo (dieta, hidratación), no existen tratamientos para la exposición a micotoxinas, aunque hay alguna evidencia de que algunas cepas de *Lactobacillus* atrapan efectivamente a las micotoxinas alimentarias (Nelson *et al.* 1994; Bennett & Klich, 2003; Desjardins & Proctor, 2007; Coleman *et al*., 2011).

1.1 Características de la infección fúngica

La capacidad para crecer a temperatura del cuerpo humano (37°C) es claramente un requisito importante para la infección micótica sistémica, pero la temperatura óptima de la biosíntesis de la mayoría de las micotoxinas está dentro de una gama más mesófila (20-30°C). Actualmente son conocidos los factores de patogenicidad en las plantas, mientras que en algunas micotoxinas, su importancia en micosis de humanos aún no es clara. Las micotoxinas son tóxicas aún en bajas concentraciones, constituyen toxigénica y químicamente, un conjunto heterogéneo que se agrupa sólo porque los miembros pueden causar enfermedad y muerte en los seres humanos y otros vertebrados. No es de extrañar,

que muchas micotoxinas muestren toxicidades superpuestas para los invertebrados, plantas y microorganismos (Bennett & Klich, 2003; Desjardins & Proctor, 2007).

En el caso de *Fusarium*, la alteración secundaria de la integridad de la piel parece ser un portal relativamente común de entrada de infección diseminada en el huésped inmunodeficiente. Esto puede ocurrir después de traumatismo local a la piel, después de la colocación de catéteres vasculares, o en la configuración de la onicomicosis con celulitis asociada (Walsh *et al*., 2004). Las fusariosis son comúnmente "resistentes" a la anfotericina B, los antifúngicos triazoles, el fluconazol y itraconazol no son activos contra *Fusarium* spp. (Reuben et al., 1999; Walsh *et al*., 2004; O'Donnell *et al*., 2008; Tortorano *et al*., 2008).

1.2 El género *Fusarium*

Las especies del género *Fusarium* son muy variables debido a sus características genéticas y a los cambios que el ambiente causa en la morfología de los cultivos. Estos hongos son habitantes del suelo que pueden ser transportados por los residuos vegetales y recuperados de las raíces profundas, como de las flores más altas. (Summerell *et al.*, 2003; Flores *et al*., 2005).

1.2.1 Características morfológicas más importantes.

Las especies de *Fusarium* pueden producir tres tipos de esporas llamadas macroconidias, microconidias, y clamidosporas. Algunas especies producen los tres tipos de esporas, mientras otras especies no. La presencia o ausencia de clamidosporas es un carácter primario en la taxonomía de *Fusarium*, si las clamidosporas están presentes, se pueden formar individualmente, en pares, en grupos, o en cadenas, ya sea con paredes rugosas o lisas. Las macroconidias se producen en una estructura especializada llamada esporodoquio (Nelson *et al.*, 1983). La forma y tamaño de las conidias es la característica principal para el reconocimiento de los fusarios. Las esporas están dispersas en el micelio aéreo o en esporodoquios o masas limosas (pionotos). Las macroconidias son curvadas, pluriseptadas, con una célula apical más o menos puntiaguda y en muchas especies con una célula basal en forma de pie. Las microconidias son comúnmente unicelulares, elipsoidales, fusiformes, claviformes, piriformes o subglobosos, similares en ancho a las macroconidias, con una base redondeada o truncada, por lo general formando cabezuelas mucosas, pero en algunas especies en cadenas basípetas. No siempre son producidos ambos tipos de conidias. Los conidióforos del micelio aéreo en algunos casos sólo constan de una célula conidiógena, en otros están ramificados, a veces en verticilos. Las monofiálides producen conidias desde una sola abertura y en las polifiálides surgen las esporas desde más de una abertura en la misma célula (Booth 1971). Las colonias de los distintos fusarios que crecen moderada a profusamente, tienen diversos colores (blanco, rosado pálido, rojo, anaranjado, púrpura, celeste, verde aceituna o pardo), especialmente en el reverso de la colonia, excepto pardo obscuro o negro. El micelio es ralo o denso, ya sea algodonoso, como un fieltro o con una zona central de funículos, pero en algunos casos es limoso. Hay fusarios con pionotos de color anaranjado. Los pigmentos que difunden en el agar suelen variar de color o tono con el pH. Algunas especies presentan zonas concéntricas de distinta morfología macroscópica debido a la secuencia luz-obscuridad. Los teleomorfos producen peritecios y pertenecen a

los géneros *Cosmospora, Gibberella, Nectria (Albonectria, Haematonectria), Monographella* y *Plectosporium* (Carrillo, 2003).

1.2.2 Ubicuidad del género *Fusarium.*

Las especies de *Fusarium* son muy abundantes en la naturaleza, se encuentran comúnmente en suelos y son capaces de crecer sobre una amplia gama de substratos. Son comunes en regiones tropicales y templadas y también se encuentran en el desierto, áreas alpinas, y el Ártico, donde las duras condiciones climáticas prevalecen. Muchas especies de *Fusarium* son abundantes en el suelo cultivado fértil y en pastizales, pero son relativamente poco comunes en suelos forestales. Las especies de *Fusarium* son a menudo consideradas como hongos del suelo, debido a su abundancia en el suelo y su frecuente asociación con raíces de plantas, ya sea como parásitos o saprófitos. Sin embargo, muchos de ellos tienen medios de dispersión activa o pasiva en la atmósfera y son colonizadores comunes de partes aéreas de la planta, donde pueden dar lugar a enfermedades de considerable importancia económica (Nelson *et al*, 1994).

Fusarium sp. es reconocido como saprófito del suelo y como patógeno de plantas y bacterias, es un hongo filamentoso, hialino, septado que pertenece al grupo de los agentes de las hialohifomicosis. En los seres humanos causa un amplio espectro de infecciones invasivas localizadas superficialmente, como queratitis y onicomicosis, también puede causar enfermedades alérgicas (sinusitis) en pacientes con sistema inmunológico debilitado (Olivares, *et al*., 2005), e infecciones diseminadas con compromiso multisistémico en pacientes inmunocomprometidos. Varias especies del género *Fusarium* han sido asociadas durante mucho tiempo con las infecciones de la piel, uñas y córnea (Hiemenz *et al.*, 1990; Musa *et al*., 2000) *Fusarium* spp hace parte hoy día, de un creciente grupo de hongos septados filamentosos, considerados patógenos emergentes, que aunque son menos comunes, también pueden causar morbilidad y mortalidad en pacientes inmunocomprometidos. La creciente importancia de estas cepas como causantes de amenazas para la vida por infecciones micóticas invasivas en pacientes trasplantados, con VIH, con quimioterapia intensiva, requiere familiaridad con la microbiología, la epidemiología, la patogenia y las opciones para la prevención y tratamiento de estos patógenos oportunistas poco comunes (Mayayo *et al*., 1999; Walsh *et al*., 2004). Las fusariosis en pacientes inmunocomprometidos, especialmente aquellos con neutropenia, tiene un mal pronóstico y corresponden una alta tasa de mortalidad. Las especies de *Fusarium* producen muchas toxinas que se correlacionan con hepatotoxicidad, teratogenicidad y carcinogenicidad en humanos y animales domésticos y de laboratorio (Nucci & Anaissie 2007; Meca *et al*., 2009).

Estos hongos representan un importante género de patógenos de plantas capaces de causar enfermedades tales como plagas, costras y pudriciones de raíz en varios cultivos de importancia agrícola (Desjardins & Proctor, 2007). Las especies de *Fusarium* spp. son bien conocidas por la producción de un gran número de metabolitos secundarios dañinos llamados micotoxinas que son responsables de varias enfermedades en el ganado y los seres humanos después de consumir fuentes de alimentos contaminados. La amplia distribución de las especies de *Fusarium* puede ser atribuida a la capacidad de estos hongos de crecer en

una amplia gama de sustratos y a sus eficientes mecanismos de dispersión (Nelson *et al*. 1994; Bennett y Klich 2003, Desjardins & Proctor, 2007; Coleman *et al*., 2011).

Los miembros del género *Fusarium* producen una gama de compuestos fitotóxicos químicamente diferentes, tales como ácido fusárico, fumonisinas, beauvericina, enniatinas, moniliformina y los tricotecenos. Estos poseen una gran variedad de actividades biológicas y los efectos metabólicos incluida la marchitez, necrosis de la inhibición del crecimiento, y la inhibición de germinación de las semillas. El posible uso de algunas toxinas fúngicas como micoherbicidas ha sido ampliamente revisado, y algunos metabolitos de *Fusarium*, como enniatinas y fumonisinas, se han evaluado por sus propiedades herbicidas (Garcés de Granada *et al*., 2001; Meca *et al*., 2009).

1.2.3 Epidemiología y espectro clínico de la fusariosis.

La inmunidad innata juega un papel importante en la defensa contra las infecciones por mohos, aunque hay poca información disponible sobre las defensas del hospedero contra las especies de *Fusarium*. Las fusariosis invasivas comparten muchas características con la aspergilosis invasiva y con otras infecciones por mohos, incluyendo su aparición en pacientes que reciben dosis altas de corticoides y aquellos con prolongada y profunda neutropenia. La importancia de la inmunidad en la patogénesis de la fusariosis es apoyada por estudios experimentales *in vitro* e *in vivo*. La forma clínica de la fusariosis depende en gran medida del estado inmune del hospedero y la puerta de entrada de la infección. Entre los anfitriones inmunocompetentes, la queratitis y la onicomicosis son las infecciones más comunes. Con menor frecuencia, la infección pueden ocurrir como resultado de la ruptura de la piel, tales como quemaduras y heridas, o la presencia de cuerpos extraños, tales como la queratitis en usuarios de lentes de contacto, que a veces provoca brotes de queratitis fusarial. También se ha descrito la peritonitis en pacientes que reciben diálisis peritoneal ambulatoria contínua. Otras infecciones en pacientes inmunocompetentes incluyen la sinusitis, neumonía, tromboflebitis, fungemia, con o sin afectación de órganos, endoftalmitis, artritis séptica, y osteomielitis (Nucci & Anaissie 2007).

Los pacientes inmunocomprometidos de alto riesgo para la fusariosis son aquellos con neutropenia prolongada y profunda y / o severa Inmunodeficiencia de células T (Boutati & Anaissie, 1997). A diferencia de la infección en el anfitrión normal, la fusariosis de la población inmunodeprimida suele ser invasiva y diseminada (Nucci & Anaissie, 2002). A nivel local, las infecciones invasivas tardías por lo general también se puede desarrollar entre los pacientes trasplantados (Sampathkumar & Paya, 2001). El portal principal de entrada para *Fusarium* spp., son las vías respiratorias, seguido por la piel en el sitio de la descomposición del tejido y posiblemente las membranas mucosas. La fusariosis en el aire se cree que se adquiere por la inhalación de la suspensión en el aire de conidios fusariales, según lo sugerido por la ocurrencia de neumonía y sinusitis (Nucci & Anaissie, 2007).

Dada la ubicuidad de especies de *Fusarium* en el medio ambiente, las fusariosis pueden ser potencialmente adquiridas en la comunidad, como es sugerido por la presencia de conidios fusariales en muestras de aire en exteriores (Anaissie *et al*., 2001; Boutati *et al*., 1997; Raad *et al.,* 2002). En un estudio prospectivo, especies de *Fusarium* fueron recuperadas a partir

del sistema de agua de hospital (agua, tanques de almacenamiento de agua, duchas, drenajes de lavabo), del aire del hospital y otros entornos. Las especies de *Fusarium* también estuvieron presentes en el aire exterior. Ducharse y otras actividades relacionadas con el agua parecía ser un mecanismo eficiente para la dispersión de conidios fusariales en el aire y la transmisión al huésped inmunodeprimido (Nucci & Anaissie, 2007).

1.2.4 Los factores de virulencia de *Fusarium.*

Las especies de *Fusarium* tienen varios factores de virulencia, incluyendo la capacidad de producir micotoxinas, tales como las tricotecenas, que suprimen la inmunidad humoral y celular y también pueden provocar la descomposición del tejido (Nelson *et al*., 1994). Además, las especies de *fusarium* tienen la capacidad de adherirse a material protésico y producir proteasas y colagenasas. Los miembros de las especies de *Fusarium solani* complejo (FSSC) y especies de *Fusarium oxysporum* complejo (FOSC) son los especímenes más frecuentemente aislados en laboratorio clínico (Nucci y Anaissie 2007; Coleman *et al*., 2011).

Determinantes genéticos de virulencia en *Fusarium oxysporum* han sido estudiados en ratones inmunodeprimidos. Los animales se inocularon con microconidias de una cepa patógena de tomate bien caracterizada (tipo salvaje), que dio lugar a la difusión de la infección y la muerte. La inoculación de los mutantes con mutaciones *knock out* en los genes que codifican tres factores de virulencia conocidos para las plantas de tomate (una quinasa activada por mitógenos, un factor de transcripción de respuesta del pH, o una sintasa clase V quitina) condujo a resultados discrepantes con respecto a la patogenicidad para las plantas y los animales. El gen de la proteína quinasa activada por mitógenos, que es esencial para la virulencia en patógenos fúngicos de plantas, no era necesario para la virulencia de *F. oxysporum* en este modelo. Por el contrario, el factor de transcripción de respuesta a pH se requiere para la virulencia animal, pero no para la virulencia en la planta (Nucci & Anaissie, 2007).

1.3 *Fusarium oxysporum*

Fusarium oxysporum es un hongo cosmopolita que existe en muchas formas patogénicas, parasitando más de 100 especies de plantas gimnospermas y angiospermas, gracias a los diversos mecanismos que posee el hongo para vencer las defensas de muchas plantas. Se caracteriza por producir colonias de rápido crecimiento, con una tasa diaria cercana a un centímetro en medio agar papa dextrosa (PDA) a 25ºC. La morfología de las colonias es muy variable y puede presentar dos tipos: una de tipo micelial caracterizada por la producción de abundante micelio aéreo, algodonoso, con una coloración variable, de blanco a rosado durazno, pero usualmente con un tinte púrpura o violeta más intenso en la superficie del agar y pocas microconidias y otra de tipo pionotal con la formación de poco o ningún micelio aéreo y abundantes microconidias (Booth, 1970; Bosland, 1988).

El hongo produce tres clases de esporas, microconidias generalmente unicelulares, sin septas, hialinas, elipsoidales a cilíndricas, rectas o curvadas; se forman sobre fiálides laterales, cortas, simples o sobre conidióforos poco ramificados. Las microconidias tienen 5-12 µm de largo por 2.5-3.5 µm de ancho. Las macroconidias, presentan paredes delgadas,

fusiformes, largas, moderadamente curvadas en forma de hoz, con varias células y de 3 a 5 septas transversales, con la célula basal elongada y la célula apical atenuada; las macroconidias tiene un tamaño de 27 a 46 µm de largo por 3.0 a 4.5 µm de ancho. Las clamidosporas están formadas a partir de la condensación del contenido de las hifas y de las conidias, de paredes gruesas; se forman simples o en pares, terminales o intercalares: poseen un tamaño de 5 a 15 µm de diámetro; gracias a las clamidosporas el hongo sobrevive en condiciones ambientales desfavorables y en el suelo como saprófito de vida libre en ausencia de plantas hospedantes (Garcés de Granada *et al.*, 2001).

1.3.1 Formas especiales (*formae specialis, f. sp.)* de *Fusarium oxysporum.*

El estudio taxonómico de *Fusarium oxysporum* se basa en la morfología, en el desarrollo de las estructuras reproductivas y en la manera como se forman. El taxón forma especial (*f. sp.*) corresponde a cepas cuyas características morfológicas y de cultivo son indistinguibles, pero muestran diferentes propiedades fisiológicas en su habilidad para parasitar un hospedante específico (Booth 1975). Este taxón se ha empleado para categorizar aislamientos que causan enfermedades en una especie, género o familia, en particular (Bosland & Williams, 1987; Bosland, 1988); por lo cual, aislamientos con el mismo rango de hospedantes, se asignan a una forma especial. Se han reportado más de 120 formas especiales del patógeno (Bosland, 1988; Kistler, 1997). Es posible distinguir patotipos o razas fisiológicas de una misma forma especial, cuando se determina la variedad de la especie vegetal que ataca y aún en poblaciones clonales al analizar características moleculares (DNA fingerprint, RFLPs, RAPDs) (Garcés de Granada *et al*, 2001).

Las formas especiales de *F. oxysporum* se subdividen en razas fisiológicas, con base en su especificidad patogénica sobre determinadas variedades de una misma especie de planta, razón por la cual las pruebas de patogenicidad y las características de virulencia de los aislamientos del hongo son el principal criterio para diferenciar las formas especiales de *F. oxysporum* y sus razas fisiológicas (Bosland, 1988). El conocimiento sistemático de *F. oxysporum* ha aumentado con técnicas como el polimorfismo de isoenzimas. En este contexto diversos autores reportan polimorfismo principalmente para la arilesterasa, siendo posible diferenciar por este método especies de *Fusarium*, formas especiales y razas de *F. oxysporum* (Garcés de Granada *et al*., 2001; Katan *et al*., 1991). Con esta técnica, Biles & Martín (1988) observaron diferencias en las razas de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* y *F. solani*, igualmente Bosland y Williams (1987) diferenciaron razas de *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans.* Para Kistler (1997), el carácter raza fisiológica puede o no correlacionarse con linaje clonal, ya que según Manicom y Bayen (1993) en *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* se presenta un alineamiento entre raza, grupo de compatibilidad vegetativa y patrones de DNA "fingerprint", pero en otras formas especiales como *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* las razas se encuentran dispersas en diferentes linajes clonales del patógeno (Elías *et al.*, 1993); o como sucede con *F. oxysporum* f. sp. *melonis* un único linaje clonal contiene todas las razas del patógeno (Jacobson y Gordon 1988).

1.3.2 Micotoxinas de *Fusarium oxysporum.*

Algunos miembros del género producen un rango de compuestos fitotóxicos químicamente diversos y con un amplio rango de actividad biológica y efectos metabólicos. Entre estos

cabe mencionar: moniliformina, la cual causa inhibición del crecimiento, necrosis y clorosis en muchas plantas; enniatina, inhibidora del crecimiento y germinación de las semillas de trigo; ácido fusárico, causal de marchitamiento de algunas plantas; fumomisina B 1, causante de inhibición de crecimiento y desarrollo del maíz (*Zea mays* L) y tóxico para tomate. (*Lycopersicum esculentum L*). Se han aislado de suelos de cultivos una serie de micotoxinas de *Fusarium*; las más importantes han sido las denominadas tricotecenas, las cuales también han sido encontradas en *F. oxysporum*. Estas toxinas no se disuelven en el agua y permanecen por años en el suelo, impidiendo el desarrollo normal de nuevos cultivos, hasta que se degraden (Hamed *et al*, 1991). Las tricotecenas aisladas a partir de *Fusarium*, pueden ser letales a muy bajas dosis (4 a 5 miligramos por persona). La toxina T-2 pertenece al grupo de las tricotecenas y es producida por *F. sporotrichioides* y por *F. oxysporum*, que son hongos que afectan primordialmente las cosechas de trigo, cebada, maíz y avena; requiriendo para un óptimo crecimiento, temperaturas menores a los 22ºC (72ºF) y alta humedad relativa; por consiguiente, las cosechas más afectadas provienen de lugares con climas relativamente fríos. Los efectos más negativos en aves, cerdos y vacunos asociados a la toxina T-2, son bajo consumo de alimentos y retardo de crecimiento; inducción de hemorragias y lesiones en la piel, siendo las aves muy susceptibles a las lesiones orales y del pico; inmunosupresión e incremento de infecciones oportunistas; trastorno de las funciones motoras; y la muerte en casos de consumo alto y crónico (Mirocha *et al*., 1989; Agrobiotek, 2009).

La longevidad del hongo ha sido estudiada y las micotoxinas pueden persistir en el suelo hasta por 40 años. Así mismo, se ha demostrado la alta sobrevivencia de sus clamidosporas, resistentes a la degradación química y microbiológica. Estas especies de *Fusarium* han sido descritas como "inhibidores microbianos" del crecimiento de plantas, los cuales pueden envenenar plantas con sus toxinas bajo condiciones de crecimiento natural en el suelo, si se presentan las condiciones favorables. Las micotoxinas impiden la germinación de semillas, el crecimiento de plántulas y el crecimiento de la planta en general y bajan el rendimiento del cultivo. Cuando hay un crecimiento masivo de estos organismos, ellos pueden ser un factor importante en la determinación de la fertilidad del suelo y el rendimiento final de los cultivos (Garcés de Granada *et al*, 2001).

1.4 Patogenicidad en plantas

Es un patógeno de importancia económica, causante de marchitamiento que infecta a más de 100 especies de plantas (Bosland, 1988) en diversos nichos ecológicos en todo el mundo, y que produce síntomas de marchitamiento mucho más rápidamente que otras especies de *Fusarium*, además, muestran un alto grado de especialización según el huésped de acogida y presenta alta sobrevivencia de sus clamidosporas, resistentes a la degradación química y microbiológica (González-Fernández *et al*, 2010). Un estudio reciente de la genómica comparativa de *Fusarium* revela que el linaje específico de cromosomas de *F. oxysporum* contribuyen a esta estricta especificidad de huésped (Garcés de Granada, *et al*., 2001; Ma *et al*, 2010; Klosterman *et al.* 2011). Las especies de *Fusarium* son algunos de los hongos más diversos y muy dispersos patógenos de plantas, causando plagas de importancia económica, pudrición de la raíz o marchitez. *F. oxysporum* (Fo), cuenta con una gama de hospederos muy amplia, infectando las plantas tanto monocotiledóneas y

dicotiledóneas (Armstrong y Armstrong, 1981) y es un patógeno emergente de los humanos inmunocomprometidos (O'Donnell *et al*., 2004) y otros mamíferos (Ortoneda et al., 2004)

F. oxysporum incluye miembros patógenos y no patógenos que no pueden ser distinguidos morfológicamente (Snyder and Smith, 1981). Las formas patogénicas están divididas en aproximadamente 120 formas especiales (*formae specialis*) de acuerdo a la planta hospedante y a las cuales causa enfermedad (Armstrong and Armstrong, 1981). Las formas no patógenas son aun más diversas (Gordon and Okamoto, 1992; Lori**,** *et al*, 2004; Nel, *et al*, 2006). Tanto los *F. oxysporum* patógenos como los no patógenos infectan las raíces de plantas. Mientras que los no patógenos están a menudo limitados al cortex donde sobreviven como enndófitos, los patógenos entran en el tejido vascular para causar marchitez en los huéspedes (Ito *et al*, 2005). Otros viven como hongos endofíticos en raíces de plantas, los hongos no patógenos pueden sobrevivir como saprofitos en la rizósfera o en la materia orgánica del suelo (Di Pietro *et al*, 2003).

Las formas especiales son nombradas de acuerdo a huésped especifico que ellas atacan, por ejemplo, aislados de patógenos que atacan el banano, son llamadas *F. oxysporum* f. sp. *cubense; F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, patógeno del tomate (Armstrong & Armstrong, 1981). Dichas formas especiales pueden ser subdivididas en razas. Las razas incluyen individuos dentro de las formas especiales que atacan un cultivo específico (Elias *et al*., 1993). No obstante, con referencia a la especificidad como fitopatógeno, pruebas de patogenicidad realizadas en condiciones de invernadero con el hongo causante del marchitamiento vascular en tomate (*F. oxysporum.* f. sp. *lycopersici*), causó infección en plantas de clavel y de rábano en 20 y 47% respectivamente. Mientras, Gardini (1993), en ensayos realizados directamente en el suelo natural, con aislamientos de *F. oxysporum* f. sp. *erythroxyli*, causante de marchitez vascular en plantas de coca, produjo en éstas la enfermedad en 100% y en 25% y 12.5% en achote y tomate, lo que cuestiona la especificidad del hongo, y su utilización como biocontrolador. (Garcés de Granada *et al*, 2001).

1.5 Patogenicidad en humanos y animales

En los últimos años, los hongos filamentosos se han implicado en un número creciente de infecciones oportunistas en pacientes inmunocomprometidos. *F. solani* es la especie que con mayor frecuencia causa graves infecciones diseminadas en humanos. Otras especies infecciosas, en menor grado, son *F. verticillioides, F. oxysporum* y *F. proliferatum.* Estas infecciones tienen una alta mortalidad y por el momento no existe ningún tratamiento eficaz contra ellos. En estudios de susceptibilidad *in vitro* de *Fusarium* spp. los fármacos antifúngicos disponibles no permiten la predicción de cualquier tratamiento adecuado (Mayayo *et al*., 1999).

Existen 50 especies dentro del género, siendo las más frecuentes *F. solani, F. oxysporum y F. verticillioides* (Lionakis & Kontoyiannis, 2004). El primer caso reportado en la literatura internacional data de 1973, en un paciente pediátrico con leucemia. Posteriormente, los reportes de casos y series de casos han ido incrementando, llegando a constituir en algunos

centros la segunda causa más frecuente de infección por hongos filamentosos después de *Aspergillus* sp. (Olivares, *et al*., 2005).

Rabodonirina, *et al* (1994), plantearon cómo especies de *Fusarium* consideradas previamente habitantes del suelo y contaminantes del laboratorio, han emergido como de significancia en pacientes inmunosuprimidos. Desde 1973 se han reportado 63 casos de infección por diferentes especies del género *Fusarium*. Entre las especies involucradas se destacan: *F. solani, F. oxysporum*, *F. verticillioides*, *F. moniliforme, F. proliferatum, F. chlamydosporum, F: dimerum* y *F. anthophilum*, las cuales producen infecciones de piel desarrollando principalmente máculas o pápulas y produciendo queratitis, endoftalmitis y artritis. *F. oxysporum* se ha relacionado específicamente con infecciones de piel, meninges, sangre, cerebro, esófago, ano, recto y paladar duro. Por su parte, Martino *et al.* (1994) reportaron alrededor de 80 casos de fusariosis diseminada en pacientes con problemas hematológicos malignos, destacando la baja actividad de los medicamentos antifúngicos disponibles contra las diversas especies de *Fusarium* involucradas. El punto de entrada del organismo es raramente detectado; se atribuye generalmente a inhalación de conidias, infección de piel, colonización de catéteres o del tracto gastrointestinal (Rabodonirina *et al*, 1994). En insectos, *Fusarium* figura entre las especies de hongos entomo-patógenos más importantes. Se han reportado una micotoxina no peptídica, el acido fusárico y otra no peptídica, tipo eniatinas en especies de *Fusarium* que afectan insectos (Telléz-Jurado *et al.*, 2009).

1.5.1 Asociación de *Fusarium* con cáncer y otras enfermedades crónicas en rumiantes y humanos.

Se ha reportado la producción de sustancias tóxicas por parte de algunas especies de *Fusarium*. Según Doyle (1997), se producen micotoxinas estables al calor, por lo cual los procesos de cocción no reducen su nivel de toxicidad. Luo *et al.* (1990) aseguran que las especies de *F. moniliforme y F. graminacearum* que atacan trigo, cebada y maíz, producen, además de pérdidas económicas, severos efectos tóxicos sobre humanos y animales domésticos. Entre algunas de las micotoxinas producidas por el hongo se destacan: deoxinivalenol (DON), nivalenol (NIV), zearalenona o factor estrógeno F-2 (ZEA) y tricotecenas. La zearalenona es producida además por *F. zea*, que crece sobre el maíz (Duffus, 1983).

Algunas de estas micotoxinas se han relacionado con micotoxicosis crónica en humanos tales como cáncer esofágico y enfermedad de Kashin-Beck; particularmente la toxina DON posee potencial como promotora de tumoración. Unas de las toxinas más frecuentemente detectadas son las fumomisinas, las cuales se han asociado con enfermedad en animales y humanos; causan enfermedad neurológica en caballos, edema pulmonar en cerdos, efectos hepatotóxicos y nefrotóxicos en animales domésticos y carcinogénesis en animales de laboratorio; por otra parte, se han detectado altos niveles de fumomisinas en áreas de cultivo de maíz con elevada incidencia de cáncer esofágico en humanos (Agrobiotek, 2009; Bennett & Klich, 2003).

Según Duffus (1983), *F. sporotrichioides* y *F. poae* producen las micotoxinas esporofusariogenina y poaefusariogenina, respectivamente, las cuales causan una enfermedad denominada aleukia alimentaria tóxica que ha sido observada por investigadores rusos. Sus síntomas incluyen leucemia, agranulocitosis, angina necrótica, tendencia a las hemorragias, sepsis y agotamiento de la médula ósea. Esta enfermedad está asociada a la ingestión de granos contaminados como trigo, centeno y cebada. No se conoce si la baja concentración de micotoxinas consumidas crónicamente puede causar efecto deletéreo en humanos. (Doyle, 1997).

1.6 *Fusarium oxysporum* como patógeno trans-reino

El grupo de agentes patógenos denominados trans-reino, incluye *F. oxysporum*, un hongo del suelo que provoca marchites vascular en más de cien especies diferentes de plantas (Armstrong & Armstrong, 1981). *F. oxysporum* también produce infecciones en seres humanos que pueden ir desde superficiales o localmente invasivas a la fusariosis diseminada, dependiendo o en función de la condición de la respuesta inmune del individuo (Nucci y Anaissie, 2007). Las cepas de *F. oxysporum* ocupan el segundo lugar en la incidencia de la fusariosis invasora después de las especies complejas del *Fusarium solani*. Aunque estos últimos son mucho más frecuentes (Zhang *et al*., 2006; Navarro-Velásco *et al*., 2011). Aislados patogénicos humanos de *F. oxysporum* tienen orígenes polifiléticos y responden mal a los agentes antihongos disponibles (Azor *et al*., 2009; O'Donnell *et al*., 2008). Un trabajo previo ha establecido un solo aislado de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, 9935 FGSC, que puede causar enfermedad tanto en plantas de tomate como en ratones inmunodeprimidos (Ortoneda *et al*., 2004).

1.7 *F. oxysporum* organismo modelo fúngico para estudios de patogenicidad en múltiples huéspedes

Los hongos son una clase extremadamente versátil de organismos en su mayoría saprófitos, que prosperan en materia orgánica. Un número relativamente pequeño de especies de hongos han desarrollado un estilo de vida parasitaria, asociado con la capacidad de reconocer y penetrar un huésped específico, explotar sus reservas de nutrientes, superar sus respuestas de defensa innatas, y causar enfermedad. La lista de organismos atacados por hongos abarca distintos grupos evolutivos desde eucariotas inferiores hasta superiores, entre las que destacan plantas, insectos y mamíferos, incluyendo seres humanos. Para causar enfermedades, los hongos patógenos se basan en un arsenal de patogenicidad y factores de virulencia, cuya implementación espacial y temporalmente correcta determina el potencial patogénico de base y la extensión de la infección, respectivamente. La disponibilidad de herramientas moleculares como la eliminación genes específicos (genes *knockout*) (Di Pietro *et al*., 2003) o mutagénesis insercional aleatoria (Sánchez López-Berges *et al*., 2009), así como la liberación de la secuencia completa del genoma (Ma *et al*., 2010) hacen de *F. oxysporum* un modelo único para estudiar las bases genéticas de la patogenicidad de hongos trans-reino (Navarro-Velásco *et al*., 2011).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Cepa de hongo

Se empleó la cepa de *Fusarium oxysporum* aislada y caracterizada por el GIEM, la cual fue cultivada en medio PDA (Oxoid, Ltd., Basingstoke, Inglaterra) crecida a 25°C durante 14 días, a intervalos de luz y oscuridad (16 h de luz / 8 h oscuridad). Se mantuvo a 4ºC, y se repicó cada tres meses (Renwick *et al*, 2006; Coleman *et al*., 2011).

2.2 Purificación de la cepa por medio de cultivos monospóricos

- El hongo se sembró, en un tubo inclinado con medio de cultivo y se incubó a 25°C durante 5 días.
- Se preparó una solución de Tween 80 al 0.1%, de la formulación comercial, se hizo una dilución al 10%.

Esta solución se puede mantener en stock en refrigeración (10°C). Para la preparación del Tween al 0.1%, se tomó 1 mL de la solución al 10% y se agregaron 99 ml de agua destilada. Esta solución fue esteriliza en el autoclave a 15 libras de presión durante 20 minutos.

- Se preparó una suspensión de conidias, a partir del tubo con el hongo en desarrollo.
- En un Eppendorf con 1 mL de la solución de Tween al 0.1% se colocó una pequeña porción del hongo y se agitó ligeramente para separar las conidias.
- Se agitó con vortex por 15 segundos y se colocó en baño maría de ultrasonido durante 3 minutos.
- Se cargó la cámara de recuento celular, Neubauer-Improved (Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Germany), se contó el número de conidias bajo el microscopio óptico.
- Una segunda dilución, se preparó tomando 100 µL de la suspensión anterior y se agregaron 900 µL de agua destilada, se agitó con vortex.
- Se realizaron las diluciones necesarias para tener una suspensión de concentración entre 50 a 100 conidias por mililitro.
- Se sembraron 100 µL de la concentración deseada en una placa con medio PDA y se distribuyó con una espátula de Drigalski.
- Se incubaron las placas a 25°C durante una semana.
- Pasados los 7 días se cortó con bisturí estéril, una colonia proveniente de una sola conidia en formación y se transfirió a otra placa con PDA y se incubó a 25°C (Cañedo & Ames, 2004).

2.3 Caracterización morfológica

2.3.1 Descripción de la colonia.

Con un asa de siembra, se tocó ligeramente el hongo a propagar y se sembró por punción en ángulo recto en el centro de la placa conteniendo el medio PDA. Se incubó a 25°C durante 15 días. Luego se observó la forma de crecimiento de la colonia, tamaño (el cual se mide de lado a lado pasando por el centro en dos puntos de la colonia), aspecto, textura y coloración de ambas caras y la producción de pigmentos (Valencia, 2004).

2.3.2 Descripción del hongo.

Se llevó a cabo la observación de las características macroscópicas de la cepa de *F. oxysporum*, aislada por el GIEM, en un cultivo de 14 días de desarrollo en medio PDA e incubado a 25°C. Para la observación microscópica de las estructuras fúngicas, se realizó una tinción específica de conidias, para lo cual, primero se sembró el hongo en una placa con medio de cultivo PDA. Se dejó crecer por espacio de 14 días a 25°C.

Se emplearon tres métodos para observar las características del hongo:
i) En una lámina portaobjetos se colocó una gota de azul de algodón (*Lactophenol Cotton blue).* Con una aguja entomológica No. 000, se tomó una pequeña muestra del tejido hifal y se dispersó en un portaobjetos sobre una gota del colorante y se colocó un cubre-objetos. Se observó al microscopio plano con aceite de inmersión (Cañedo & Ames, 2004).

ii) Se empleó el método de montaje directo o impronta con cinta adhesiva, el cual consistió en tocar levemente la superficie del hongo en desarrollo, con una cinta adhesiva transparente y pegarla sobre una lámina portaobjetos provista de una gota de azul de lactofenol. Se observó al microscopio plano con aceite de inmersión (Valencia, 2004).

iii) Microcultivo, el cual consistió en cortar un disco de PDA con sacabocados esterilizado y transferirlo a una placa portaobjetos, se procedió a sembrar el hongo, por punción en el centro del disco de PDA con aguja flameada, utilizando pinzas se cubrió el disco con una laminilla y se llevó a la caja de Petri para microcultivos, se adicionaron 2 mL de agua con glicerina al 1% y se incubó a temperatura ambiente durante 4-8 días. Luego se observó la lámina directamente al microscopio óptico con el objetivo de 40X y de inmersión (Valencia, 2004).

2.4 Mantenimiento de la cepa

2.4.1 Crecimiento y propagación de la cepa en diferentes medios de cultivo.

2.4.1.1 Agar PDA.

La cepa de *F. oxysporum* seleccionada es cultivada en cajas con agar PDA (papa 2%, dextrosa 0.4%) a 25ºC de 7-14 días.

2.4.1.2 Medio V8.

La cepa de *F. oxysporum* fue repicada en medio V8, reportado por Coleman *et al.,* (2011) el cual está compuesto principalmente por jugo de ocho vegetales al 10% (Campbell Soup Company) y agar al 2.2% (Oxoid, Ltd., Basingstoke, Inglaterra) en nuestro caso, se adicionaron 100 μg/mL de oxitetraciclina y 100 μg/mL ampicillin, para prevenir contaminación bacteriana, se mantuvo a temperatura ambiente de 6-12 días.

2.5 Conservación de la cepa de *Fusarium oxysporum* en papel de filtro.

a. Se cortaron cuadros de papel filtro de 1 cm^2, se colocaron dentro de una caja Petri y fueron esterilizarlos en autoclave.

b. Se colocaron 10 cuadros de papel filtro esterilizado sobre el medio de cultivo PDA en cada caja de Petri.
c. Se preparó una suspensión de conidias y micelio de un aislamiento del hongo, de la siguiente manera:
– Se adicionó agua destilada estéril sobre el micelio del hongo, se raspó luego la superficie de la caja con la punta de una pipeta esterlizada hasta que se obtuvo una suspensión. Se tomó un poco de la suspensión con pipeta y se colocó una gota en cada cuadrito de papel filtro esterilizado de las cajas de Petri preparadas en el paso *(b)*
d. Se incubaron las cajas a 25°C durante 10 días.
e. Pasados los 10 días, se retiraron los cuadros de papel filtro de las cajas Petri, con una pinza estéril, se depositaron en una caja Petri esterilizada vacía. Las cajas se colocaron invertidas (la cara conteniendo el hongo hacia abajo) para que los cuadros no se enrollaran al secarse. Los cuadros de papel filtro se secaron durante 7 días a 25°C.
f. Se pasaron los cuadros secos (con una pinza flameada) a bolsitas de papel mantequilla esterilizado, las cuales se introdujeron a su vez, en otra bolsa más grande del mismo material, para almacenarlos. En ésta última bolsa, se colocó toda la información referente al hongo *F. oxysporum y* se almacenó a -20°C (Castellanos *et al.,* 2000).

2.6 Prueba de almacenamiento
a. Se tomaron por triplicado, cuadros de papel filtro almacenado a -20°C
b. Se sembró el cuadro en un nuevo medio de PDA. Después de 5 días, el hongo debe crecer en este medio de cultivo.
c. Se observó el crecimiento del hongo en el estereoscopio en busca de contaminantes, tales como otros hongos o bacterias. En caso de presentarse contaminación, tanto la muestra observada como los demás cuadros de papel filtro almacenados deberán desecharse, y se deberá repetir todo el proceso de conservación (Castellanos *et al.,* 2000).

2.7 Recuperación del hongo almacenado
a. Se trasladó, con una pinza esterilizada, uno de los cuadros de papel filtro con el hongo que habían sido almacenados en bolsitas a –20 °C, a una caja Petri que contenía medio de cultivo PDA.
b. Se depositaron 1 o 2 µL de una solución de peptona-sacarosa (peptona al 10%; sacarosa al 20%) en los cuadros de papel filtro, para hidratar el hongo y que pudiera ser esparcido sobre toda la superficie del medio, usando la punta de la pipeta, de esta manera se aumentó el campo de crecimiento del hongo.
c. Se incubaron las cajas Petri del paso anterior a 25°C. El desarrollo del hongo se reactivó después de 12 días, quedando listo para ser usado en ensayos posteriores (Castellanos *et al.,* 2000).

2.8 Caracterización fisiológica
Esta caracterización se basó en la evaluación de rendimiento en número de microconidias y viabilidad de las mismas (porcentaje de germinación). Para este ensayo se partió de cultivos recientes de máximo 14 días de desarrollo (Cañedo & Ames, 2004).

2.8.1 Número de microconidias.

Se sembraron 10 µL de suspensiones de microconidias de las concentraciones 10^4, 10^5 y 10^6 microconidias/mL en medio PDA y se distribuyeron uniformemente en cajas de Petri con la ayuda de una espátula de Drigalski. Se incubaron a 25°C durante 15 días. Se realizaron diluciones seriadas con un factor de 0.1. Luego se cargó la cámara de Neubauer Improved y se contó el número de microconidias/mL en las tres concentraciones de microconidias de *F. oxysporum*. Se realizaron cuatro repeticiones por concentración (Cañedo & Ames, 2004).

2.8.2 Viabilidad de microconidias.

Se sembraron 5 alícuotas de 5µL de las suspensiones de microconidias de concentración de 10^4, 10^5 y 10^6 microconidias/mL en medio PDA. Luego se incubaron las cajas a 25ºC durante 24 horas. Se adicionó azul de lactofenol y se distribuyó uniformemente para detener la germinación. Se procedió a cortar la porción de agar que contenía la alícuota de la suspensión de microconidias y se colocó sobre una lámina portaobjetos, se cubrió con un cubre objetos. Se registró el número de microconidias germinadas (aquellas cuyo tubo germinativo fuera dos veces mayor al diámetro de la microconidia). Por cada aislamiento se realizaron cinco repeticiones (Cañedo & Ames, 2004).

2.9 Determinación del crecimiento radial de *Fusarium oxysporum* a 25 y 37ºC

Empleando una adaptación del método de Coleman *et al.* (2011), se inocularon microconidias de *F. oxysporum* a placas de Petri con medio agar-agua al 2%, las cuales se dejaron crecer durante tres días a 25°C. Se retiraron redondeles de 5 mm de diámetro del cultivo del hongo en crecimiento y se inocularon en placas con medio PDA con el lado del micelio directamente en la superficie del PDA. Las placas inoculadas se colocaron, en la oscuridad durante 7 días, un grupo se incubó a 30°C y otro grupo fue incubado a 37°C. El ensayo de crecimiento se realizó con dos réplicas independientes. Se calculó el porcentaje de crecimiento radial y se determinó la desviación estándar (Coleman *et al.*, 2011). Transcurridos 14 días después de la siembra del hongo en el centro de las cajas de Petri, se realizó el recuento de microconidias totales aisladas de los cultivos al séptimo día, empleando la cámara de Neubauer-Improved.

2.10 Análisis Estadístico

Para la caracterización fisiológica de las microconidias del hongo se realizó un diseño experimental balanceado, de un solo factor, con efectos fijos y completamente aleatorizado, con tres tratamientos o niveles (tres suspensiones de diferente concentración de microconidias/mL de *F. oysporum*), con cuatro observaciones para cada uno. Para la viabilidad (germinación de microconidias), también se empleó un diseño experimental balanceado, de un solo factor, con efectos fijos, con 3 tratamientos o niveles (tres concentraciones de microconidias/mL del hongo), y en cada uno se realizaron tres observaciones. Se trabajó con α=0.05, empleando el *software* STATGRAPHICS Centurion XVI versión16.2.04. Se llevaron a cabo los análisis estadísticos para evaluar diferencias significativas tanto en el recuento como en la germinación de las microconidias (viabilidad) en las tres concentraciones. Para la evaluación del crecimiento radial de *F. oxysporum*, a dos temperaturas, se realizó un diseño experimental balanceado, completamente

aleatorizado con efectos fijos, se realizó análisis de varianza de una vía, con dos tratamientos o niveles (microconidias/mL incubadas a 30°C y microconidias/mL incubadas a 37ºC) cada uno con cinco observaciones.

3. RESULTADOS

3.1 Caracterización morfológica

El la figura 1a y 1b se aprecian las características macroscópicas de la cepa de *F. oxysporum*, de 14 días de desarrollo crecida en PDA a 25°C. Mediante la caracterización microscópica, se observaron las estructuras fúngicas de la cepa aislada en campo por el GIEM (figura 1c y 1d)

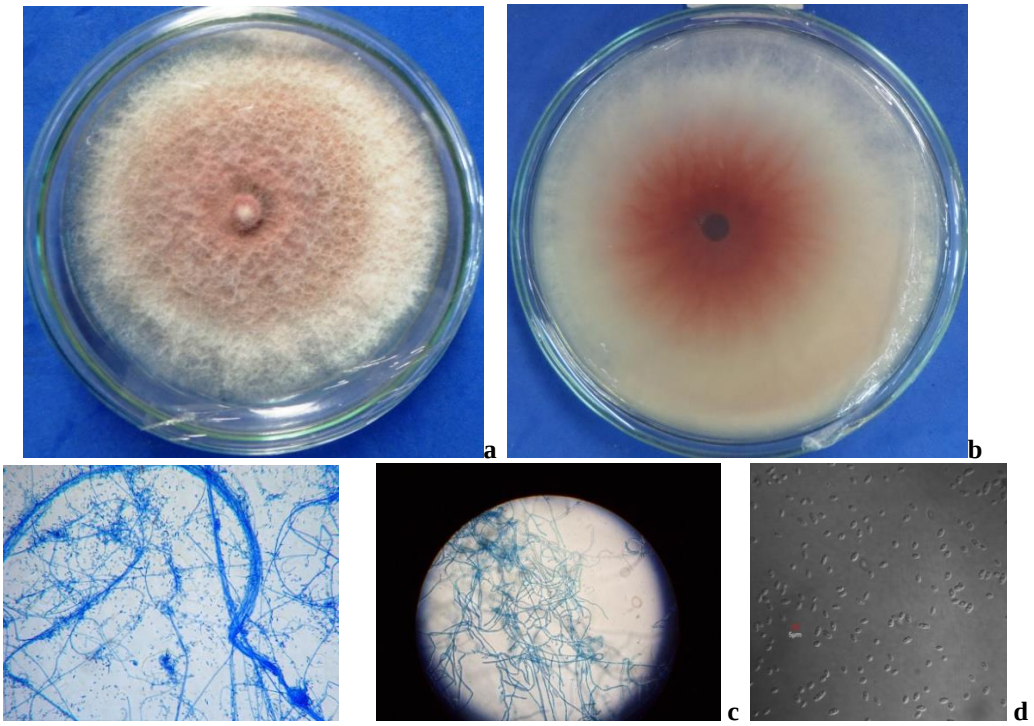


Figura 1. Morfología de la cepa de *F. oxysporum,* aislada en campo (a y b) Características macroscópicas (c) Características microscópicas, observadas a partir de microcultivo con tinción de azul de algodón-lactofenol observado a 100X con microscopio óptico. (d) Aspecto de las microconidias, con objetivo de immersión 60X con microscopio láser confocal, Olympus FV1000

3.2 Mantenimiento de la cepa en medio V8

La cepa de *F. oxysporum* fue repicada en medio V8, se obtuvieron cultivos sin degeneramiento, con crecimiento abundante de micelio algodonoso, después de 14 días de repicado; al realizar el recuento presentaba microconidias en concentración de $1x10^6$ conidias/mL. En la figura 2a se aprecian dos cultivos que presentan zonas de degenaramiento en medio PDA. En la figura 2b se observa el crecimiento normal del hongo

en medio V8 y en el posterior repique en PDA (figura 2c) también se presentó crecimiento normal con su coloración característica.

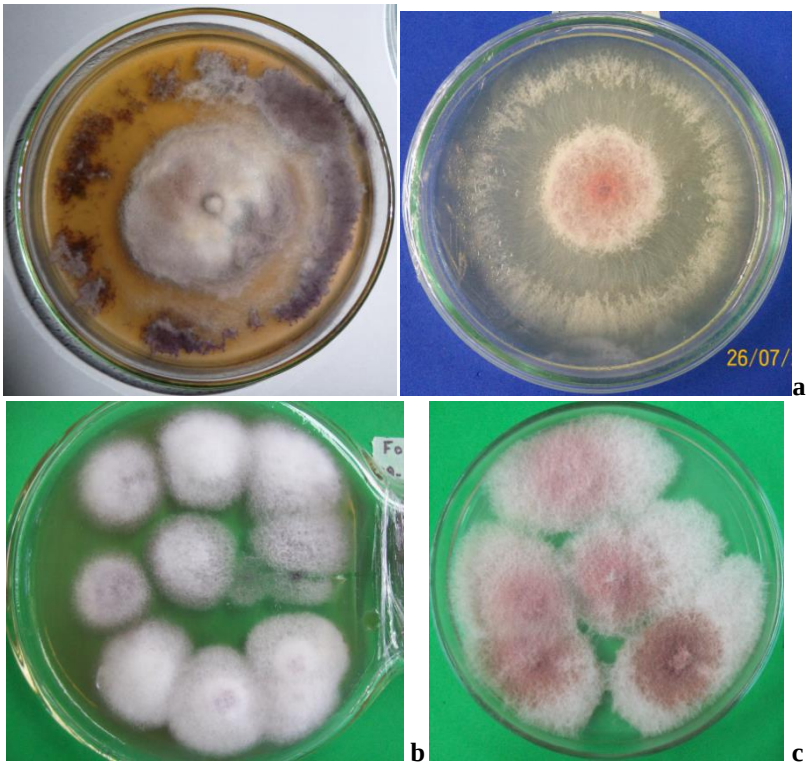


Figura 2. Cultivo de *F. oxysporum* en medio PDA y V8 (a) Aspecto de cultivos en PDA que presentan degeneramiento; b) cultivo en medio V8 con crecimiento normal y uniforme; (c) repique en medio PDA a partir del cultivo en medio V8.

3.3 Caracterización fisiológica

3.3.1 Recuento del número de microconidias.

En la figura 3 se presenta el número de microconidias/mL contadas en las tres suspensiones de *F. oxysporum.* La proporción del número de microconidias en la suspensión más concentrada (10^6) fue 10 veces mayor que en 10^5 y 78 veces mayor que en la suspensión más diluida, 10^4. La proporción entre la suspensión de concentración 10^5 fue 7 veces mayor que en 10^4.

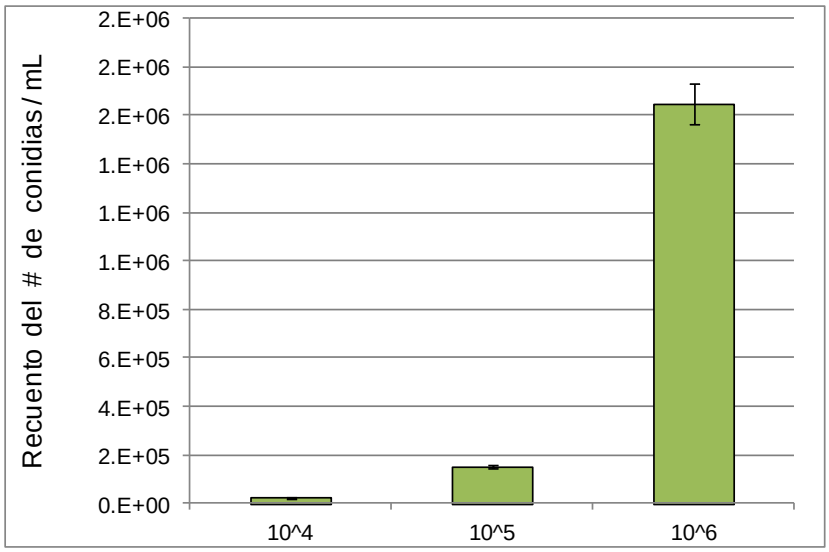


Figura 3. Recuento de microconidias de *F. oxysporum*. Conteo de microconidias en tres suspensiones de diferente concentración (10^4, 10^5 y 10^6 microconidias/mL).

3.3.1.1 Análisis estadístico.

El análisis de varianza para el recuento de las tres suspensiones de microconidias/mL ($1x10^4$, $1x10^5$ y $1x10^6$) mostró un valor-p de la prueba F menor que 0.05, indicando que existen diferencias estadísticamente significativas entre la media de número microconidias/mL entre un nivel de concentración y otro, con un nivel de confianza del 95.0%. Los resultados del ANOVA son estadísticamente válidos, pues se comprobó el cumplimiento de los supuestos de normalidad, homocedasticidad e independencia.

3.3.2 Viabilidad de las microconidias.

Se realizó el análisis de la viabilidad de las microconidias a 25°C, dado en porcentaje de germinación, en las tres diferentes concentraciones en Tween-80 (0.10%). En la figura 4 se aprecian los porcentajes de germinación para cada una de las concentraciones de microconidias evaluadas. En las concentraciones de 10^4 y 10^6 el porcentaje de germinación fue similar y superior al que se obtuvo con 10^5, cabe destacar que con las tres concentraciones se obtuvo una germinación superior al 80 %.

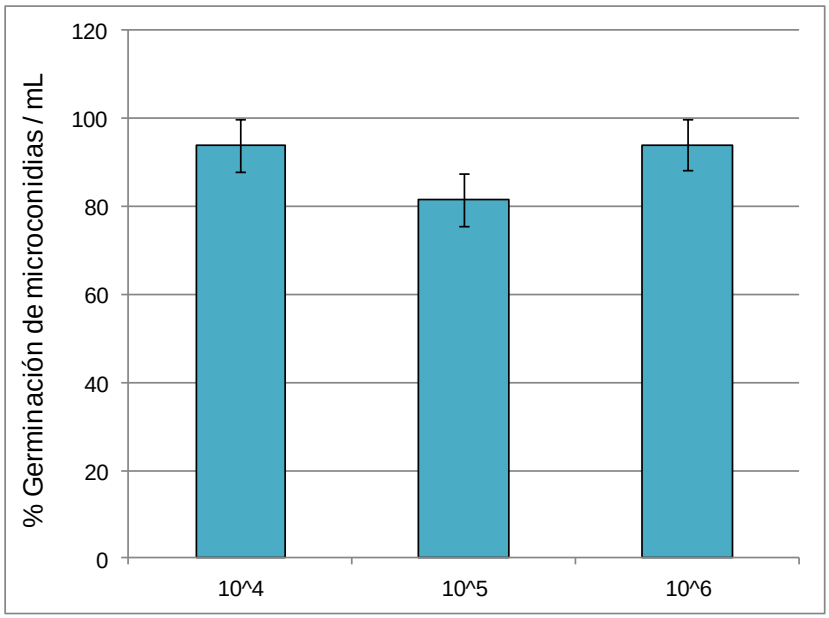


Figura 4. Viabilidad de las microconidias de *F. oxysporum.* Porcentaje de germinación de las conidias / mL de *F. oxysporum* en tres concentraciones a 25°C.

3.3.2.1 Análisis estadístico.

La viabilidad de microconidias determinada como porcentaje de germinación, se analizó mediante un análisis de varianza donde se obtuvo un valor-p < 0.05 de la prueba F, que indicó la existencia de una diferencia estadísticamente significativa entre la media de % germinación entre un nivel de concentración y otro, con un nivel del 95.0% de confianza. Para validar el modelo estadístico, se comprobó el cumplimiento de los supuestos de normalidad de los residuales, homocedasticidad de la varianza e independencia de las observaciones.

3.4 Determinación del crecimiento radial de *Fusarium oxysporum*

Se observó que los cultivos mantenidos a 37°C crecieron en menor proporción que los cultivos mantenidos a 30°C (figura 5), después de 7 días de desarrollo.

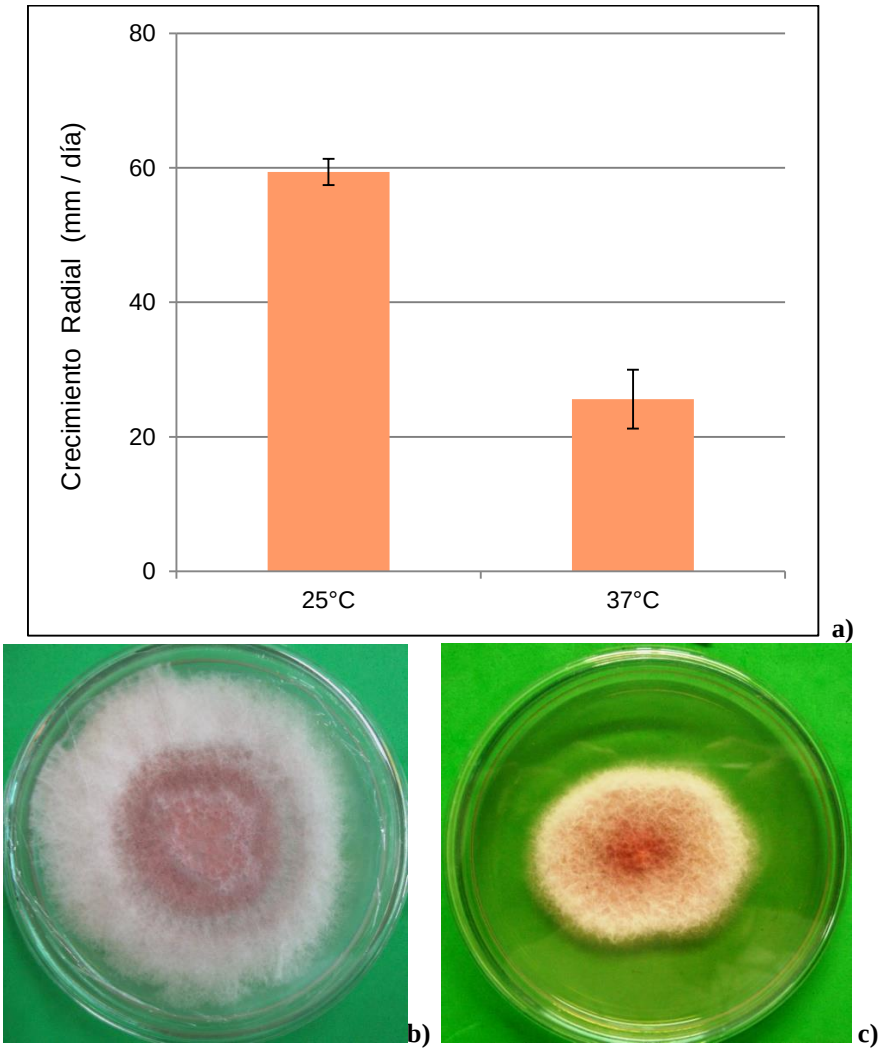


Figura 5. Determinación del crecimiento radial de *F. oxysporum* a 30 y 37°C. (a) gráfica de crecimiento radial a las dos temperaturas evaluadas. (b) Aspecto del cultivo de 7 días de desarrollo a 30°C. (c) Aspecto del cultivo de 7 días de desarrollo a 37°C.

3.4.1 Análisis estadístico.

El análisis de varianza para el crecimiento radial medido en el séptimo en mm/día, presentó un valor-p para la prueba de F, menor que 0.05, por lo tanto existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de crecimiento radial entre un nivel de temperatura y otro, con un nivel del 95.0% de confianza. Para validar el modelo estadístico, se comprobó el cumplimiento de los supuestos de normalidad de residuos, homocedasticidad de la varianza e independencia de las observaciones, mediante el análisis de residuos.

4. DISCUSIÓN

4.1 Mantenimiento de la cepa en medio V8

En general, las especies del género *Fusarium* son muy difíciles de conservar de modo estable y pasan por fases bien definidas cuando se conservan en cultivo artificial. En condiciones favorables pasan de una fase predominantemente micelial a otra de esporulación espontánea y de aquí a un estadío degenerado con producción anormal y escasa de esporas. Muchos investigadores han observado que la siembra de esporas producirá corrientemente cultivos esporulados, mientras que la siembra de micelio tenderá a retardar la esporulación y dará finalmente cultivos completamente estériles. Para su cultivo, así como para conservar tanto como sea posible las características deseadas, se recomienda el uso de preparados a base de sustancias vegetales (Smith, 1963).

La cepa de *F. oxysporum* seleccionada fue cultivada en cajas con PDA (extracto de papa 2%, Dextrosa 0.4%) a 25ºC de 7-14 días. Se obtuvieron cultivos sanos de aspecto normal tanto a nivel macro como microscópico, aunque después de repiques sucesivos se notó la aparición de zonas de aspecto liso y cremoso sin micelio, con escasa cantidad de conidias, en otros casos se notó la ausencia total de crecimiento en diferentes zonas de la caja, en ambos casos eran evidentes las zonas de degeneramiento del cultivo, las cuales pueden aparecer en medios artificiales por pérdida de factores de virulencia del hongo asociados al huésped, que por lo general es una planta; para resolver este inconveniente se realizaron diferentes preparaciones de medios naturales con diferentes sustratos, que incluyeron ahuyama, jugo de tomate, hasta concluir con el uso de medio V8, tanto comercial como preparado en el laboratorio, logrando recuperar la vitalidad de la cepa y evitando la degeneración de la misma (Coleman *et al*., 2011).

Dado que este estudio depende absolutamente de la viabilidad y vigor de la cepa fúngica y del desarrollo homogéneo y reproducible con producción similar de microconidias, era de vital importancia lograr mantener la cepa de estudio en condiciones óptimas, para lo cual se escogió entre varios medios de cultivo naturales preparados en el laboratorio, para recuperar y estimular la cepa de *F. oxysporum*. Se seleccionó el medio V8, dicho medio mantiene las características morfológicas del hongo y se obtienen cultivos vigorosos que producen gran cantidad de microconidias (Coleman *et al.* (2011). En este medio, la coloración de los cultivos es blanca amarillenta o ligeramente rosa, diferente de la coloración habitual que presenta en medio PDA, rosa, salmón o púrpura, sin embargo no se observan zonas del cultivo degeneradas tal y como ocurre en PDA después de repiques sucesivos de la cepa. Este medio provee los nutrientes que no se encuentran en medio artificiales de cultivo, además el medio V8 simula las condiciones naturales en que se desarrolla la cepa silvestre, las plantas, dado que el medio V8 está preparado con ocho vegetales frescos, sin aditivos, y por su proceso de pasteurización, se encuentra libre de contaminantes, es un medio ideal para el mantenimiento de la cepa en condiciones laboratorio por largos periodos. Además. la técnica de conservación de la cepa mediante el secado y almacenamiento de las conidias del hongo en papel de filtro, a temperatura de -20°C, resultó un método ideal de conservación, económico y fácil de realizar, permitiendo la disponibilidad de la cepa sin tener que recurrir a repiques sucesivos.

4.2 Caracterización fisiológica de las microconidias

Se estableció que el mayor recuento se obtuvo con la suspensión de la concentración más elevada de microconidias de *F. oxysporum* por mL, las diferencias entre las medias de las diferentes concentraciones de microconidias del hongo evaluadas, fueron estadísticamente significativas, esto es, que la proporción en el número de microconidias es directamente proporcional a la concentración de cada suspensión. La verificación de la varianza con la prueba de Levene permitió establecer que los errores asociados a la preparación y conteo de las tres suspensiones de microconidias, no presentaron diferencias estadísticamente significativas y que por lo tanto el método de obtención y recuento de las suspensiones de microconidias, es reproducible y los errores aleatorios asociados al método de preparación y recuento de las suspensiones presentan igual variabilidad.

La caracterización de la viabilidad que se llevó a cabo en términos del porcentaje de germinación, permitió establecer que las microconidias germinan rápidamente (24 horas) en medio PDA, con un porcentaje alto entre el 80-94% en todas las concentraciones evaluadas, es decir, que la viabilidad de las microconidias del hongo permanece elevada independientemente de la cantidad de microconidias presentes en la suspensión. En este caso tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas para la varianza de las observaciones las cuales presentaron adecuada aleatorización, por lo tanto la técnica de verificación de la germinación de las microconidias es reproducible a pesar de ser bastante manual y susceptible a errores del experimentador.

4.3 Determinación del crecimiento radial de *Fusarium oxysporum*

El ensayo de crecimiento radial se llevó a cabo con el fin de determinar la capacidad de la cepa de *F. oxysporum* para crecer a temperaturas fisiológicamente relevantes para los ensayos posteriores. Los ensayos se llevaron a cabo a 30°C y 37°C para evaluar la termo tolerancia de *F. oxysporum* a la temperatura fisiológica de mamíferos (37°C). El análisis de varianza realizado, indicó diferencias significativas en la media de crecimiento del hongo entre las dos temperaturas evaluadas. Hubo una correlación clara entre la disminución del crecimiento radial y la temperatura de 37°C. Todas las réplicas de los cultivos del hongo mostraron un crecimiento reducido a 37°C, comparado con el crecimiento radial mostrado a 30°C (figura 5a y 5b). Cabe resaltar que Coleman, *et al* (2011) realizaron hallazgos interesantes al evaluar la patogenicidad a 37°C de cepas de diversos orígenes de *F. oxysporum*, y encontraron que a pesar de que el crecimiento del hongo era más lento a 37 que a 30°C, su capacidad para causar la muerte del huésped modelo permanecía en el tiempo.

5. CONCLUSIONES

Para mantener la cepa de *F. oxysporum* en condiciones de laboratorio por largos periodos de tiempo y con repiques sucesivos en medio de cultivo artificial, es necesario implementar con frecuencia, la técnica de cultivo en medios naturales para evitar la aparición de degeneramiento que ocasiona la pérdida de las características de viabilidad y patogenicidad por deterioro de los factores de virulencia asociados a esta cepa proveniente de campo.

El medio de cultivo natural V8, resultó ser el medio ideal para regenerar las condiciones de cultivo para *F. oxysporum*, siendo un medio económico que permitió propagar la cepa del hongo, y obtener cultivos vigorosos que producían gran cantidad de microconidias, y mantenían las características morfológicas del hongo.

La caracterización fisiológica de las microconidias de *F. oxysporum* mediante el recuento y la determinación del porcentaje de germinación de las microconidias es un método reproducible y preciso.

El crecimiento radial de *F. oxysporum* presentó clara correlación con la temperatura, presentándo menor crecimiento radial a 37 que a 30°C.

6. BIBLIOGRAFÍA

Agrobiotek 2009. 08/09/13 Las Micotoxinas en la Agroindustria, www.agrobiotek.com/agrobiotek/index.php?option=com_content&view=article&id=58%3Aimportancia-micotoxinas&catid=37%3Aarticulos&Itemid=57&showall=1 3/5

Anaissie EJ, Kuchar RT, Rex JH, Francesconi A, Kasai M, *et al.* Fusariosis associated with pathogenic Fusarium species colonization of a hospital water system: a new paradigm for the epidemiology of opportunistic mold infections. Clin. Infect. Dis. 2001;33:1871–1878.

Armstrong GM, Armstrong JK. in Fusarium: Diseases, Biology and Taxonomy (eds Nelson, P. E., Toussoun, T. A. & Cook R.).1981;391–399 PennStateUniversity Press.

Azor M, Cano J, Gené J, Guarro J. High genetic diversity and poor in vitro response to antifungals of clinical strains of *Fusarium oxysporum*, J. Antimicrob. Chemother. 2009;63:1152–1155.

Bennett JW, Klich M. Mycotoxins. Clin. Microbiol. Rev. 2003;16:497e516.

Biles CL, Martin RD. Isozyme analysis *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* races and selected *Fusarium* sp. Phytopathology. 1988;78:625.

Booth C. The present status of *Fusarium* taxonomy, Annu. Rev. Phytopathol. 1975;13:83-89.

Booth C. The Genus Fusarium. CMI, Kew. 1971;cap:2.

Booth C. *Fusarium oxysporum* CMI descriptions of plant pathogenic fungi and bacteria. No. 211. Commonwealth Agricultural Bureaux. 1970; London.

Bosland PW. *Fusarium oxysporum* a pathogen of many plant species, Adv. Plant Pathol. 1988;6:281-289.

Bosland PW, Williams PH. An evaluation of *Fusarium oxysporum* from crucifers based on pathogenecity, isozyme polimorphism, vegetative compatibility and geographical origin, Can. J. Bot. 1987;65:2067- 2073.

Boutati EI, Anaissie EJ. *Fusarium*, a significant emerging pathogen in patients with hematologic malignancy: ten years' experience at a cancer center and implications for management. Blood. 1997;90:999–1008.

Cañedo V, Ames T. Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatogenos. Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú. 2004;1-43.

Carrillo L. Los hongos de los alimentos y forrajes. Capitulo 6. Fusarium. © Universidad Nacional de Salta. 2003;1-126.

Castellanos G, Jara C, Mosquera G. Guías prácticas de laboratorio para el manejo de patógenos del frijol. Guía 4 *Fusarium oxysporum*. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Publicación CIAT. 2011;(375).

Coleman JJ, Muhammed M, Kasperkovitz PV, Vyas JM, Mylonakis E. *Fusarium* pathogenesis investigated using *Galleria mellonella* as a heterologous host. Fungal Biol. 2011;115(12):1279–1289.

Desjardins AE, Proctor RH. Molecular biology of *Fusarium* mycotoxins. Int. J. Food Microbiol. 2007;119:47-50.

Di Pietro A, Madrid MP, Caracuel Z, Delgado-Jarana D, Roncero MIG. ***Fusarium oxysporum:*** exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. Mol. Plant Pathol. 2003;4:315–326

Dixon DM, McNeil MM, Cohen ML, Gellin BG, LaMontagne JR. Fungal infections. A growing threat. Public Health Rep. 1996;111

Doyle ME. *Fusarium* mycotoxins. Food Research Institute. Universidad de Wisconsin - Madison. 1997;1-5.

Duffus JH. Toxicologia Ambiental. Ediciones Omega. Barcelona, 1983;61-62.

Elias KS, Zamir D, Lichtman-Plebant T, Katan T. Population structure of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*: restriction fragment length polymorphims provide genetic evidence that vegetative compatibility group is an indicator of evolutionary origin. Mol. Plant Microbe Interact. 1993;6:565-572.

Flores C, San Martín S, Carrillo L, Bejarano N. Especies de *Fusarium* de la Quebrada de Lozano, Jujuy, Argentina. Rev. Argent. Microbiol. 2005;37:109-112.

Gardini E. La marchitez de la coca y sus implicaciones ecológicas en el Alto Huallaza. Universidad Nacional Agraria de la Selva Tingo María. Pern Convenio UNAS – CORAH. 1993.

Garcés de Granada E, Orozco de Amézquita M, Bautista GR, Valencia H. *Fusarium oxysporum* El hongo que nos falta conocer, Acta Biol. Colomb. 2001;6:7-26.

González-Fernández R, Prats E, Jorrín-Novo JV. Proteomics of plant pathogenic fungi. J. Biomed. Biotechnol. 2010;932527:1-36.

Gordon TR, Okamoto D. Population structure and the ralatioship between pathogenic and non-pathogenic strains of *Fusarium oxysporum.* Phypathology. 1992;82:73-77.

Hamed K, Abbas C, Boyette D, Hoagland RE, Vesonder RF. Bioherbicidal potential of *Fusarium moniliforme* and its phytotoxin, fumomisin. Weed Sci. 1991;39:673- 677.

Hiemenz JW, Kennedy B, Kwon-Chung K. Invasive fusariosis associated with an injury with a stingray barb. J. Med. Vet. Mycol. 1990;28:209–213.

Ito SI, Nagata A, Kai T, Takahara H, Tanaka S. Symptomless infection of toamto plants by tomatinase producing by *Fusarium oxysporum formae speciales* non pathogenic on tomato plants. Physiol. Mol. Plant Pathol. 2005;66:183-191.

Jacobson DJ, Gordon TR. Vegetative compatibility and self-incompatibility within *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis.* Phytopathology. 1988;78:668-672.

Katan T, Zarnir D, Sarfatti M, Katan J. Vegetative compatibility groups and subgroups in *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis - lycopersici*. Phytopathology. 1991;81:255-262.

Kistler HC. Genetic diversity in the plant- pathogenic fungus *Fusarium oxysporum.* Phytopathology. 1997;87:474-479.

Klosterman SJ, Subbarao KV, Kang S, Veronese P, Gold SE, *et al.* Comparative Genomics Yields Insights into Niche Adaptation of Plant Vascular Wilt Pathogens. PLoS Pathogens. 2011;7(7):1-19.

Lori G, Edel-Hermann V, Gautheron N, Alabouvette C. Genetic diversity of pathogenic and non-pathogenic populations of *Fusarium oxysporum* isolated from carnation fields in Argentina. Phythopatology. 2004;94:661-668.

Lionakis M, Kontoyiannis D. *Fusarium* infections in critically ill patients. Semin. Resp. Crit. Care Med. 2004;25:159-169.

Luo Y, Yoshizawa T, Katayama T. Comparative study on the natural occurrence of *Fusarium* mycotoxins (Trichothecenes and zearalenone) in corn and wheat from high- and low-risk areas for human esophageal cancer in China. J. Appl. Environ. Microbiol. 1990;56:3723-3726.

Ma L-J, van der Does HC, Borkovich KA, Coleman JJ, Daboussi M-J, *et al.* Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium.* Nature. 2010;464:367–373.

Manicom BQ, Bayen RP. Restriction fragment length polymorphims in *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* and other *fusaria* from *Dianthus* species. Plant pathol. 1993;42:851-857.

Martino P, Gastaldi R, Raccah R, Girmenia C. Clinical pattems of *Fusarium* infections in inmunocompromised patients. J. Infect. 1994;1:7-15.

Mayayo E, Pujol I, Guarro J. Experimental pathogenicity of four opportunist *Fusarium* species in a murine model. J. Med. Microbiol. 1999;48(4):363–366.

McGinnis MR, Sigler L, Rinaldi MG. Some medically important fungi and their common synonyms and names of uncertain application. Clin. Infect. Dis. 1999;29:728–730.

Meca G, Sospedra I, Soriano JM, Ritieni A, Valero MA, Mañes J. Isolation, purification and antibacterial effects of fusaproliferin produced by *Fusarium subglutinans* in submerged culture. Food Chem. Toxicol. 2009;47:2539–2543.

Mirocha CJ, Abbas HK, Kommedahl T, Jarvis BB. Mycotoxin Production by *Fusarium oxysporum* and *Fusarium sporotrichioides* Isolated from *Baccharis* spp. from Brazil. J. Appl. Environ. Microbiol. 1989;254-255.

Musa MO, Al Eisa A, Halim M, Sahovic E, Gyger M, *et al.* The spectrum of *Fusarium* infection in immunocompromised patients with hematological malignancies and in non-immunocompromised patients. A single institution experience over 10 years. Br. J. Hematol. 2000;108:544–548.

Navarro-Velasco GY, Prados-Rosales RC, Ortíz-Urquiza A, Quesada-Moraga E, Di Pietro A. *Galleria mellonella* as model host for the trans-kingdom pathogen *Fusarium oxysporum*, Fungal Genet. Biol. 2011;48:1124–1129.

Nel B, Steinberg C, Labuschangne N, Viljoen A. The potential of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* and other biological control organisms for suppressing *fusarium* wilt of banana. Plant Pathol. 2006;55:217-223.

Nelson PE, Dignani MC, Anaissie EJ. Taxonomy, Biology, and Clinical Aspects of Fusarium Speciest. Clin. Microbiol. Rev. 1994;7(4):479–504.

Nelson PE. History of *Fusarium* systematics. Phytopathology. 1991;81:1045–1048.

Nelson PE, Toussoun TA, Marasas WFO. *Fusarium* species: an illustrated manual for identification. Pennsylvania State University Press, University Park. 1983.

Nucci M, Anaissie E. Fusarium infections in immunocompromised patients. Clin. Microbiol. Rev. 2007;20(4):695–704.

Nucci M, Anaissie E. Cutaneous infection by Fusarium species in healthy and mmunocompromised hosts: implications for diagnosis and management. Clin. Infect. Dis. 2002;35: 909-920.

O'Donnell K, Sutton DA, Fothergill A, McCarthy D, Rinaldi MG, Brandt ME, *et al.* Molecular phylogenetic diversity, multilocus haplotype nomenclature, and in vitro antifungal resistance within the *Fusarium solani* species complex. J. Clin. Microbiol. 2008;46:2477-2490.

O'Donnell K, Sutton DA, Rinaldi MG, Magnon KC, Cox PA, *et al*. Genetic diversity of human pathogenic members of the *Fusarium oxysporum* complex inferred from multilocus DNA sequence data and amplified fragment length polymorphism analyses: evidence for the recent dispersion of a geographically widespread clonal lineage and nosocomial origin. J. Clin. Microbiol. 2004;42:5109–5120.

Olivares CR, Alfaro LJ, Díaz JMC, Thompson ML. Fusariosis diseminada por *Fusarium oxysporum* en un paciente adulto con leucemia mieloide aguda y neutropenia severa febril. Rev. Chil. Infect. 2005;22:356–360.

Ortoneda M, Guarro J, Madrid MP, Caracuel Z, Roncero MI, Mayayo E, *et al*. *Fusarium oxysporum* as a multihost model for the genetic dissection of fungal virulence in plants and mammals. Infect. Immun. 2004;72:1760–1766.

Pascoe IG. *Fusarium* morphology. I. Identification and characterization of a third conidial type, the mesoconidium. Mycotaxon. 1990;37:121-160.

Raad I, Tarrand J, Hanna H, Albitar M, Janssen E., *et al*. Epidemiology, molecular mycology, and environmental sources of *Fusarium* infection in patients with cancer. Infect. Control Hosp. Epidemiol. 2002;23:532–537.

Rabodonirina M, Piens MA, Monier M F, Guého E, Fiére D, Mojon M. *Fusarium* infections in immunocompromised patients: case reports and literature, Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1994;13:152-161.

Renwick J, Daly P, Reeves EP, Kavanagh K. Susceptibility of larvae of *Galleria mellonella* to infection by *Aspergillus fumigatus* is dependent upon stage of conidial germination. Mycopathologia. 2006;161:377–384.

Reuben A, Anaissie EJ, Nelson PE, Hashem R, Legrand C, Ho DH, *et al*. Antifungal susceptibility of 44 isolates of *Fusarium* species determined by using a broth microdilution method. Agents Chemother. 1989;33:1647-1649.

Sampathkumar P, Paya CV. *Fusarium* infection after solid organ transplantation. Clin. Infect. Dis. 2001;32:1237–1240.

Sánchez López-Berges M, Di Pietro A, Daboussi MA, Wahab HA, Vasnier E. Identification of virulence genes in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* by large-scale transposon tagging, Mol. Plant Pathol. 2009;10:95–107.

Smith G. Introducciónn a la microbiología industrial. Editorial Acribia, Zaragoza. 1963;132-316.

Snyder WC, Smith SN. Current status. En: Fungal wilt diseases of plants (Eds. M.E. Mace, A.A. Bell y C.H. Beckman), Academy Press, New York, reading, 1981;25-46.

Summerell BA, Salleh B, Leslie JF. A utilitarian approach to *Fusarium* identification. Plant Dis. 2003;87:117-128.

Téllez-Jurado A, Cruz Ramírez MG, Mercado Flores Y, Asaff Torres A, Arana-Cuenca A. Mecanismos de acción y respuesta en la relación de hongos entomopatógenos e insectos. Rev. Mex. Micol. 2009;30:73–80.

Tortorano AM, Prigitano A, Dho G, Esposto MC, Gianni C, Grancini A, *et al*. Species distribution and in vitro antifungal susceptibility patterns of 75 clinical isolates of *Fusarium* spp. from northern Italy, Antimicrob. Agents Chemother. 2008;52:2683-2685.

Valencia HA. Manual de prácticas de microbiología básica. Ed. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Depto. de Biología. Primera edición, Bogotá. 2004.

Van Burik J, Magee PT. Aspects of fungal pathogenesis in humans. Annu. Rev. Microbiol. 2001;55:743–772.

Walsh TJ, Groll A, Hiemenz J, Fleming R, Roilides E, Anaissie E. Infections due to emerging and uncommon medically important fungal pathogens. Clin. Microbiol. Infect. 2004;10(Suppl 1):48–66.

Zhang N, O'Donnell K, Sutton D, Nalim FA, Summerbell RC, Padhye A, *et al*. Members of the *Fusarium solani* species complex that cause infections in both humans and plants are common in the environment, J. Clin. Microbiol. 2006;44:2186–2190.

CONTENIDO

INTERACCIÓN HUÉSPED-PATÓGENO: *GALLERIA MELLONELLA-FUSARIUM OXYSPORUM*: SISTEMA MODELO DE PATOGENICIDAD PARA ESTUDIOS DE INMUNIDAD INNATA....83
RESUMEN....83
1. INTRODUCCIÓN....84
1.1 Defensa inmune del huésped y evasión de los patógenos 84
1.2 Rasgos de virulencia involucrados en la interacción de hongos con huéspedes non-mamíferos 84
1.3 Perspectivas de la investigación de los factores de virulencia fúngica y los mecanismos de defensa del huésped 85
1.4 Reacción inmunitaria de defensa a los hongos 85
1.5 Genes de inmunidad en huésped y patógeno 85
1.6 Necesidad de un organismo modelo invertebrado para estudios de patogenicidad de *Fusarium oxysporum* 86
1.7 Justificación del uso de insectos como modelos inmunológicos 86
1.8 Extrapolación del modelo invertebrado a vertebrados y humanos 87
2. MATERIALES Y MÉTODOS....87
2.1 Material Biológico 87
2.1.1 Insecto. 87
2.1.2 Cepas de hongos. 88
2.1.3 Cepas de bacteria patógenas. 88
2.1.4 Cepa de bacteria láctica. 88
2.2 Ensayos de supervivencia-letalidad 88
2.2.1 Obtención de las microconidias del hongo. 88
2.2.2 Selección de la concentración sub-letal de microconidias de *Fusarium oxysporum.* 88
2.2.2.1 Análisis estadístico. 89
2.2.3 Infección de larvas con concentraciones subletales de microconidias. 89
2.2.4 Recolección y preparación de la hemolinfa libre de hemocitos. 89
2.3 Ensayo de Inhibición del crecimiento radial de *F. oxysporum*. 89
2.3.1 Identificación de las muestras. 90
2.3.2 Determinación de la actividad anti-fúngica de la hemolinfa de larvas retadas. 90
2.3.3 Recuento de conidias. 90
2.3.4 Análisis estadístico. 91

2.4 Efecto de la inoculación de *L plantarum* en larvas de *G. mellonella* 91

2.4.1 Supervivencia de larvas inoculadas con *L. plantarum* y luego infectadas con *F. oxysporum.* 91

2.4.1.1 Análisis estadístico. 92

2.4.2 Ensayo de Inhibición del crecimiento radial de *F. oxysporum con hemolinfa* de larvas inoculadas con *L. plantarum* y luego retadas con *F. oxysporum.* 92

2.4.2.1 Análisis estadístico. 92

2.5 Ensayo biológico de difusión en agar 92

2.5.1 Obtención de los inóculos de microorganismos. 93

2.5.1.1 Inoculo de C. albicans. 93

2.5.1.2 Inoculo de F. oxysporum. 93

2.5.1.3 Inoculos de E. coli y de S. aureus. 93

2.5.2 Preparación de las placas. 93

2.5.2.1 Ensayo de difusión en agar por el método de pozos. 93

2.5.2.2 Ensayo de difusión en agar por el método de discos. 94

2.5.3 Lectura e interpretación de resultados. 94

3. RESULTADOS 94

3.1 Ensayos de supervivencia-letalidad y selección de las concentraciones sub-letales de microconidias de *F. oxysporum* 94

3.1.1 Análisis estadístico. 95

3.2 Ensayo de supervivencia con dosis sub-letales de microconidias 96

3.3 Ensayo de Inhibición del crecimiento radial de *F. oxysporum* 97

3.3.1 Actividad anti-fúngica de la hemolinfa de larvas retadas. 97

3.3.2 Recuento de conidias. 99

3.3.3 Análisis estadístico. 99

3.4 Efecto de la inoculación de *L plantarum* en larvas de *G. mellonella* 101

3.4.1 Supervivencia de larvas de *G. mellonella inoculadas* con *L. plantarum* y luego retadas con *F. oxysporum.* 101

3.4.1.1 Análisis Estadístico. 102

3.4.2 Ensayo de Inhibición del crecimiento radial de *F. oxysporum con hemolinfa* de larvas inoculadas con *L. plantarum* y luego retadas con *F. oxysporum.* 102

3.4.2.1 Actividad anti-fúngica de la hemolinfa de larvas inoculadas con L. plantarum y luego retadas con el hongo. 102

3.4.2.2 Análisis estadístico. 103

3.5 Determinación de la actividad antimicrobiana o inmunológica por ensayo de difusión en agar ____ 104
3.5.1 Actividad antibacteriana. ____ 104
3.5.2 Actividad anti-fúngica. ____ 105
3.5.3 Formación de halos de reacción. ____ 107
4.0 DISCUSIÓN. 108
5. CONCLUSIONES 113
6. BIBLIOGRAFÍA 114
ANEXO 1 117

INTERACCIÓN HOSPEDERO-PATÓGENO: *Galleria mellonella-Fusarium oxysporum*: SISTEMA MODELO DE PATOGENICIDAD PARA ESTUDIOS DE INMUNIDAD INNATA

RESUMEN

La respuesta inmune de los insectos es innata y se caracteriza por ser inducible, inespecífica y carecer de memoria. En ella participan barreras físicas como los epitelios y, además, tiene mecanismos efectores celulares y humorales. En la respuesta innata celular participan fagocitos, en tanto que en la humoral se producen sustancias antimicrobianas. La patogenicidad fúngica sigue desarrollándose en la naturaleza, y la constante aparición de nuevos patógenos fúngicos ecológicamente frecuentes, es un indicador de la necesidad de investigación continuada hacia la comprensión de la defensa del huésped y la virulencia patógena. Los hongos patógenos podrían haber evolucionado por el desarrollo de factores de virulencia en respuesta a los huéspedes que ellos encuentran; esto podría ayudar a explicar el modelo observado en el desarrollo de la virulencia fúngica en los huéspedes modelo mamíferos y non-mamíferos. La aclaración de la información de los múltiples sistemas de defensa del huésped, tarde o temprano conducirá a ampliar la perspectiva de la defensa del huésped y de la virulencia fúngica. En este capítulo investigamos la interacción huésped-patógeno, empleando dos organismos considerados hoy día como modelos, pues las larvas de *Galleria mellonella* son cada vez más empleadas para estudios de respuesta inmune innata frente al reto de microorganismos patógenos, y *Fusarium oxysporum* es un patógeno muy versátil capaz de infectar plantas, animales y humanos, siendo su estudio cada vez más necesario. Las larvas de *G. mellonella* son capaces de ensamblar una respuesta de defensa a patógenos fúngicos, aunque las células fúngicas objetivo no permanecen estáticas dentro de las larvas; en el presente capítulo se evalua la respuesta del huésped invertebrado frente al ataque del hongo, mediante técnicas clásicas de microbiología, lográndose además establecer y estandarizar, las dosis sub-letales de microconidias del hongo, evaluando siempre la capacidad de las larvas de sobrevivir al ataque fúngico y de producir inhibición del crecimiento del patógeno fúngico y de patógenos bacterianos. Los resultados mostraron que la hemolinfa de larvas retadas que habían sido mantenidas a 37°C presentaron siempre mayor porcentaje de supervivencia y causaron la mayor inhibición del crecimiento radial del hongo, especialmente las hemolinfas que provenían de larvas retadas con la dosis más altas de microconidias (10^6 microconidias/mL).

Palabras claves: Inmunidad innata, hemolinfa, supervivencia, patogenicidad fúngica

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Defensa inmune del huésped y evasión de los patógenos

La respuesta inmune de los insectos es innata y se caracteriza por ser inducible, inespecífica y carecer de memoria. En ella participan barreras físicas como los epitelios y, además, tiene mecanismos efectores celulares y humorales. En la respuesta innata celular participan fagocitos, en tanto que para la humoral se producen sustancias antimicrobianas. En la hemolinfa de los insectos están presentes células llamadas hemocitos, las cuales cumplen varias funciones, que incluyen reconocer y adherir a su superficie bacterias y parásitos invasores, así como recubrirlos de melanina para posteriormente eliminarlos mediante fagocitosis (Nappi *et al*., 1992). En todos los insectos, un resultado inmediato de la lesión séptica es la inducción de dos cascadas proteolíticas que conducen a la coagulación y melanización, se cree que estas reacciones juegan un papel importante en la defensa. Además, las proteínas situadas arriba de estas cascadas se pueden unir a determinantes microbianos y así servir como moléculas de reconocimiento. Por su parte, la melanización es el sistema más importante de la respuesta humoral (Hoffmann, 1995).

1.2 Rasgos de virulencia involucrados en la interacción de los hongos con huéspedes no-mamíferos

Se han encontrado ciertos rasgos en hongos que son necesarios para que exista virulencia. Un ejemplo importante de un rasgo de virulencia que supera los sistemas del huésped, es la cápsula cryptococcal. Cuando los mutantes acapsulares de *Cryptococcus* son expuestos a amebas, ellos son fagocitados con mayor frecuencia, indicando que la cápsula protege al hongo durante la fagocitosis de este huésped heterólogo. La cápsula es también un factor de virulencia contra *Caenorhabditis elegans*, determinado por una tasa lenta de muerte de *C. elegans* y la inhabilidad de las cepas acapsulares, para sobrevivir a la ingestión por parte del nematodo. Además, la cápsula cryptococcal actúa como un factor de virulencia en *G. mellonella* y *D. discoideum*, como se ha visto con la atenuación de virulencia en mutantes acapsulares cap59 y cap67 respectivamente, mientras que el mutante cap59 permaneció virulento en *Drosophila*. De modo interesante, el paso por un huésped no-mamífero, puede realzar la virulencia como se ha visto, en el paso de *C. neoformans* por *D. discoideum*. Así mismo, una cepa no patógena de *Histoplasma capsulatum* se convierte en virulenta en ratones, después de pasar por ameba. Los factores de virulencia que afectan a huéspedes heterólogos incluyen una adenilil ciclasa (CDC35), un p21 que activa la kinasa homologa (CLA4) y aspartil proteasas (SAP4-6) de *Candida albicans*. Los factores de virulencia que afectan huéspedes heterólogos de *C. neoformans*, incluyen fosfolipasa (PLB), la subunidad dependiente de cAMP de la proteína kinasa (PKA1), y la subunidad alfa de una proteína-G (GPA1). El papel de estos rasgos de virulencia en sistemas mamíferos ha sido estudiado detalladamente. Nuevos factores de virulencia también han sido identificados a través de *C. elegans*, por un método de selección. Abreviando, el método descrito antes, usa cepas de *C. neoformans* mutagenizadas como fuente de alimento para determinar los genes que son necesarios para la virulencia de *C. neoformans* en *C. elegans*. La ingestión de *C. neoformans* por *C. elegans* reduce la supervivencia del nematodo y su producción de progenie (Fuchs & Mylonakis, 2006).

El efecto de la interacción genotipo-genotipo está bien documentado. Sin embargo, esta descripción es una aproximación a la más profunda, que subyace en los mecanismos que permiten a un patógeno infectar y causar daño, o a un huésped ser resistente a una infección parasitaria. Estos mecanismos resultan ser muy interesantes y relevantes para una renovada discusión de estos temas importantes. Dado que los patógenos interactúan de cerca con el sistema inmune huésped, es decir, a nivel de moléculas implicadas en la defensa, debemos esperar que los patógenos hayan desarrollado formas de interactuar con la maquinaria del huésped en este mismo nivel. De hecho, los patógenos han contrarrestado esas estrategias evolutivamente, por ejemplo, adaptando sus vías de transmisión para aumentar las posibilidades de un encuentro con el siguiente huésped. Pero una de las ideas más interesantes de los últimos años es la reunión de pruebas de la generalidad y la multitud de mecanismos por los cuales los parásitos evaden la respuesta inmune del huésped, entran a los tejidos o por qué manipulan la red de señalización del sistema inmune. En efecto, los mecanismos de evasión de la inmunidad son sutiles y diversos, y se han descrito para todos los grupos de parásitos importantes, como los virus (Tortorella *et al* 2000), bacterias (Pieters 2001), protozoos (Sacks & Sher 2002) o diferentes helmintos (Schmid-Hempel, 2009).

1.3 Perspectivas de la investigación de los factores de virulencia fúngica y los mecanismos de defensa del huésped

La patogenicidad fúngica sigue desarrollándose en la naturaleza, y la constante aparición de nuevos patógenos fúngicos ecológicamente frecuentes, es un indicador de la necesidad de la investigación continuada hacia la comprensión de la defensa del huésped y la virulencia patógena. Los hongos patógenos podrían haber evolucionado por el desarrollo de factores de virulencia en respuesta a los huéspedes que ellos encuentran; esto podría ayudar a explicar el modelo observado en el desarrollo de la virulencia fúngica en los huéspedes modelo mamíferos y non-mamíferos. La aclaración de la información de los múltiples sistemas de defensa del huésped, tarde o temprano conducirá a ampliar la perspectiva de la defensa del huésped y de la virulencia fúngica (Fuchs & Mylonakis, 2006).

1.4 Reacción inmunitaria de defensa a los hongos

Las larvas de *G. mellonella* son capaces de ensamblar una respuesta de defensa a patógenos fúngicos, las células fúngicas objetivo no permanecen estáticas dentro de las larvas, ellas también pueden reaccionar a las condiciones circundantes hostiles del huésped. Una respuesta inmune de insectos para el patógeno invasor es la fagocitosis de células foráneas. Sin embargo, algunas células fúngicas son más fácilmente fagocitadas que otras y más adelante algunas células fúngicas cuentan con mecanismos de escape a los hemocitos tal como pasa con *C. albicans*, la cual forman filamentos que pueden utilizar para evadir la fagocitosis o para perforar la célula fagocítica (Fuch *et al*., 2010)

1.5 Genes de inmunidad en huésped y patógeno

Está bien establecido que los genes en los sistemas inmunes de vertebrados y de insectos como *Drosophila*, muestran significativamente, tasas elevadas de aminoácidos relativos a la evolución de genes no relacionados con la inmunidad, indicativo de adaptación molecular. No todos los genes de respuesta inmune evolucionan de forma equivalente, sin embargo,

podemos hacer inferencias con respecto a la naturaleza de la interacción del patógeno con diferentes componentes del sistema inmune del huésped, a través de las distintas historias y trayectorias evolutivas de los diversos genes de la inmunidad (Lazzaro, 2008).

Vogel, *et al.* (2011) empleando hemolinfa de larvas de *G. mellonella* desafiadas con LPS bacteriano, identificaron un gran número de genes que codifican proteínas con funciones establecidas en inmunidad, relacionadas con detección de marcas microbianas y señalización, así como moléculas efectoras tales como péptidos antimicrobianos e inhibidores de proteinasas microbianas. Adicionalmente, encontraron genes conocidos como mediadores de la melanización o genes que contribuyen a la respuesta al estrés (Seitz *et al*., 2003).

En lo que respecta a patógenos fúngicos complejos como *F. oxysporum*, que presenta diferentes razas que solo pueden distinguirse por infección en los cultivares apropiados, no hay herramientas moleculares disponibles que pueden discriminar entre las razas, y las bases moleculares de la compatibilidad y la progresión de la enfermedad son poco conocidas. Sestili *et al.* (2011) lograron identificar los genes del huésped, potencialmente relacionados con la resistencia y susceptibilidad, así como los genes de hongos asociados con el proceso de infección.

1.6 Necesidad de un organismo modelo invertebrado para estudios de patogenicidad de *Fusarium oxysporum*

Una limitación en el estudio de la patogénesis de *Fusarium* spp. es la disponibilidad de hospederos apropiados para estudiar la virulencia de hongos. Dos modelos de ratón han sido desarrollados para *Fusarium* spp. (Mayayo *et al*., 1999) sin embargo, las cuestiones éticas y los gastos asociados a utilizar estos modelos, puede impedir su uso en el laboratorio. Para evitar estos problemas, las larvas de *G. mellonella*, se han desarrollado como un modelo hospedero para investigar la virulencia de *Fusarium* spp. Este organismo ha servido como huésped modelo para varios otros hongos patógenos de importancia clínica (Cotter *et al*. 2000; Mylonakis *et al*. 2005), incluyendo *Aspergillus* (St. Leger *et al*., 2000; Kavanagh & Reeves *et al*. 2004). Es importante destacar que muchos de los factores de virulencia de estos hongos médicamente importantes que se requieren para infectar mamíferos, también son necesarios para la infección de *G. mellonella* (Brennan *et al* 2002; Mylonakis *et al* 2005). Mediante el uso de este pato-sistema insecto-hongo, se ha descubierto que los aislados de *Fusarium* spp. son más virulentos a temperaturas más bajas a partir de muestras clínicas de *Fusarium* y que aislamientos identificados como patógenos de plantas, son capaces de matar a *G. mellonella* (Coleman *et al*., 2011).

1.7 Justificación del uso de insectos como modelos inmunológicos

Desde del primer empleo acertado de penicilina hacia 1942, los patógenos microbianos siguen planteando un riesgo significativo para la salud humana. El aumento global de la resistencia a antibióticos, combinada con una población envejecida más susceptible a la infección (consecuencia de procedimientos quirúrgicos, quimioterapia, SIDA y dispositivos médicos), hace necesario una mayor comprensión de los procesos infecciosos, lograda por modelización *in vivo*. El empleo del modelo mamífero tradicional tiene varias desventajas.

Aparte del debate ético, son costosos y requieren una inversión significativa de tiempo tanto en la obtención de los permisos sanitarios y éticos, así como el mantenimiento y aseguramiento de las normas y estándares de bienestar de animal. Aunque los insectos no sean modelos aplicables para el estudio de todos los patógenos humanos, pueden ser utilizados de manera apropiada, dado que ellos proporcionan una gama de ventajas al investigador. Por ejemplo, ellos no están sujetos al riguroso control regulador y al debate ético. Además existen varios insectos modelos bien definidos y genéticamente manejables; que están al alcance y pueden ser fácilmente propagados y conducen a resultados rápidos (Kemp & Massey, 2007).

El estudio de la respuesta de insectos a la infección fue promovido por Pasteur en el siglo diecinueve, quien usó insectos para demostrar el origen microbiano de enfermedad en polillas de seda. Más recientemente, la respuesta de insectos a nemátodos entomopatogénicos y sus bacterias endosimbióticas, ha sido estudiada en un esfuerzo por optimizar el empleo de nemátodos para el control de insectos plaga en campo. Las larvas de *G. mellonella* también han sido usadas para evaluar la patogenicidad de *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli* y de *Bacillus cereus. D. melanogaster* y *Spodoptera littoralis* han sido usados para determinar la toxicidad de metabolitos secundarios de especies de *Penicillium* (Kavanagh & Reeves, 2004).

1.8 Extrapolación del modelo invertebrado a vertebrados y humanos

El sistema inmune innato caracterizado en *D. melanogaster* comprende barreras físicas y una respuesta inmune celular/humoral a la infección. Varios de estos componentes del sistema (barreras físicas, producción de AMPs específicos, fagocitosis, generación de radical superóxido) exhiben similitudes estructurales y semejanzas funcionales a los componentes de la inmunidad de mamíferos. Varios estudios han mostrado que infectando insectos con los microorganismos patógenos, se obtienen datos que presentan fuerte correlación con los obtenidos de modelos de murinos. Estas conclusiones indican que los datos obtenidos de modelos de insecto pueden trasladarse a humanos así como los obtenidos cuando se usan murinos y otros modelos de pequeños mamíferos. (Kemp & Massey, 2007).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material Biológico

2.1.1 Insecto.

Se emplearon larvas de *G. mellonella* en el último estadío del desarrollo larval con peso corporal entre 230-330 mg. Las larvas fueron criadas en nuestro laboratorio y alimentas con dieta artificial, como se describe en el capítulo 1, numeral 2.4. Se seleccionaron las larvas que presentaban la mejor calidad, tanto en color como en tamaño y vigor (color amarillo crema homogéneo sin rastros de melanización).

2.1.2 Cepas de hongos.
Se utilizó una cepa de *C. albicans* (*wild type*), incubada a 37°C durante 24 horas. También se empleó una cepa de *F. oxysporum* (*Foxy*-GIEM) la cual fue aislada en campo y se mantuvo a 25°C durante 14 días a intervalos de luz y oscuridad (16 h de luz/8 h oscuridad). Ambas cepas fueron cultivadas en PDA (Oxoid, Ltd., Basingstoke, Inglaterra (Brown *et al*, 2008; Wojda & Jakubowicz, 2007).

2.1.3 Cepas de bacteria patógenas.
Se emplearon las bacterias *E. coli* (ATCC® 25922™) *y Staphylocccus aureus* (ATCC® 25923™), crecidas en agar nutritivo (Oxoid, Ltd., Basingstoke, Inglaterra), incubadas a 37°C, de 12 a 24 horas, (Brown *et al*, 2008; Wojda & Jakubowicz, 2007).

2.1.4 Cepa de bacteria láctica.
Se empleó la cepa de *Lactobacillus plantarum* (ATCC® 8014™), repicada en agar nutritivo (Oxoid, Ltd., Basingstoke, Inglaterra), incubada a 37ºC durante 12 horas en medio LB (bactotriptona 1%, NaCl 1%, extracto de levadura 0.5%) (Bergin *et al*, 2006).

2.2 Ensayos de supervivencia-letalidad

2.2.1 Obtención de las microconidias del hongo.
A la cepa de *F. oxysporum* crecida en PDA (extracto de papa 2%, Detrosa 0.4%) a 25ºC de 7-14 días, se le añadió una solución de tensioactivo Tween-80 (0,1%) para separar las microconidias del micelio, utilizando una espátula Drigalski para raspar. La suspensión resultante se filtró a través de gasa estéril y se recogió en un tubo estéril con tapa rosca. El volumen se llevó a 10 ml con Tween-80 (0,1%). La suspensión de microconidias se agitó en vórtex tres veces durante 20 segundos cada vez. La concentración de la suspensión se determinó con la cámara de recuento Neubauer-Improved (Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Alemania) y se ajustó entre $1x10^4$-$1x10^8$ conidias /mL (Renwick *et al*, 2006).

2.2.2 Selección de la concentración sub-letal de microconidias de *Fusarium oxysporum*.
Se eligieron al azar grupos de diez larvas de *G. mellonella* en la etapa final de desarrollo larval, con peso corporal entre 230-330 mg en todos los ensayos, las larvas fueron inyectadas con suspensiones de microconidias/mL ($1x10^4$ - $1x10^5$ - $1x10^6$) mediante la inyección de 20 µL de la suspensión de microconidias en el hemocele a través del último *proleg* izquierdo (Renwick *et al*, 2006; Cytryska *et al*, 2007). Se utilizó una jeringa desechable de 1 mL con aguja 31G x 8,0 mm (BD Ultra-Fine™, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.). Todos los experimentos incluyeron dos grupos de larvas de control, el primer grupo se usó como control de inocuidad del proceso de trauma físico, mediante la inyección de larvas con 20 µL de Tween-80 (0.1% v/v) a través del último *proleg* izquierdo, un segundo grupo de control no recibió ninguna inyección. Antes de la inyección, se desinfectó la zona abdominal con un hisopo esterilizado embebido en alcohol (70%). Tras la inyección, las larvas se mantuvieron en la oscuridad y se incubaron en placas de Petri, un grupo a 25 y otro a 37°C. Pasadas 48 horas, se anotó la supervivencia, donde las larvas se consideraron muertas por la ausencia de movimiento en respuesta al tacto, los

experimentos que tenía más de dos larvas muertas, incluidos los grupos de control, fueron descartados y se repitió el ensayo. Todos experimentos se llevaron a cabo por triplicado. En cada experimento se clasificó como concentración sub-letal de microconidias, cuando más del 80% de las larvas sobrevivieron (Fuchs *et al*., 2010; Coleman *et al*., 2011).

2.2.2.1 Análisis estadístico.

Se llevó a cabo un análisis de regresión univariado para estimar la relación entre la concentración inoculada de microconidias del hongo y la temperatura de incubación de las larvas post-infección, sobre la supervivencia de las larvas. Se evaluaron tres concentraciones, 1×10^4, 1×10^5 y 1×10^6 microconidias/mL, a 25 y 37°C. Se empleó el software Statgraphics Centurion XVI versión 16.2.04.

2.2.3 Infección de larvas con concentraciones subletales de microconidias.

Larvas de *G. mellonella*, seleccionadas al azar en grupos de 10, fueron inoculadas en el hemocele a través del último *proleg* izquierdo mediante la inyección de 20 µl de las suspensiones de concentraciones sub-letales de microconidias/mL seleccionadas, $1x10^4$ y $1x10^6$ (Renwick *et al*, 2006). Dos grupos de 10 larvas por triplicado, fueron dispuestos en como control del proceso; un grupo se incubó a 25°C, y el otro se incubó a 37°C en placas de Petri, en la oscuridad durante 48 horas, sin inyección, para asegurarse que las larvas no murieron por la incubación a 37°C (Fuchs *et al*., 2010). La tasa de mortalidad se registró 2 días después de la inyección. La mortalidad se evaluó sobre la base de la coloración marrón de la cutícula (melanization) y la ausencia de movimiento en respuesta a la estimulación (Cytryska *et al*, 2007). Se realizó el mismo análisis estadístico para saber si hubo una significación estadística. Se utilizó la misma hipótesis para probar la diferencia en las medias de supervivencia cuando la temperatura cambió para cada concentración de las microconidias (1×10^4 y 1×10^6 microconidias/mL y las medias de supervivencia a 25 y 37°C). Los valores de p se calcularon usando el software R ($\alpha \leq 0,5$).

2.2.4 Recolección y preparación de la hemolinfa libre de hemocitos.

Después de pasadas 48 horas y previo a la recolección de la hemolinfa, las larvas fueron anestesiadas por enfriamiento a 4ºC por 15 min, luego se desinfectó la superficie del abdomen con etanol al 70% (v/v). Las muestras de hemolinfa fueron obtenidas mediante perforación del abdomen larval con una aguja estéril. La hemolinfa que fluyó fuera, fue transferida inmediatamente dentro de un tubo Eppendorf previamente enfriado y que contenía Feniltiourea (0.150mM) (Cytryska *et al*, 2007), para prevenir melanización. La hemolinfa libre de hemocitos se obtuvo por centrifugación a 13.000 r.p.m. durante 15 minutos para separar el pellet de hemocitos y posteriormente se centrifugó el sobrenadante por 15 minutos a 4°C para sedimentar restos celulares. Los sobrenadantes de hemolinfa libre de hemocitos combinados, se utilizaron inmediatamente para otros ensayos o fueron almacenados a -20°C para uso posterior (Wojda & Jakubowicz, 2007; Andrejko *et al*., 2009).

2.3 Ensayo de Inhibición del crecimiento radial de *F. oxysporum*.

2.3.1 Identificación de las muestras.

Las muestras de hemolinfa retada y los controles se denominaron tratamientos y se identificaron como aparece en la tabla 1.

Tabla 1. Identificación de muestras de hemolinfas con reto fúngico e incubadas a 37°C.

Identificación	Descripción
Control	Control positivo de crecimiento (*F. oxysporum* en PDA)
Fluc	Fluconazol 100 µg/mL (Control positivo de inhibición)
$HF10^4$	Hemolinfa retada con $1x10^4$ microcon/mL del hongo
$HF10^6$	Hemolinfa retada con $1x10^6$ conidias/mL del hongo
$HBF10^6$	Hemolinfa inoculada con *L. plantarum* ($6x10^5$ ufc/mL) con posterior reto fúngico de $1x10^6$ microcon/mL

2.3.2 Determinación de la actividad anti-fúngica de la hemolinfa de larvas retadas.

Se incorporaron 100 µL de cada una de las muestras de hemolinfa inmune de larvas de *G. mellonella* en tubos que contenían 20 mL de PDA mantenido a 45°C, para evitar su solidificación. Cada tubo se homogeneizó por agitación manual y se vertió su contenido en cajas de Petri esterilizadas. Se cortaron discos de micelio de 6 mm de diámetro de un cultivo joven del hongo y se colocaron sobre las cajas de forma invertida para que el micelio tuviera contacto directo con el agar. Las cajas se incubaron a 25°C en la oscuridad. Pasados siete días se midieron los diámetros de la zona de crecimiento. Se utilizó un control positivo del crecimiento del hongo en PDA (Control) y un control de inhibición del crecimiento con fluconazol 100 µg/mL (Fluc). Se determinó el efecto anti-fúngico de las muestras de hemolinfa sobre *F. oxysporum*, mediante la medición de la tasa de inhibición del crecimiento usando la fórmula de la ecuación [1] (Bougandoura & Bendimerad, 2012).

$$T = \frac{Dk - D0}{Dk} \times 100 \quad [1]$$

Dk: Diámetro de la colonia de hongo del Control (mm)
D0: Diámetro de la colonia de hongo en presencia de la hemolinfa o de Fluc (mm)
T: tasa de inhibición del porcentaje de crecimiento del micelio

2.3.3 Recuento de conidias.

Se tomó un área de 5 mm de diámetro de la zona de micelio uniforme de cada uno de los cultivos al décimo día de crecimiento, y se colocó en un tubo esterilizado con 1 mL de agua peptonada, más una gota de Tween-20 y se sonicó durante 30 minutos para asegurar la liberación de microconidias. Luego se tomaron 10 µL de cada tubo y se realizó el recuento de microconidias con cámara de conteo Neubauer Improved (Murillo-Arango *et al*., 2011).

2.3.4 Análisis estadístico.

Se elaboró un diseño experimental de un sólo factor con efectos fijos, completamente aleatorizado. Se realizó un análisis de varianza de una vía, con su respectiva tabla y se probó la significancia de los efectos de los tratamientos (muestras). Se trabajó con $\alpha = 0.05$. La validación del modelo se llevó a cabo mediante la verificación de los supuestos del modelo y se realizó por tres partes: la normalidad, la independencia y la homogeneidad de la varianza. Una vez verificados los supuestos, se planteó la prueba F para las medias del crecimiento de las muestras. Finalmente se realizó la prueba de comparaciones múltiples, con la prueba de Dunnett. Para todo el análisis del modelo se utilizó el paquete estadístico R versión 3.1. 0. (R Development Core Team, 2008).

2.4 Efecto de la inoculación de *L plantarum* en larvas de *G. mellonella*

2.4.1 Supervivencia de larvas inoculadas con *L. plantarum* y luego infectadas con *F. oxysporum.*

Para el estimulo con *L. plantarum*, se emplearon grupos de 10 larvas, por triplicado, por inyección de $6x10^5$ bacterias/mL. Las larvas fueron mantenidas a 20-25°C. Después de pasadas 24 horas, se procedió a infectar las mismas larvas sobrevivientes con microconidias de *F. oxysporum*, tal como se describe en el numeral 2.2.3 y se recolectaron las hemolinfas tal como se describe en 2.2.4. Las muestras se identificaron como aparece en la tabla 2 (Cytryska *et al*, 2007; Wojda & Jakubowicz, 2007).

Tabla 2. Identificación de muestras de hemolinfa inoculada con *L. plantarum* y con *F. oxysporum*.

Identificación	Descripción
Hem	Hemolinfa de larvas sin ningù reto
HB-25	Hemolinfa de larvas inoculadas con *L. plantarum* ($6x10^5$ ufc/mL a 25°C/24 horas)
HB-37	Hemolinfa de larvas inoculadas con L. plantarum ($6x10^5$ ufc/mL a 37°C/24 horas)
HF10^4-25	Hemolinfa de larvas retadas con *F. oxyporum* (10^4 microconidias/mL a 25°C/48 horas)
HF10^4-37	Hemolinfa de larvas retadas con *F. oxyporum* (10^4 microconidias/mL a 37°C/48 horas)
HF 10^6-25	Hemolinfa de larvas retadas con *F. oxyporum* (10^6 microconidias/mL a 25°C/48 horas)
HF 10^6-37	Hemolinfa de larvas retadas con *F. oxyporum* (10^6 microconidias/mL a 37°C/48 horas)
HBF-10^4-25	Hemolinfa de larvas inoculadas con *L. plantarum* ($6x10^5$ ufc/mL a 37°C/24 horas) con posterior reto con *F. oxyporum* (10^4 microconidias/mL a 25°C/48 h)
HBF-10^4-37	Hemolinfa de larvas inoculadas con *L. plantarum* ($6x10^5$ ufc/mL a 37°C/24 horas) con posterior reto con *F. oxyporum* (10^4 microconidias/mL a 37°C/48 h)
HBF-10^6-25	Hemolinfa de larvas inoculadas con *L. plantarum* ($6x10^5$ ufc/mL a 37°C/24 horas) con posterior reto con *F. oxyporum* (10^6 microconidias/mL a 25°C/48 h)
HBF-10^6-37	Hemolinfa de larvas inoculadas con *L. plantarum* ($6x10^5$ ufc/mL a 37°C/24 horas) con posterior reto con *F. oxyporum* (10^6 microconidias/mL a 37°C/48 h)

2.4.1.1 Análisis estadístico.

Se comprobó el cumplimiento de los supuestos acerca de la diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos con *L. plantarum* y la temperatura, se estableció la hipótesis para probar la diferencia de proporciones y la hipótesis para probar una diferencia entre las medias de supervivencia cuando la temperatura cambió, y cuando se realizó doble reto inmunológico en las larvas. Los valores de p se calcularon usando el software Statgraphics Centurion XVI versión 16.2.04.

2.4.2 Ensayo de Inhibición del crecimiento radial de *F. oxysporum con hemolinfa* de larvas inoculadas con *L. plantarum* y luego retadas con *F. oxysporum*.

Para el estimulo de larvas de *G. mellonella* con *L. plantarum*, se emplearon grupos de 10 larvas, por triplicado, inyectadas con $6x10^5$ ufc/mL. Las larvas fueron mantenidas a 20-25°C. Pasadas 24 horas, se procedió a infectar las larvas sobrevivientes con conidias de *F. oxysporum*, tal como se describe en el numeral 2.2.3. Se determinó el efecto anti-fúngico de las muestras de hemolinfa sobre *F. oxysporum*, mediante la medición de la tasa de inhibición del crecimiento usando la fórmula de la ecuación [1] descrita en 2.2.3 (Cytryska *et al*, 2007; Wojda & Jakubowicz, 2007). En la tabla 3 se presentan la identificación de las muestras para el ensayo.

Tabla 3. Muestras para el ensayo de inhibición del crecimiento radial fúngico. Muestras de hemolinfa inoculada con *L. plantarum* con posterior infección con microconidias de *F. oxysporum.*

Identificación	Descripción
Control	Control positivo de crecimiento (*F. oxysporum* en medio PDA)
Fluc	Fluconazol, 100ug /mL (Control positivo de inibición)
Hem	Hemolinfa de larvas sin ningún reto inmunológico (sin inyección)
HB-25	Hemolinfa de larvas inoculadas con $6x10^5$ ufc/mL *L. plantarum* (25°C/24 horas)
HB-37	Hemolinfa de larvas inoculadas con L. plantarum (37°C/24 horas)
HBF-10^6	Hemolinfa de larvas inoculadas con *L. plantarum* (37°C/24 horas) con posterior reto con *F. oxyporum* (10^6 microconidias/mL a 25°C/48 h)

2.4.2.1 Análisis estadístico.

Se elaboró un diseño experimental de un sólo factor con efectos fijos, completamente aleatorizado. Se realizó un análisis de varianza de una vía y se probó la significancia de los efectos de los tratamientos. Se trabajó con $\alpha = 0.05$. La validación del modelo se llevó a cabo mediante la verificación de los supuestos del modelo y se realizó por tres partes: la normalidad, la independencia y la homogeneidad de la varianza. Se utilizó el software Statgraphics Centurion XVI versión 16.2.04.

2.5 Ensayo biológico de difusión en agar

Para este ensayo se emplearon las muestras de hemolinfa sin hemocitos, procedente de larvas de *G. mellonella* sometidas a los diferentes retos inmunológicos con conidias de *Fusarium oxysporum* y los correspondientes controles de hemolinfa sin reto (numeral 2.2.3 y tabla 1). También se emplearon larvas enteras de *G. mellonella* que se habían congelado a

-20ºC, provenientes de los tratamientos descritos en 2.2.3, que fueron maceradas con varillas estériles con PBS (1X), los extractos se recogieron en frío en tubos estériles con 200 uL/mL de Feniltiourea (0.150 mM).

2.5.1 Obtención de los inóculos de microorganismos.

2.5.1.1 Inóculo de *C. albicans.*

A partir de un cultivo de *C. albicans* en PDA, incubado a 30-35°C durante 24 horas, se tomaron con una asa, cinco colonias y se suspendieron en 5 mL de agua destilada estéril y con ayuda de un espectrofotómetro (530 nm), se ajustó a una turbidez igual al tubo 3 de la escala de McFarland, aproximadamente $9x10^8$ células/mL (Cuenca-Estrella, 2003; Thomson, 2011).

2.5.1.2 Inóculo de *F. oxysporum.*

Se recogieron con solución salina, las microconidias procedentes de un cultivo de 7 días de crecimiento y se completó a 5 mL con agua destilada estéril hasta obtener un conteó equivalente a $1x10^6$ microconidias/mL, realizado con cámara de recuento Newbauer-Improved. Se prepararon cajas de Petri con PDA y se sembraron 100uL de microconidias y se incubaron a 28-30°C y fueron examinadas diariamente hasta observar evidencia de crecimiento (Cuenca-Estrella, 2003; Thomson, 2011).

2.5.1.3 Inóculos de *E. coli* y de *S. aureus.*

A partir de cultivos en Agar nutritivo recién crecidos de *E. coli* y *S. aureus*, se seleccionaron colonias con ayuda de un asa estéril, y se transfirieron a tubos con 5 mL de Caldo Nutritivo, los tubos se incubaron a 37°C de 2 a 4 horas, hasta que se alcanzó una densidad óptica (D.O.625nm) de 0.08-0.1, equivalente a 0.5 del estándar de McFarland (Valencia, 2004).

2.5.2 Preparación de las placas.

2.5.2.1 Ensayo de difusión en agar por el método de pozos.

Para la preparación de las cajas de Petri se utilizó PDA para los hongos y Agar Nutritivo para las bacterias, previamente reconstituído, esterilizado, enfriádo y mantenido a 45°C, posteriormente se le agregó 1 mL de suspensión del inoculo de cada microorganismos por cada 100 mL de medio de cultivo, mezclados asépticamente, se agitó suavemente (mediante movimientos en forma de ocho) y se repartió en cajas de Petri a razón de 20 mL por caja, se dejó solidificar y se rotuló adecuadamente. Luego se realizaron pozos con ayuda de un sacabocados de acero de 10 mm de diámetro en seis puntos de cada caja, con una aguja flameada se retiró el centro del agar y se descartó en un frasco con hipoclorito (Valencia, 2004).

Se procedió a colocar entre 3-4 uL de cada extracto de las diferentes muestras en estudio, diluídas en agua calidad USP (United States Pharmacopeia), en los respectivos pozos realizados previamente (tabla 2). Para lograr una mayor difusión de las muestras se dejaron reposar las cajas durante 1 hora a temperatura ambiente y luego se incubaron por 24 horas a

37°C para las bacterias, y a 30°C para *C. albicans*. Las cajas con *F. oxysporum* se incubaron a 30°C por 48 horas. Se empleó como control positivo para hongos, Fluconazol lote No. 3094611(0.2 mg/ml en Dimetilsulfóxido). Para las bacterias se empleo como control positivo Gentamicina lote 3084432 (0.10 mg/ml). Las pruebas se realizaron por triplicado (Valencia, 2004; Altincicek *et al.,* 2007; Mak *et al.,* 2010).

2.5.2.2 Ensayo de difusión en agar por el método de discos.
Se preparó un segundo grupo de cajas de Petri con PDA para los hongos y Agar Nutritivo para las bacterias, una vez solidificado el medio, se procedió a realizar la siembra masiva de microorganismos, empleando hisopos esterilizados, sumergidos en las suspensiones de bacterias y hongos previamente obtenidas. Luego se colocaron discos de 10 mm de diámetro de papel de filtro esterilizados e impregnados con los extractos de hemolinfa descritos en la tabla 1. Todos los ensayos se realizaron por triplicado (Valencia, 2004).

2.5.3 Lectura e interpretación de resultados.
Luego de transcurrido el tiempo de incubación se procedió a realizar la lectura correspondiente a la observación de las zonas claras de inhibición de crecimiento, mediantes el registro de los diámetros en milímetros de estas zonas (Valencia, 2004).

3. RESULTADOS

3.1 Ensayos de supervivencia-letalidad y selección de las concentraciones sub-letales de microconidias de *F. oxysporum*

En la figura 1 se presentan los resultados de los ensayos de supervivencia-mortalidad de larvas tratadas con las diferentes concentraciones de microconidias y evaluadas a 25 y 37°C. La mayor supervivencia de larvas de todo el estudio (99%) se observó con la concentración de $1x10^4$ microconidias/mL a 37°C; las larvas infectadas con $1x10^5$ microconidias/mL, sobrevivieron en mayor proporción a 37°C que a 25°C, lo mismo se observó con la concentración $1x10^6$ microconidias/ml, donde la mortalidad a 25°C fue muy elevada en comparación a la mortalidad a 37°C Cuando se emplearon concentraciones superiores a $1x10^7$-$1x10^8$ microconidias/mL, todas las larvas murieron.

Para caracterizar la interacción entre *G. mellonella* y *F. oxysporum*, primero se reprodujo el modelo de infección para investigar los procesos biológicos, tales como el transporte de proteínas, la defensa y la nodulación, condensación de proteínas y lípidos y por último, la respuesta inmune durante la infección de insectos causada por hongos. Para este propósito, se inocularon larvas con diferentes dosis de microconidias a dos temperaturas diferentes. Hemos tomado nota de que sobrevivieron más del 80% de las larvas tratadas con 10^4, 10^5, 10^6 microconidias/mL a 37°C, mientras que la mortalidad aumentó a 25°C, cuando la concentración de microconidias fue mayor (figura 1). La diferencia en la prueba de medias obtuvo un valor de $p < 0,01$ para todos los tratamientos (tres concentraciones de microconidias/mL), lo que indica que la media de supervivencia de cada tratamiento difiere con la temperatura. En otras palabras, la mortalidad y la supervivencia se correlacionan y la misma correlación se obtendría al trabajar con tasa de mortalidad.

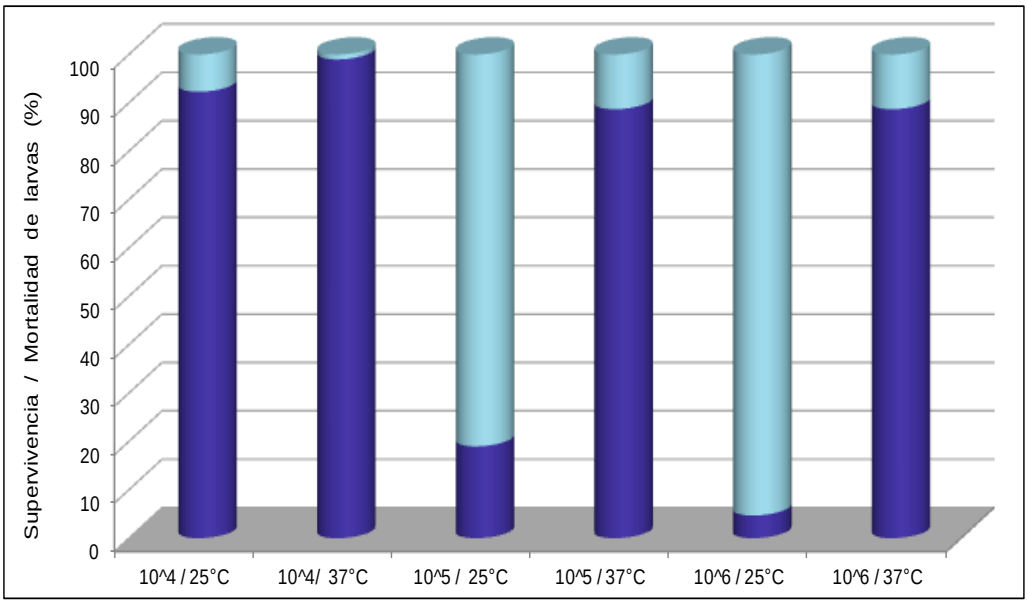


Figura 1. Supervivencia de larvas evaluada con tres concentraciones de microconidias a 25 y 37°C. Las barras repesentan la hemolinfa de larvas de *G. mellonella* después de la infección con 1×10^4, 1×10^5 y 1×10^6 microconidias/mL de *F. oxysporum* a 25 o 37°C. El porcentaje de larvas supervivientes aparecen en azul oscuro y el de larvas muertas en azul claro.

3.1.1 Análisis estadístico.

Se obtuvo un valor de $p < 0,05$ para todos los tratamientos (concentraciones de 10^4, 10^5 y 10^6 microconidias/mL, evaluadas a 25 y 37°C. El análisis de regresión (figura 2), muestra que los resultados se ajustan un modelo de reciprocidad-X para describir la relación entre supervivencia de las larvas a 25°C y concentración de microconidias/mL (figura 1). La ecuación del modelo ajustado es:

$$Supervivencia\ a\ 25°C\ =\ 6{,}9\ +\ 8{,}5E5\ /\ microconidias \qquad [2]$$

Para 37°C, los resultados se ajustan a un modelo de reciprocidad-X al cuadrado-Y para describir la relación entre supervivencia a 37°C y concentración de microconidias/mL. La ecuación del modelo ajustado es:

$$Supervivencia\ a\ 37°C\ =\ \ sqrt(7894.01\ +\ 1.91664E7/microconidias) \qquad [3]$$

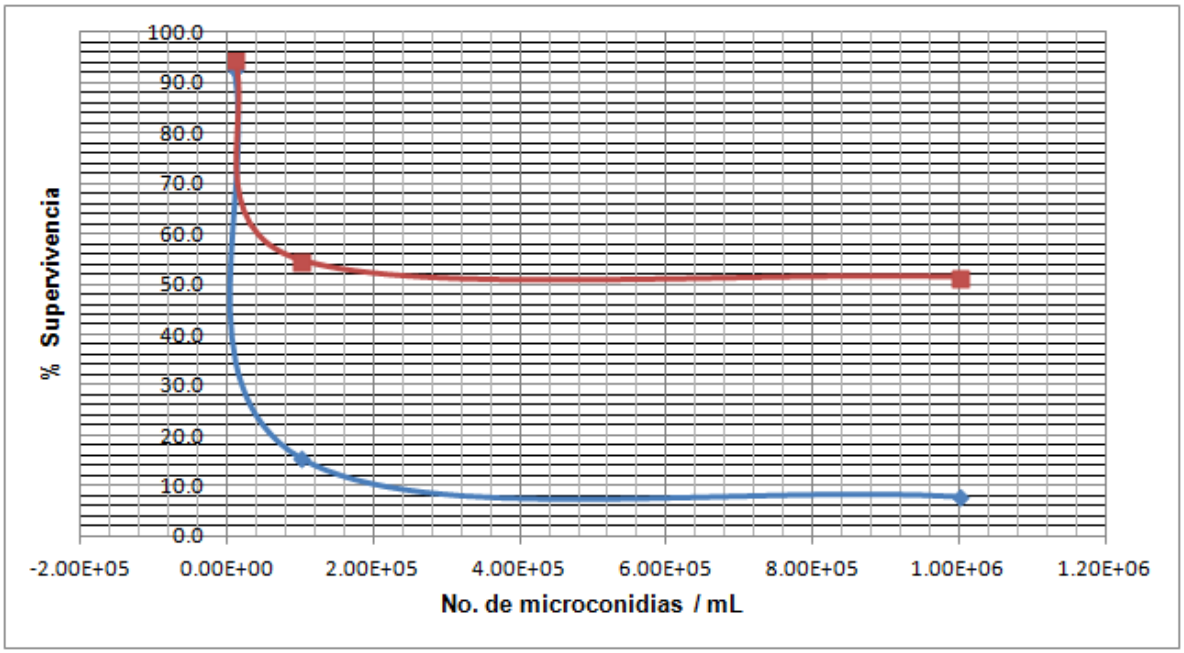
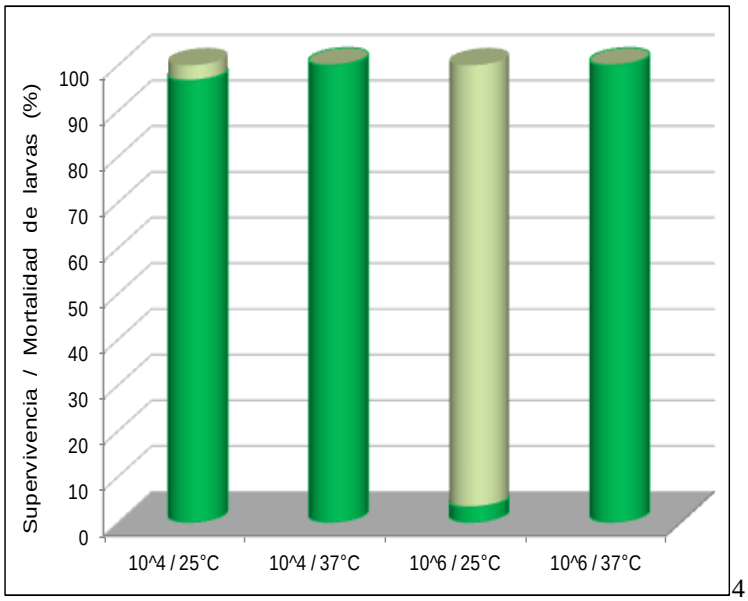


Figura 2. Modelo de calibración para supervivencia versus microconidias. La línea roja corresponde a la supervivencia de las larvas inoculadas con $1x10^4$ - $1x10^5$ -$1x10^6$ microconidias/mL e incubadas a 37°C. La línea azul corresponde a la supervivencia de las larvas inoculadas con $1x10^4$ - $1x10^5$ -$1x10^6$ microconidias/mL e incubadas a 25°C.

3.2 Ensayo de supervivencia con dosis sub-letales de microconidias

El experimento se repitió como se describe en el numeral 3.1, pero únicamente con las concentraciones 10^4 y 10^6 microconidias/mL (figura 3), en las cuales se presentó la mayor supervivencia de larvas, usando el mismo tratamiento estadístico. Una vez más, se obtuvieron resultados similares (ver anexo 1). Es decir, a una concentración fija, el promedio de larvas supervivientes a 25°C es diferente de la supervivencia media de larvas a 37°C.



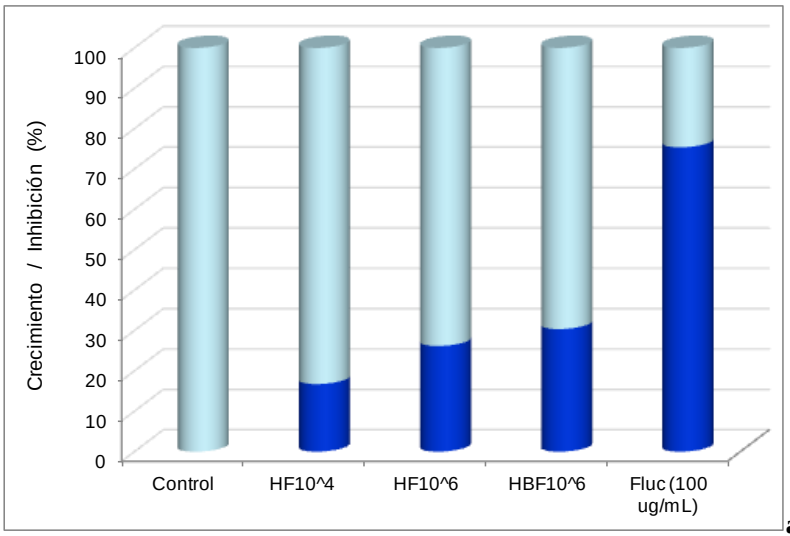
4

Figura 3. Supervivencia de larvas retadas con dosis sub-letales de microconidias a 25 y 37°C. Las barras muestran la hemolinfa de larvas de *G. mellonella* después de haber sido infectadas con 1×10^4 y 1×10^6 microconidias/mL de *F. oxysporum* a 25 o 37°C. El porcentaje de larvas sobrervivientes aparece en verde oscuro y el de larvas muertas en verde claro.

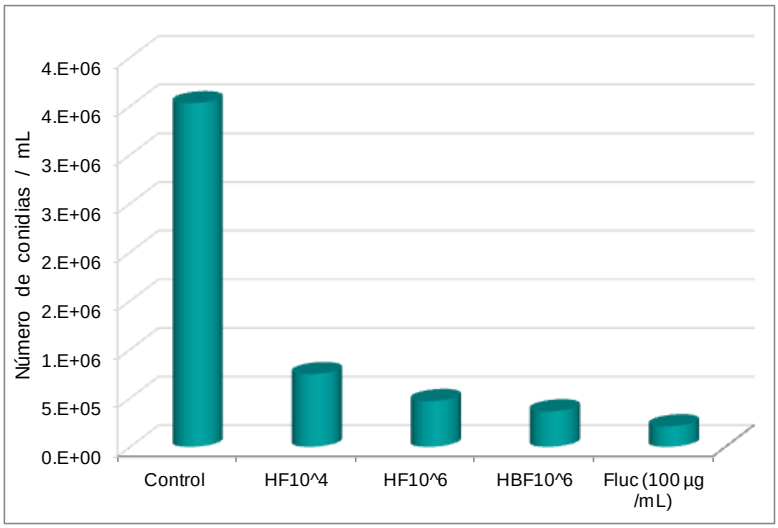
3.3 Ensayo de Inhibición del crecimiento radial de *F. oxysporum*

3.3.1 Actividad anti-fúngica de la hemolinfa de larvas retadas.

Se determinó cuantitativamente la actividad anti-fúngica de las muestras de hemolinfa y de los controles, mediante la evaluación de la tasa de inhibición, como se observa en la figura 4a. El azul claro, representa el porcentaje de crecimiento del hongo y el azul oscuro, indica la inhibición que produjeron las muestras de hemolinfa y el fluconazol sobre el crecimiento de *F. oxysporum*.



a)



b)

Figura. 4. **Actividad anti-fúngica de la hemolinfa de larvas retadas. (a)** Efecto de las muestras de hemolinfa de larvas de *G. mellonella* retadas con microconidias del hongo, sobre el crecimiento de *F. oxysporum* en PDA, en azul claro se muestra el crecimiento y en azul oscuro la inhibición. **(b)** Recuento de conidias/mL.

La muestra de hemolinfa $HBF10^6$ presentó mayor inhibición del crecimiento del hongo, seguida de $HF10^6$; en tanto que la muestra $HF10^4$ presentó la menor inhibición de las tres muestras de hemolinfa retadas. En la figura 5 se aprecia la diferencia en el crecimiento radial del hongo con las diferentes muestras de hemolinfa retada.

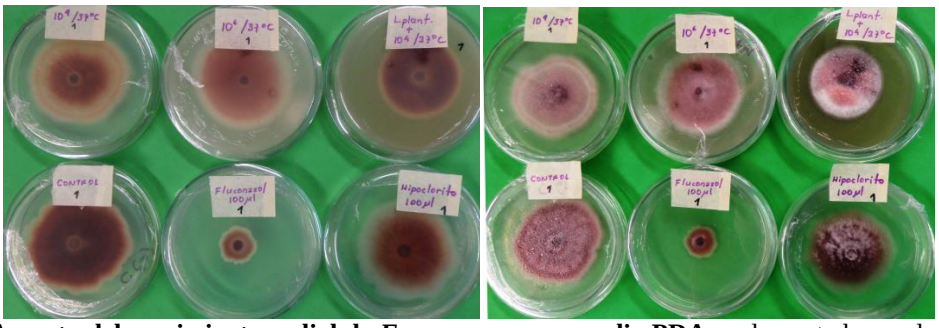


Figura 5. Aspecto del crecimiento radial de *F. oxysporum* en medio PDA suplementado con las diferentes hemolinfas retadas, en el séptimo día de desarrollo. Arriba de izquierda a derecha: hemolinfa retada con 10^4 microconidias/mL a 37°C; hemolinfa retada con 10^6 microconidias/mL a 37°C; hemolinfa retada con *L. plantarum* + 10^4 microconidias/mL a 25°C; abajo: control de crecimiento del hongo; Fluconazol.

3.3.2 Recuento de conidias.

El recuento de conidias pasados diez días de desarrollo de *F. oxysporum* en PDA, con las diferentes muestras de hemolinfa y los controles se muestra en la figura 4b, donde se observa descenso de la concentración de microconidias de izquierda a derecha, es decir, se observa que el número de microconidias es menor a medida que disminuye la concentración de microconidias.

3.3.3 Análisis estadístico.

El análisis de varianza mostró que las muestras de hemolinfa presentan distribuciones cuya mediana es diferente de la mediana del control negativo y del control positivo Fluc (fluconazol). Se verificó que se cumplían los supuestos del modelo, con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$ (figura 6), el test de Shapiro-Wilk con un valor-p = 0.2541 < 0.05 indicó normalidad. Con el test de Durbin-Watson, se obtuvo un valor-p = 0.1329 > 0.05 que indicó que los datos eran independientes. El supuesto de homocedasticidad se presenta en la gráfica de Residuales vs Ajustados (figura 6d), donde se aprecia variabilidad en los residuales de $HF10^4$; se observa menor dispersión en $HBF10^6$, mientras que en $HF10^6$ no se presenta dispersión. También se verificó la hemocedasticiad con dos pruebas adicionales, para las cuales se obtuvieron valores-p menores que 0.05, Levene (valor-p = 0.5271) y Fligner-Killeen (valor-p = 0.4933) Los valores-p indicaron homogeneidad de varianza en los errores.

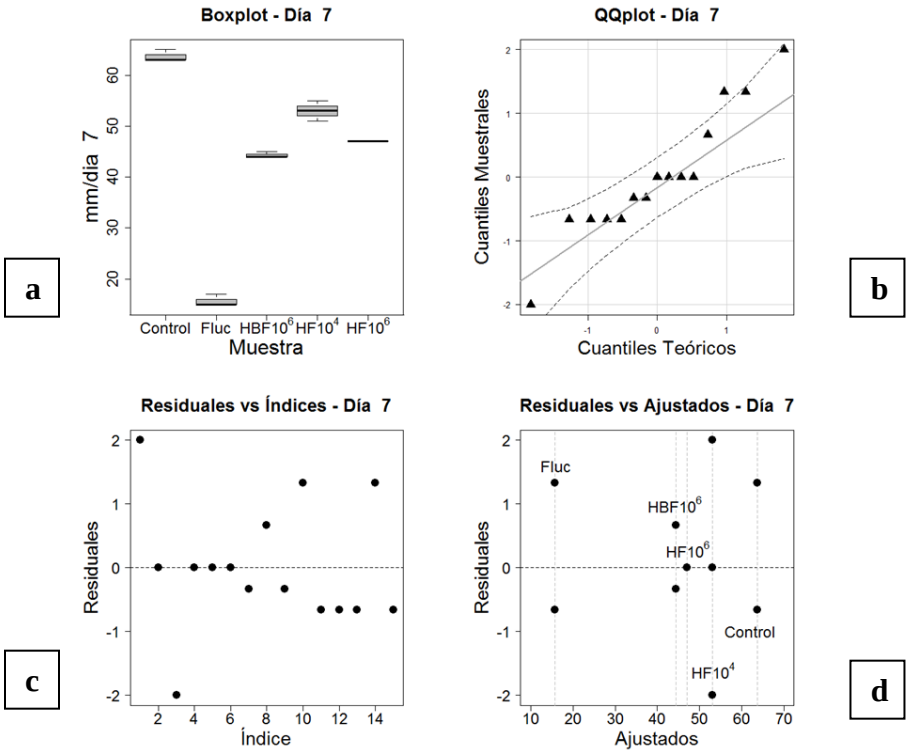


Figura 6. Análisis de varianza y verificación de supuestos. (a) Diagrama de análisis de varianza que muestra la variabilidad de los diámetros. **(b)** La normalidad se observa mediante el gráfico Cuartil-Cuartil (QQ-plot) con intervalo de confianza de 95%. **(c)** La independencia de los datos se determinó con la gráfica de Residuales vs Índices. (d)**.** La homogeneidad de varianza se observa en la gráfica de Residuales vs Ajustados.

En el ANOVA, la prueba F para las medias del crecimiento de los tratamientos, indicó que todas las medias fueron diferentes y por lo tanto los efectos de los tratamientos fueron significativos, con un nivel de significancia de $\mu = 0.05$, obteniéndose un valor-p < 0.01, que confirmó que los efectos de los tratamientos no fueron nulos. Con la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett, se comparó la media de crecimiento de cada tratamiento frente a la media de crecimiento del Control positivo. Se concluye que todas las diferencias de medias son estadísticamente significativas a un nivel de significancia de $\mu = 0.05$.

El IC95% para cada una de las diferencias de medias respecto al control positivo (figura 7), muestra que el cero no está en ningún IC95%, lo que confirma que la media de crecimiento de cada tratamiento es diferente a la media de crecimiento del control positivo.

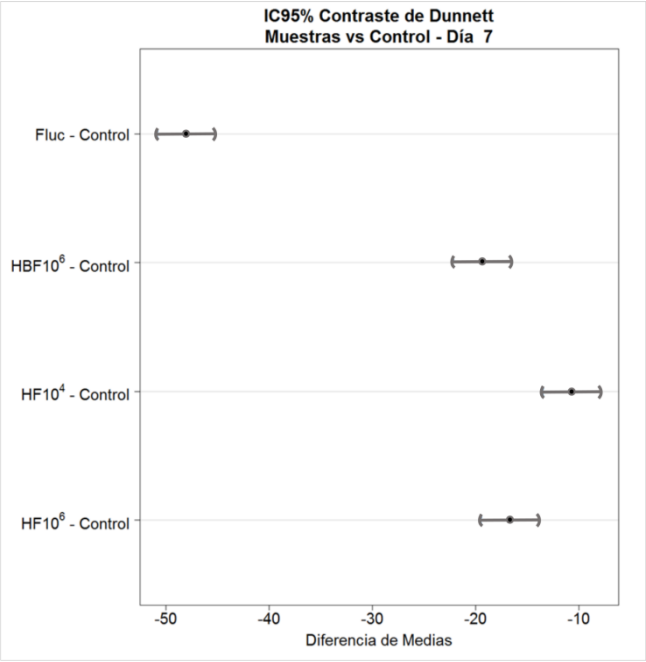


Figura 7. Prueba de diferencia de medias. La grafica se obtiene con el test de Dunnett, corrido y graficado en R.

3.4 Efecto de la inoculación de *L plantarum* en larvas de *G. mellonella*

3.4.1 Supervivencia de larvas de *G. mellonella inoculadas* con *L. plantarum* y luego retadas con *F. oxysporum.*

Con las dos concentraciones de microconidias evaluadas, se encontró que las larvas previamente inoculadas con la bacteria láctica *L. plantarum* con posterior reto con el patógeno fúngico, y que fueron incubadas a 37°C, por 48 horas, sobrevivieron en mayor proporción, que las larvas incubadas durante 48 horas a 25°C (figura 8).

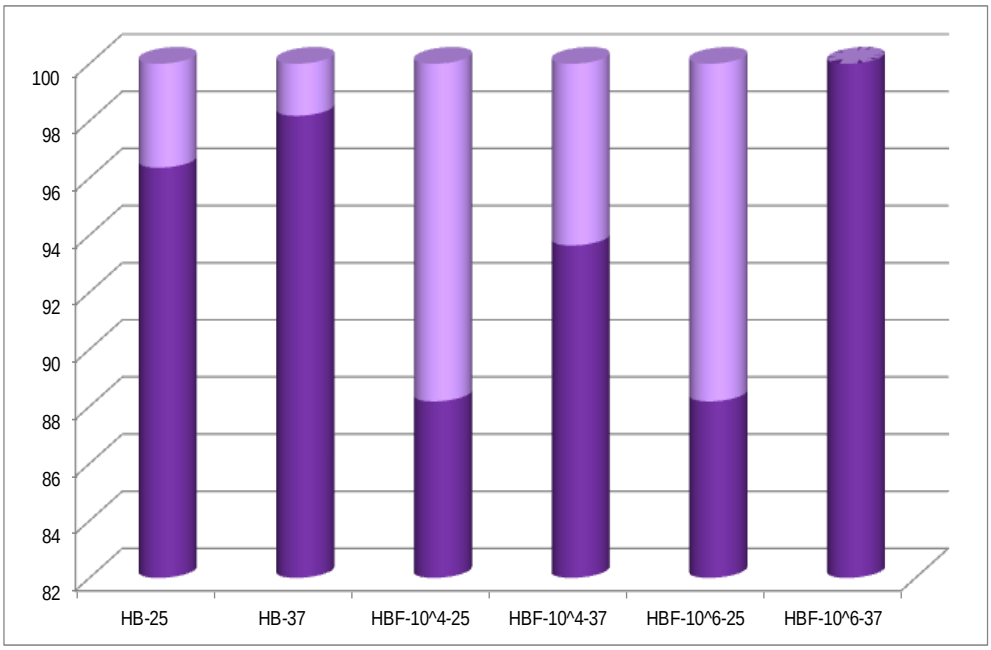


Figura 8. Supervivencia de larvas de *G. mellonella inoculadas* con *L. plantarum* y luego retadas con *F. oxysporum.* Las barras en violeta oscuro muestran el porcentaje de larvas de *G. mellonella* sobrevivientes después del inóculo de *L. plantarum* y posteriormente retadas con las concentraciones subletales de microconidias 1×10^4 y 1×10^6 (microconidias/mL) de *F. oxysporum* a 25 y 37°C. El porcentaje de larvas muertas aparece en violeta claro.

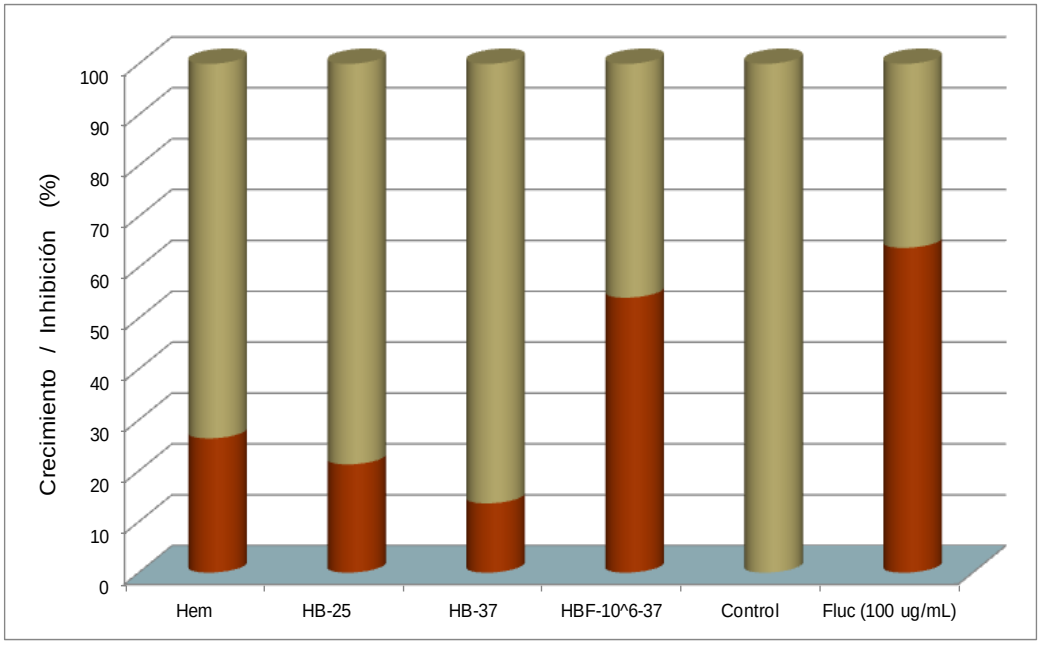
3.4.1.1 Análisis Estadístico.

La diferencia en la prueba de medias obtuvo un valor de p <0,05 para todos los tratamientos, lo que indica que la media de supervivencia de cada tratamiento difiere con la temperatura. En este ensayo también se encontró que la mortalidad y la supervivencia de las larvas se relacionan inversamente con la temperatura y la misma relación se obtendría al trabajar con tasa de mortalidad. El experimento mostró que a una concentración fija, el promedio de larvas supervivientes a 25°C es diferente de la supervivencia media de larvas a 37°C, siendo esta última más alta para ambas concentraciones de microconidias del hongo y para los tratamientos que sólo incluían *L. plantarum*.

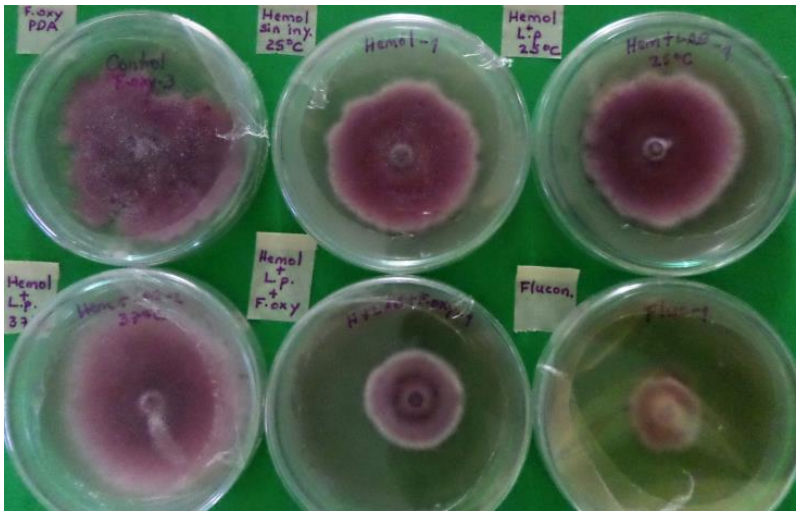
3.4.2 Ensayo de Inhibición del crecimiento radial de *F. oxysporum con hemolinfa* de larvas inoculadas con *L. plantarum* y luego retadas con *F. oxysporum.*

3.4.2.1 Actividad anti-fúngica de la hemolinfa de larvas inoculadas con *L. plantarum* y luego retadas con el hongo.

Se determinó cuantitativamente la actividad anti-fúngica de las muestras de hemolinfa y de los controles, mediante la evaluación de la tasa de inhibición, como se observa en la figura 9a. El color beige, representa el porcentaje de crecimiento del hongo y el color café, indica la inhibición que produjeron las muestras de hemolinfa y el fluconazol sobre el crecimiento de *F. oxysporum*. En la figura 9b se aprecia la diferencia en el crecimiento radial del hongo con las diferentes muestras de hemolinfa con y sin reto fúngico.



a)



b)

Figura 9. (a) Efecto de las muestras de hemolinfa de larvas de *G. mellonella* inoculadas con *L. plantarum* y luego retadas con microconidias del hongo, sobre el crecimiento de *F. oxysporum* en PDA, en café se muestra la inhibición y en color beige se representa el porcentaje de crecimiento; (b) aspecto de los cultivos después de 7 días de desarrollo del hongo, se aprecia la diferencia en el crecimiento radial del hongo con las diferentes muestras de hemolinfa retada. Arriba de izquierda a derecha: Control de crecimiento del hongo; hemolinfa sin reto; hemolinfa retada con *L, plantarum* e incubada a 25°C. Abajo de izquierda a derecha: hemolinfa retada con *L. plantarum* e incubada a 37°C; hemolinfa retada con *L, plantarum* e incubada a 25°C + *F. oxysporum*; Fluconazol.

3.4.2.2 Análisis estadístico.

En el ANOVA se halló un valor-p de la prueba-F menor que 0.05, indicando que existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de crecimiento radial de *F. oxysporum* para el séptimo día, entre un nivel de tratamiento y otro, con un nivel del 95.0%

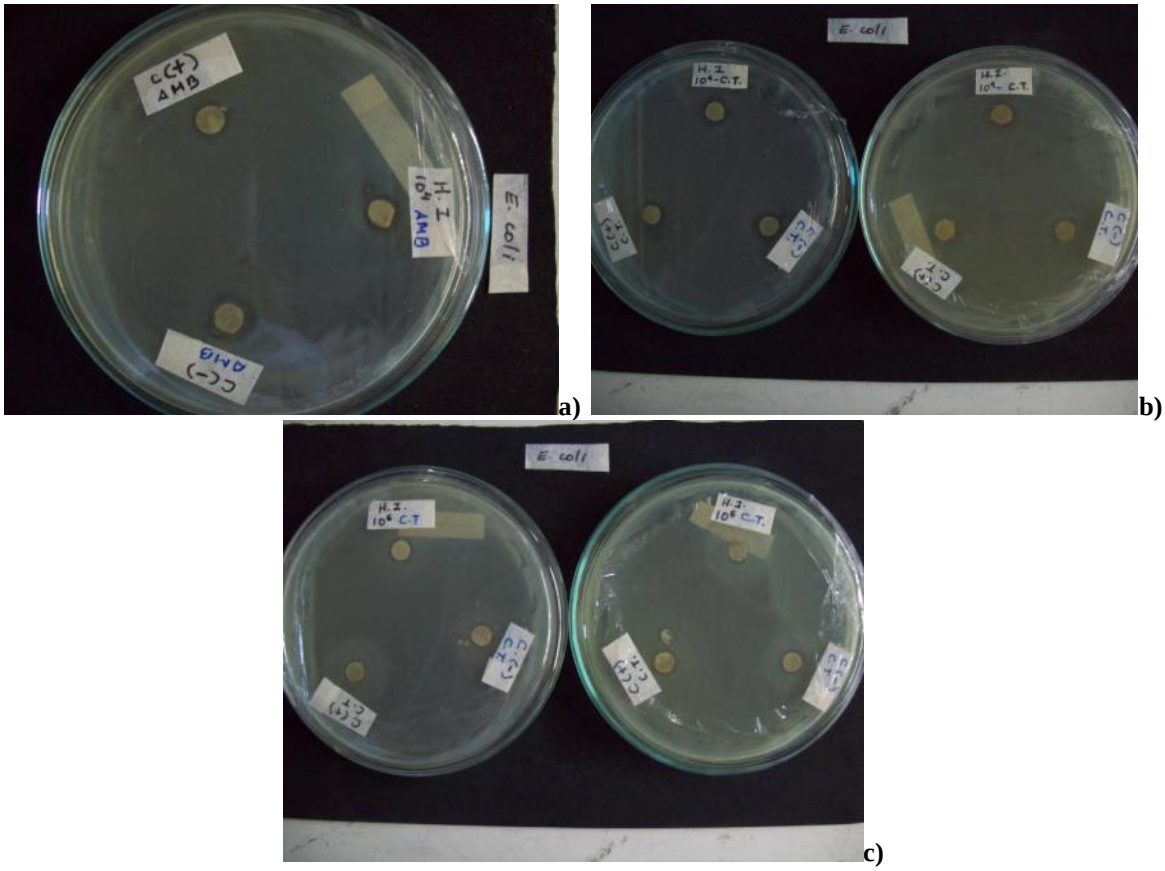
de confianza. Se examinó la dispersión de los datos con respecto a la media y se comprobó el supuesto de homocedasticidad, con el test de Levene cuyo valor-p es mayor o igual que 0.05, entonces no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar, con un nivel del 95.0% de confianza. También se comprobó el supuesto de normalidad con el gráfico de normalidad de residuos los cuales se encontraban dentro de los límites de confianza del 95%. El supuesto de independencia de los datos se comprobó con el gráfico de residuos frente al número de orden, el cual no presentó tendencias ni patrones el cual mostró una adecuada aleatorización del proceso experimental. Mediante la prueba de rangos múltiples se determinó cuáles medias fueron significativamente diferentes de otras, encontrándose que existen diferencias estadísticamente significativas entre la media del control positivo de crecimiento del hongo y los cinco tratamientos y entre los cinco tratamiento, con un nivel del 95.0% de confianza.

3.5 Determinación de la actividad antimicrobiana o inmunológica por ensayo de difusión en agar

Se evaluaron extractos de hemolinfa retada con las diferentes concentraciones y temperaturas definidas anteriormente, tanto por el método de pozos con siembra de los microorganismos en profundidad, como por el método de discos con siembra en superficie.

3.5.1 Actividad antibacteriana.

Para *E. coli*, por el método de discos, se obtuvieron halos de inhibición de 2 mm aproximadamente, con los extractos de hemolinfa retada con 10^4 microconidias/mL, e incubada a 25°C. Con la hemolinfa retada con 10^4 microconidias/mL e incubada a 37°C (figura 10a y 10b) y con la hemolinfa retada con 10^6 microconidias/mL e incubada a 37°C, también se obtuvieron halos de inhibición (figura 9c). En el caso de *S. aureus*, no se observaron halos de inhibición con ninguna de las muestras, por ninguno de los métodos de difusión en agar.



a) **b)** **c)**

Figura 10. Ensayo de difusión por siembra en superficie (discos) para *E. coli* y *S. aureus* a) Hemolinfa retada con 10^4 microcrocon/mL a 25°C (H.I.10^4-25°C); b) Hemolinfa retada con 10^4 microcon/mL a 37°C (H.I.10^4-37°C); c) Hemolinfa retada con 10^6 con/ml a 37°C. (H.I.10^6-37°C). Control positivo (C+) Gentamicina; Control negativo (C-).

3.5.2 Actividad anti-fúngica.

Se observó halo de inhibición por el método de pozos con siembra en profundidad, únicamente en el pozo No. 2, que contenía hemolinfa retada con 1x10^6 microconidias/mL, incubada a 37°C (figura 11a) y en el pozo 4 que contenía extracto de larva entera con 10^6 microconidias/mL también incubado a 37°C (figura 11b). A pesar de que el halo no se formó en forma radial, se observó clara inhibición del cultivo de *F. oxysporum* especialmente en el pozo 2.

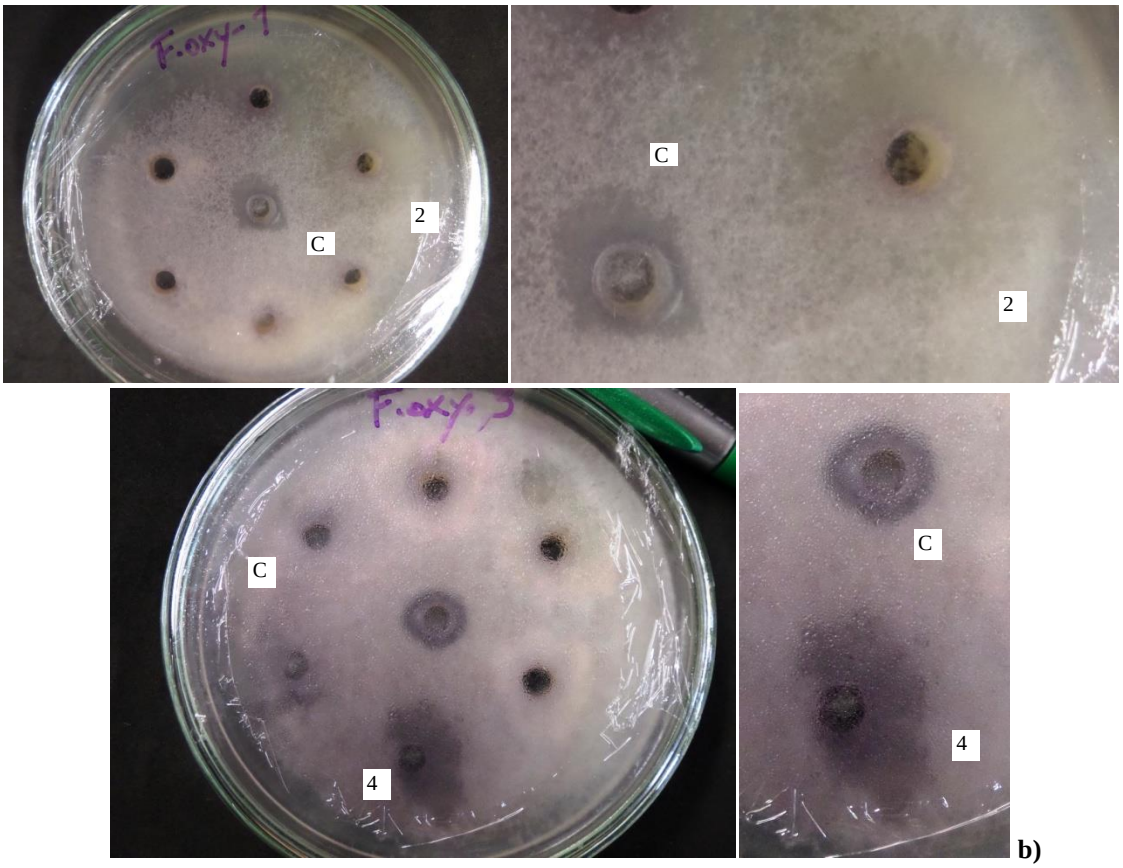
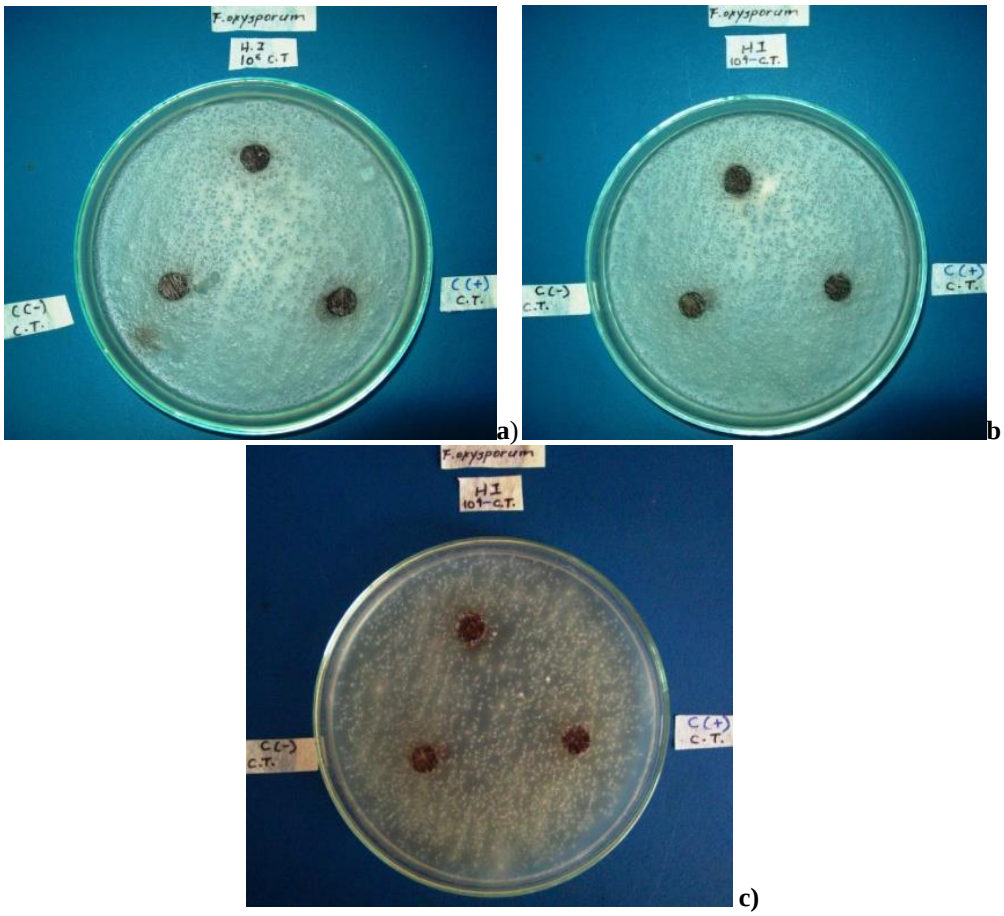


Figura 11. **Halo de inhibición de *F. oxysporum* por siembra en profundidad** (a) pozo 2: hemolinfa retada con 10^6 microconias/mL del hongo e incubada a 37°C; (b) pozo 4: extracto de larva entera infectada con 10^6 microconidias/mL del hongo incubado a 37°C. Pozo central **C**: control (Fluconazol 0.2mg/ml)

En el caso del ensayo de difusión con discos, con siembra en superficie del hongo (figura 12), no se observaron halos de inhibición, pero se observó fuerte melanización en los discos, con las muestras de hemolinfa retada con $1x10^6$ microconidias/mL, e incubada a 37°C y con la hemolinfa retada con 10^4 microconidias/mL del hongo e incubada a 37°C. La melanización de los discos persistió después de una semana de realizada la siembra del hongo y aunque se desarrollo micelio, no logró crecer sobre los discos melanizados aún después de 14 días.



a) **b** **c)**

Figura 12. Ensayo de difusión con discos para *F. oxysporum* (a) Hemolinfa retada con 10^6 microconidias/mL, incubada a 37°C: (b y c) Hemolinfa retada con 10^4 microconidias/mL del hongo e incubada a 37°C.

3.5.3 Formación de halos de reacción.

Durante los ensayos de difusión en agar se observó en algunos casos la aparición de halos de reacción. Se evaluaron los halos de reacción-melanización que se observaron en los pozos que contenían las diferentes hemolinfas retadas y extractos de larvas enteras, en el cultivo del hongo. En la figura 13 se observan los halos de reacción del extracto de larvas enteras que fueron retadas con 10^4 microconidias del hongo y que habían sido incubadas a 37°C durante 48 horas (pozo 5); En el pozo 6 se aprecian los halos producidos por el extracto de larvas enteras inoculada previamente con L. plantarum y que habían sido posteriormente retadas con 10^4 microcon/mL de *F. oxysporum*

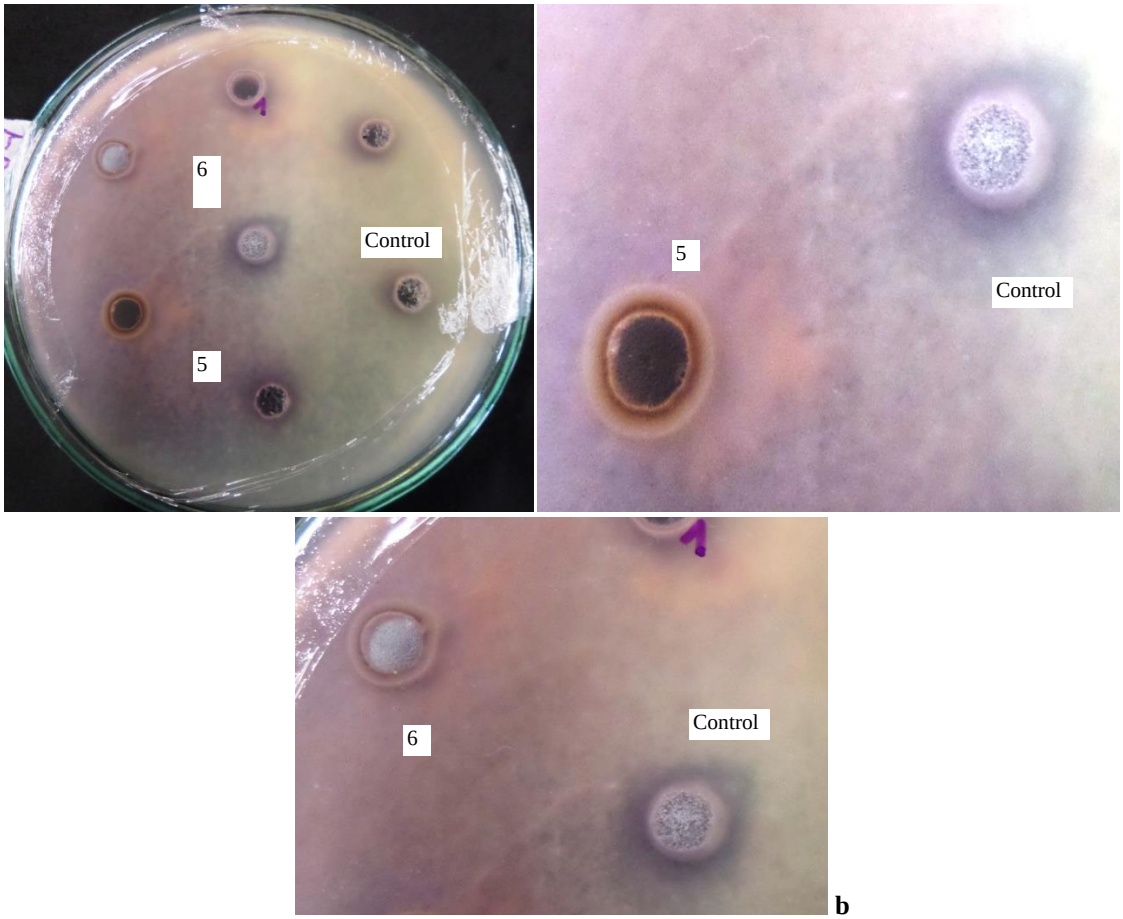


Figura 13. Halo de reacción de larvas enteras retadas contra *F. oxysporum.* (a) Pozo 5: extracto de larva entera retada con 10^4 microcon/mL, (b) Pozo 6: extracto de larva entera + *L. plantarum*, retada con 10^6 microconidias/mL del hongo.

En los ensayos de difusión con la técnica de pozos con siembra en profundidad para las bacterias y la levadura, con las hemolinfas retadas con microconidias del hongo, se observó una notoria reacción que se manifestó por un halo melanizado alrededor del borde del pozo (figuras 14). Estos resultados se graficaron en la figura 15, donde se presentó la mayor reacción frente a *S. aureus*, por parte de las tres diferentes muestras de hemolinfa retada con el hongo, seguida de la reacción de las mismas muestras con *E. coli*. La reacción menos marcada fue para *C. albicans*, donde la reacción menor se presentó con la hemolinfa retada con $1x10^6$ microconidias/mL, fue moderada con la muestra de $1x10^4$ microconidias/mL y aumento sustancialmente con la hemolinfa pre-inoculada con *L. plantarum* + $1x10^4$ microconidias/mL de *F. oxysporum.*

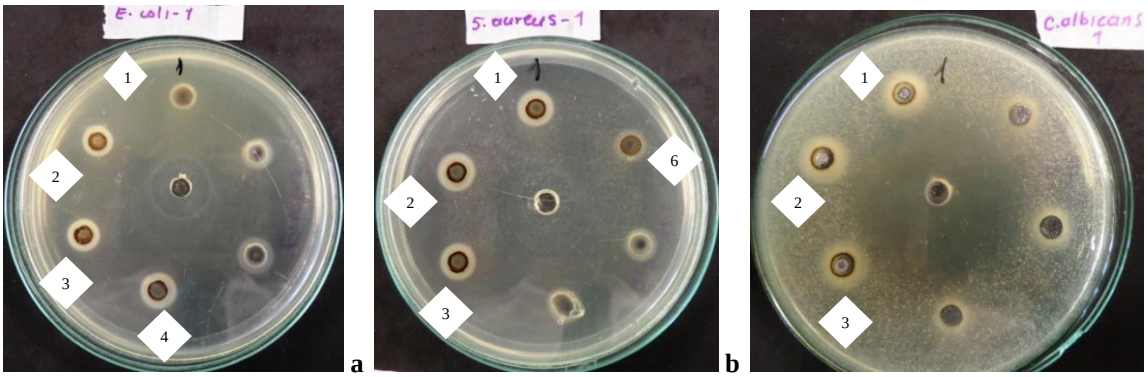


Figura 14. Halos de reacción (a) para *E. coli*: hemolinfa con 10^6 microcon/mL (pozo 1); hemolinfa con 10^4 con/mL (pozo 2); hemolinfa + *L. plantarum* + 10^4 microcon/mL (pozo 3); extracto de larva entera con 10^6 microcon/mL (pozo 4); (b) para *S. aureus:* hemolinfa con 10^6 microcon/mL (pozo 1); hemolinfa con 10^4 micocon/mL (pozo 2); hemolinfa + *L. plantarum* + 10^4 microcon/mL (pozo 3); extracto de larva entera + *L. plantarum* + 10^4 microcon/mL (pozo 6); (c) para *C. albicans:* hemolinfa con 10^6 microcon/mL (pozo 1); hemolinfa con 10^4 microcon/mL (pozo 2); hemolinfa + *L. plantarum* + 10^4 con/ml (pozo 3); el pozo del centro corresponde a la hemolinfa de control sin reto.

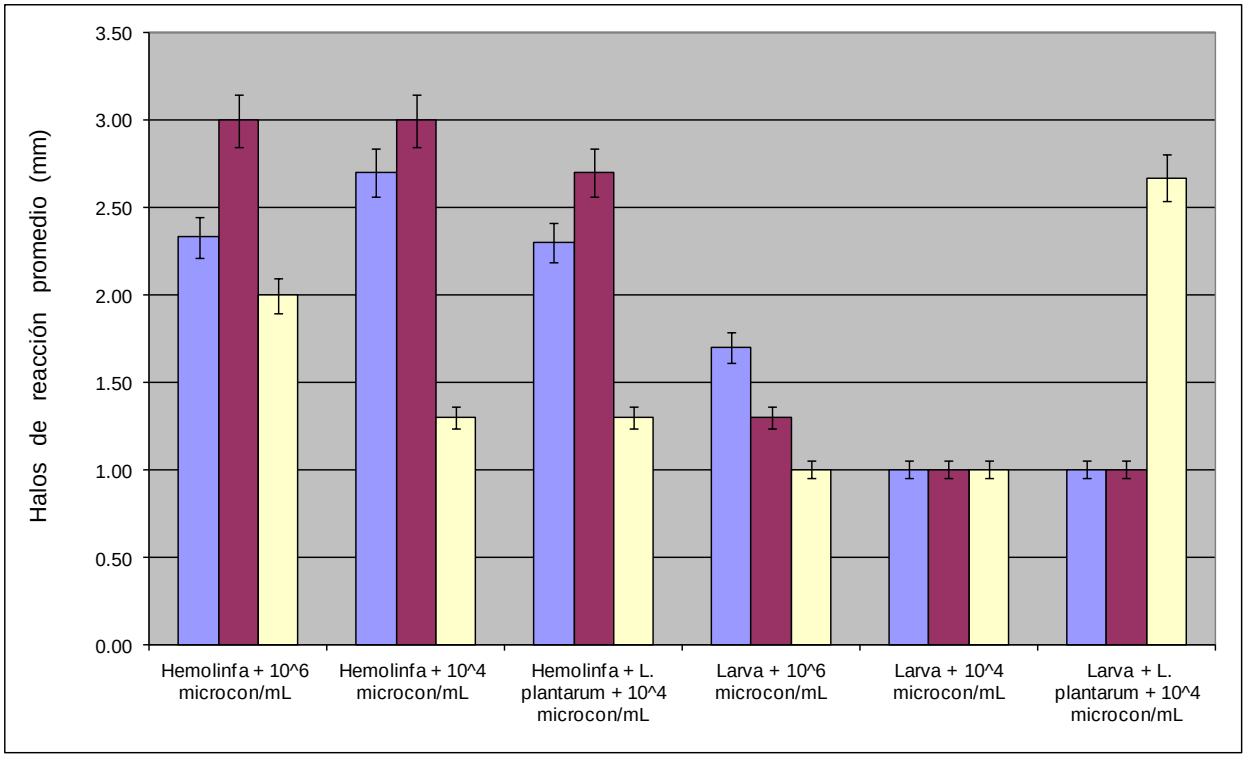


Figura 15. Halos de reacción (mm) observados con los diferentes tratamientos de hemolinfa retada. Las barras azules corresponden a los halos observados con *E. coli*; las barras violeta corresponden a los halos observados con *S. aureus* y las barras blancas, a los halos observados con *C. albicans.*

Se realizó un análisis de varianza de una vía y se probó la significancia de los efectos de los tratamientos para las dos bacterias y la levadura. Se trabajó con $\alpha = 0.05$. La validación del

modelo se llevó a cabo mediante la verificación de los supuestos del modelo, la normalidad, la independencia y la homogeneidad de la varianza (homocedasticidad). Se utilizó el software Statgraphics Centurion XVI versión 16.2.04.

El análisis de varianza para los tres microorganismos evaluados, mostró un valor-p < 0.05 para la prueba-F, indicando que existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de los seis tratamientos (muestras de hemolinfa con reto fúngico) entre un nivel y otro (microorganismo), con un nivel del 95.0% de confianza. El valor-p del test de Levene presentó un valor > 0.05, que indicó que se cumplió el supuesto de homocedasticidad. La normalidad se comprobó gráficamente, observándose que todos los datos se encontraron dentro del intervalo de confianza del 95%. En cuanto a la independencia de las observaciones, el grafico de residuos frente al número de orden, no mostró tendencias ni patrones.

4. Discusión

Una alternativa para el estudio del versátil patógeno fúngico, *F. oxysporum,* es otro organismo igualmente adaptable: *G. mellonella*, que gracias a su eficaz respuesta inmune innata, ofrece varias ventajas, entre ellas, desarrollarse a temperaturas en los límites de 25 a 37°C. La posibilidad de estudiar patógenos a 37°C, permite el estudio de rasgos de virulencia relacionados con la temperatura. Las larvas son fácilmente inoculadas por inyección, lo que permite entregar una cantidad exacta de células fúngicas, que es más ventajoso que el método alimenticio de inoculación usado con otros huéspedes no mamíferos. La hemolinfa de *G. mellonella* posee un complejo sistema celular (hemocitos), que desempeña un papel fundamental en la defensa contra patógenos fúngicos (Bergin, *et al*, 2006; Fuchs & Mylonakis, 2006; Vogel, *et al*, 2011). Además, la talla relativamente grande de estas larvas las hace más fáciles de manejar y convierte a *Galleria* en un modelo atractivo de usar, cuando se requieren inyecciones repetidas de microorganismos o de compuestos antimicrobianos. Los volúmenes grandes de hemolinfa de las larvas, facilitan los análisis bioquímicos, y el hecho de que puedan ser incubados a 37°C, en última instancia, los califica como modelos más exactos de interacción (Kemp & Massey; Bergin, *et al*, 2006].

Para caracterizar la interacción entre *G. mellonella* y *F. oxysporum*, primero se reprodujo el modelo de infección a dos temperaturas y diferentes concentraciones de microconidias del hongo con el fin de evaluar la supervivencia de las larvas y posteriormente indagar en los procesos biológicos, tales como el transporte de proteínas, la defensa y la nodulación, proteínas y lípidos de condensación y, por último, la respuesta inmune durante la infección del insecto con el hongo (Navarro *et al*., 2011; Coleman *et al*., 2011; Mak *et al*., 2010). Nuestros resultados mostraron que el incremento de la temperatura a la que se mantuvieron las larvas después de la infección, aumentó su supervivencia, como lo reporta el trabajo de Wojda *et al.* (2007), en el cual la exposición de las larvas a una temperatura de 38°C mejoraba la respuesta inmune cuando eran infectadas con bacterias; así mismo, Wojda *et al.* (2009), demostraron que el choque térmico de las larvas a 43°C, durante 15 minutos,

después de ser infectadas con un hongo entomopatógeno, extendió su tiempo de vida. En nuestro caso, resultó evidente que las larvas mantenidas a 37°C durante las 48 horas siguientes a la infección con el hongo, lograron sobrevivir en mayor proporción que las larvas mantenidas 25°C, resultado que se mantuvo con todas las concentraciones de microconidias evaluadas (1×10^4, 1×10^5 y 1×10^6). La temperatura de 37°C estimuló el sistema inmune de las larvas, lo que contribuyó a que resistieran el ataque fúngico, permitiendo contar con un mayor número de individuos sobrevivientes, y obtener así, grandes volúmenes de hemolinfa para efectuar los análisis posteriores.

El análisis de regresión permitió establecer que la supervivencia de las larvas se incrementó a 37°C, para las tres concentraciones de microconidias/mL. Se encontró que la supervivencia de larvas infectadas con $1x10^5$, fue el doble que la supervivencia con $1x10^6$ microconidias/mL, a 25°C; mientras que a 37°C, para las mismas concentraciones de microconidias se observó un porcentaje de supervivencia similar. Lo que sugiere que los mecanismos de defensa del insecto se ven promovidos por la temperatura de 37°C y a su vez el patógeno es afectado por esta temperatura, como lo evidencia el trabajo de Coleman *et al*. (2011).

La importancia de estudiar la respuesta inmune de larvas de *G. mellonella* a 37°C radica en el estudio de los rasgos de virulencia de hongos que como *F. oxysporum,* pueden atacar mamíferos (Mylonakis *et al*., 2007), así mismo, como lo presenta Mylonakis (2008), donde explica que aunque algo controvertido, al principio, ahora está bien establecido que la elección para el estudio de la patogénesis fúngica de un huésped invertebrado trae consigo con una serie de importantes ventajas, entre las que se destacan, poder estudiar tanto el proceso infeccioso *in vivo*, como la respuesta del huésped. Además, los estudios cruzados, tanto en huéspedes mamíferos y no mamíferos, pueden ayudar a identificar los rasgos de importancia básica de la virulencia fúngica y el estudio de factores que son independientes del sistema modelo utilizado.

Nosotros estudiamos también el efecto de la inyección de *L. plantarum* en las larvas, antes de la infección fúngica, basándonos en la reconocida capacidad antimicrobiana de ésta bacteria, que además se ha reportado como microbiota beneficiosa de invertebrados tal y como lo evidencia la investigación de Velásquez *et al* (2012) quienes demostraron que las bacterias ácido lácticas (LAB) que son miembros de la microbiota beneficiosa asociada a huéspedes humanos y animales, también se encontraba asociada a invertebrados, aunque dicha asociación ha sido pobremente estudiada, y sus funciones están poco esclarecidas. Velásquez *et al* (2012), también encontraron que las abejas poseen una microbiota LAB abundante, diversa y antigua y se reveló como una de las mayores colecciones de nuevas especies de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Otro trabajo interesante es el de Bergin *et al*. (2006) quienes demostraron que la pre-inoculación de larvas con una dosis sub-letal de *Saccharomyces cerevisiae*, 24 h antes de la inoculación con una dosis letal de células de *C. albicans,* produjo casi completa protección para las larvas. En nuestro caso, el estímulo de las larvas de *G. mellonella* con *L. plantarum,* produjo un incremento en la respuesta inmune de las larvas cuando fueron infectadas posteriormente con el hongo, aumentando su supervivencia. Es de anotar que se presentó mayor porcentaje supervivencia

en las larvas que siempre estuvieron mantenidas a 37°C. Este resultado es muy interesante pues abre nuevas perspectivas a estudios con esta bacteria para controlar *F. oxysporum,* tal y como lo reporta el trabajo de Tropcheva *et al*, (2014) donde se demuestra que especies de *lactobacillus* podrían ser efectivos antagonistas naturales de hongos peligrosos.

En lo que concierne a la inhibición del crecimiento radial del hongo, es conocido que *F. oxysporum* se caracteriza por producir colonias de rápido crecimiento, con una tasa diaria cercana a un centímetro en medio agar papa dextrosa a 25°C (Bosland, 1988), por lo tanto el método de contacto directo permitió la cuantificación de la actividad de la hemolinfa. La muestra de hemolinfa procedente de larvas inoculadas previamente con la bacteria láctica *L. plantarum*, con posterior infección con 10^6 microconidias/mL de *F. oxysporum* (figura 4a), presentó el mayor porcentaje de inhibición; de todas las muestras de hemolifa en tanto que la muestra que causó menor inhibición fue la hemolinfa retada con 10^4 microconidias/mL. Se observó igualmente que el fluconazol causó un efecto fungistático en la cepa de *F. oxysporum* aislada de suelo, puesto que al inicio del ensayo (datos no mostrados), se inhibió el crecimiento del hongo, sin embargo pasados tres días el hongo creció, pero en menor proporción que el Control positivo de crecimiento, debido a la concentración del fluconazol empleada. Al realizar nuevamente el experimento con hemolinfas preinoculadas con *L. plantarum* y con los correspondientes controles, se encontró que la hemolinfa inmune que produjo la mayor inhibición del crecimiento radial del hongo, fue la hemolinfa de larvas que habían sido inoculadas con la bacteria láctica y 24 horas después con el hongo, con incubación a 37°C por 48 horas, causando una inhbición cercana a la producida por el fluconalzol.

La significancia estadística de la inhibición del crecimiento radial de *F. oxysporum* con hemolinfas retadas de diferentes formas representada en el diagrama de cajas y bigotes (boxplot) de la figura 6A para el análisis de varianza mostró, que ningún boxplot presentó valores extremos. El boxplot Control (control positivo) evidenció una distribución con valores de crecimiento muy altos, lo que es consecuente con que el hongo no tiene ningún agente antimicrobiano que lo haya inhibido; el caso contrario se observó en el boxplot de Fluc (control negativo), en donde el hongo creció muy poco por efecto del antimicótico. Respecto a los tratamientos, se observó que se presentó muy poca variabilidad en $HF10^6$ y $HBF10^6$, lo que indica un efecto de inhibición del crecimiento fue casi constante, aunque en $HBF10^6$ se presenta con valores menores de variabilidad, como efecto de la inoculación previa con la bacteria láctica, desencadenando una mayor actividad antimicrobiana en la hemolinfa y limitando el crecimiento del hongo. El tratamiento $HF10^4$ es el que presentó mayor variabilidad, lo que coincide con el hecho de que ésta hemolinfa presentó la menor actividad antimicrobiana.

Evaluación del modelo estadístico: considerando que se tiene un sólo factor el cual fue el crecimiento del hongo, con 5 tratamientos (muestras y controles), y que en cada uno de éstos se tienen 3 observaciones, se puede decir que el diseño fue balanceado. Se observó que el crecimiento (en mm/día) es función de una media global, también del efecto asociado a cada uno de los tratamientos, los cuales son significativos y de un error aleatorio

normal no controlable pero minimizado, lo cual se comprobó con la verificación de los supuestos del modelo.

La verificación del *Supuesto de normalidad mostró que los* errores del modelo estuvieron normalmente distribuidos (figura 6b). Al verificar el s*upuesto de independencia,* la figura 6c corresponde a la gráfica de Residuales vs Índices, en la que no se observó tendencias ni patrones, y se ve que los residuales estuvieron distribuidos casi homogéneamente alrededor del cero, lo que indica que los datos muestrales fueron tomados aleatoriamente. Así, podemos concluir que el supuesto de independencia se cumplió y esto se debió a que se hizo una adecuada aleatorización para llevar a cabo el experimento. Adicionalmente, se realizó el test de Durbin-Watson, cuya hipótesis nula fue *Ho:* la autocorrelación de los datos es igual a cero y la hipótesis alternativa fue, *Ha:* la autocorrelación de los datos es diferente de cero (lo que por la normalidad de los errores implica que los datos son independientes), donde se obtuvo un valor-p = 0.1329 que es mayor de 0.05, lo cual indica que se acepta *Ho*, es decir, concluimos que se considera que los datos fueron incorrelacionados, y por tanto los datos fueron independientes. El supuesto de homocedasticidad se graficó en la figura 6d, la cual muestra la gráfica de Residuales vs Ajustados, en la que se observó que no se presentó variabilidad en los residuales de $HF10^6$, y que se presentó menor dispersión en los residuales de $HBF10^6$, aunque no fue muy distinta a la presentada por los otros tratamientos, lo que indicó que hubo homogeneidad en la varianza. Adicionalmente, se realizaron dos pruebas para verificar homocedasticidad, cuya hipótesis alternativa *Ha:* existen al menos dos muestras con varianza diferente, una paramétrica (prueba de Levene, valor-p = 0.5271) y una no paramétrica (prueba de Fligner-Killeen, valor-p = 0.4933). Los valores-p menores que 0.05 indicaron que no se rechaza Ho, es decir, concluimos que se presentó homogeneidad en la varianza en los errores.

También se detectó actividad antimicrobiana/inmunológica, por el ensayo de difusión en agar, dicha prueba se basó en la inhibición del crecimiento fúngico o bacteriano, mediante la difusión de sustancias activas en un medio sólido, que se evidencia con la formación de halos de inhibición (Valencia, 2004). En nuestro caso, solo se detectó inhibición de crecimiento con la bacteria Gram negativa *E. coli*, y con *F, oxysporum*, con la bacteria Gram positiva *S. aureus*, no se observó ningún halo de inhibición, estos resultados concuerdan con lo obtenido en varios estudios, donde se ha reportado que la hemolinfa de larvas de *G. mellonella* con reto inmunológico, era capaz de producir inhibición tanto de bacterias Gram negativas (Zdybicka-Barabas *et al.*, 2012), Gram positivas y hongos (Cytryska *et al.*, 2007). Para este ensayo utilizamos extractos crudos no concentrados y por lo tanto era muy difícil observar halos de inhibición de gran diámetro.

5. CONCLUSIONES

Las larvas de *G. mellonella* son capaces de sobrevivir a dosis elevadas de microconidias del patógeno *F. oxysporum*, especialmente cuando las larvas son sometidas a incubación de 37°C durante las 48 horas que siguen a la infección fúngica, resultado relevante, pues abre perspectivas a nuevas investigaciones que utilicen este modelo invertebrado para estudios

de patogenicidad fúngica, si se tiene en cuenta el interés generalizado de estudiar rasgos de virulencia asociados a la temperatura de mamíferos.

Las larvas de *G. mellonella* pre-inoculadas con la bacteria láctica, *L. plantarum* e incubadas por 24 horas, antes de someterlas al reto con el hongo, resistieron mejor el ataque fúngico y su supervivencia fue más elevada que las larvas que no fueron pre-inoculadas con la bacteria láctica.

Se comprobó que el diseño experimental fue robusto y reproducible con diferencias estadísticamente significativas, tanto para la evaluación de la supervivencia, como de la actividad anti-fúngica que demostraron las distintas muestras de hemolinfa obtenidas a partir de larvas que habían sido sometidas a los diferentes retos inmunológicos.

6. BIBLIOGRAFÍA

Altincicek B, Linder M, Linder D, Preissner KT, Vilcinskas A. Microbial Metalloproteinases Mediate Sensing of Invading Pathogens and Activate Innate Immune Responses in the Lepidopteran Model Host *Galleria mellonella*. Inf. Immun. 2007;75(1):175–183.

Andrejko M, Mizerska-Dudka M, Jakubowicz T. Antibacterial activity in vivo and in vitro in the hemolymph of *Galleria mellonella* infected with *Pseudomonas aeruginosa*. Comp. Biochem. Physiol. Part B. 2009;152:118–123.

Bergin D, Murphy l, Keenan J, Clynes M, Kavanagh K. Pre-exposure to yeast protects larvae of *Galleria mellonella* from a subsequent lethal infection by *Candida albicans* and ismediated by the increased expression of antimicrobial peptides. Microbes Infect. 2006;8:2105-2112.

Bosland PW. *Fusarium oxysporum* a pathogen of many plant species, Adv. Plant Pathol. 1988;6:281-289.

Brennan M, Thomas DY, Whiteway M, Kavanagh K. Correlation between virulence of Candida albicans mutants in mice and Galleria mellonella larvae. FEMS Immunol Med Microbiol. 2002;34(2):153–157.

Brown SE, Howard A, Kasprzak AB, Gordon KH, Peter D. The discovery and analysis of a diverged family of novel antifungal moricin-like peptides in the wax moth *Galleria mellonella*. Insect Biochem. Mol. Biol. 2008;38:201–212.

Bougandoura N, Bendimerad N. Effect Antifongique Des Extraits Aqueux et Methanolique de *Satureja calamintha* ssp.(Nepeta) briq. Rev. BioRessources. 2012;2:1–7.

Carton Y, Nappi AJ. Inheritance of cellular immune resistance in D*rosophila melanogaster*. Heredity. 1992;69:393-399.

Chase MR, Raina K, Bruno J, Sugumaran M. Purification, characterization and molecular cloning of prophenoloxidases from *Sarcophaga bullata*. Insect Biochem. Mol. Biol. 2000;30:953-967.

Coleman JJ, Muhammed M, Kasperkovitz PV, Vyas JM, Mylonakis E. *Fusarium* pathogenesis investigated using *Galleria mellonella* as a heterologous host. Fungal Biol. 2011;115(12):1279–1289.

Cotter G, Doyle S, Kavanagh K. Development of an insect model for the in vivo pathogenicity testing of yeasts. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 2000;27(2):163–169.

Cuenca-Estrella M, Moore CB, Barchiesi F, Bille J, Chryssanthou E, *et al*. Multicenter evaluation of the reproducibility of the proposed antifungal susceptibility testing method for fermetative yeasts of the antifungal susceptibility testing Subcommittee of the European Committee on antimicrobial susceptibility testing (AFST-EUCAST). Clin. Microbiol. Infect. 2003;9:467-474.

Cytryska M, Mak P, Zdybicka-Barabas Z, Suder P, Jakubowicz T. Purification and characterization of eight peptides from *Galleria mellonella* immune hemolymph. Peptides. 2007;28:533-546.

Fuchs BB, O'Brien E, El Khoury JB, Mylonakis E. Methods for using Galleria mellonella as a model host to study fungal pathogenesis. Virulence. 2010;1(6):475–82.

Fuchs BB, Mylonakis E. Using non-mammalian hosts to study fungal virulence and host defense. Curr. Opin. Microbiol. 2006;9(4):346–351.

Hashimoto K, Yamano Y and Morishima I. Cloning and expression of a gene encoding gallerimycin, a cysteine-rich antifungal peptide, from eri-silkworm, *Samia cynthia ricini*. Comp. Biochem. Physiol. B. 2008;150:229–232.

Hoffmann J. Innate immunity of insects. Curr. Opin. Immunol. 1995;7:4-10.

Kavanagh K, Reeves EP. Exploiting the potential of insects for in vivo pathogenicity testing of microbial pathogens. FEMS Microbiol. Rev. 2004;28(1):101–112.

Kemp MW, Massey RC. The use of insect models to study human pathogens. Drug Discov. Today Dis. Model. 2007;4(3):105–110.

Lazzaro BP. Natural selection on the *Drosophila* antimicrobial immune system. Curr. Opin. Microbiol. 2008;11:284–289.

Mak P, Zdybicka-Barabas A, Cytryńska M. A different repertoire of *Galleria mellonella* antimicrobial peptides in larvae challenged with bacteria and fungi. Dev Comp Immunol. 2010;34(10):1129–1136.

Mayayo E, Pujol I, Guarro J. Experimental pathogenicity of four opportunist *Fusarium* species in a murine model. J. Med. Microbiol. 1999;48(4):363–366.

Murillo-Arango W, Acevedo-Ruíz JM, Peláez-Jaramillo CA. Fungicidal activity of Eucalyptus tereticornis essential oil on the pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. Rev. Cub. Farm. 2011;45:264–274.

Mylonakis E, Moreno R, El Khoury JB, Idnurm A, Heitman J, Calderwood SB, *et al*. *Galleria mellonella* as a Model System To Study *Cryptococcus neoformans* Pathogenesis. Infect Immun. 2005;73(7):3842–3850.

Nappi AJ, Carton Y, Vass E. Reduced cellular immune competence of temperature-sensitive dopadecarboxylase mutant strain of *Drosophila melanogaster* against the parasite *Leptopilina boulardi*. Comp. Biochem. Physiol. B. 1992;101:453-460.

Pieters J. Evasion of host cell defense mechanisms by pathogenic bacteria. Curr. Opin. Immunol. 2001;13:37–44.

R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0. Disponible en: http://www.R-project.org. 2008;[consultado en 10 de marzo de 2014].

Renwick J, Daly P, Reeves EP, Kavanagh K. Susceptibility of larvae of *Galleria mellonella* to infection by *Aspergillus fumigatus* is dependent upon stage of conidial germination. Mycopathologia. 2006;161:377–384.

Sacks D, Sher A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. Nat. Immunol. 2002;3:1041–1047.

Schmid-Hempel P. Review. Immune defence, parasite evasion strategies and their relevance for 'macroscopic phenomena' such as virulence. Phil. Trans. R. Soc. B. 2009;364:85–98.

Sestili S, Polverari A, Luongo L, Ferrarini A, Scotton M, Hussain J, *et al*. Distinct colonization patterns and cDNA-AFLP transcriptome profiles in compatible and incompatible interactions between melon and different races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. BMC Genomics. 2011;12(122):1-21.

St. Leger RJ, Screen SE, Shams-Pirzadeh B. Lack of Host Specialization in *Aspergillus flavus*. Appl. Environ. Microbiol. 2000;66(1):320–324.

Thomson P, Anticevic S, Rodríguez H, Silva V. Actividad antifúngica y perfi l de seguridad del producto natural derivado del aceite de maravilla ozonizado (AMO3) en dermatofitos. Rev. Chil. Infect. 2011;28(6):512-519.

Tortorella D, Gewurz BE, Furman MH, Schust DJ, Ploegh HL. Viral subversion of the immune system. Annu. Rev. Immunol. 2000;18:861–926.

Valencia HA. Manual de prácticas de microbiología básica. Ed. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Depto. de Biología. Primera edición, Bogotá. 2004.

Vogel H, Altincicek B, Glöckner G, Vilcinskas A. A comprehensive transcriptome and immune- gene repertoire of the lepidopteran model host *Galleria mellonella*. BMC Genomics. 2011;12:308.

Wojda I, Jakubowicz T. Humoral immune response upon mild heat-shock conditions in *Galleria mellonella* larvae. J. Insect Physiol. 2007;53:1134–1144.

ANEXO 1

Test *F* y *t* para 10^4, 10^5, 10^6 microconidios/mL a 25 y 37°C. Primera evaluación estadística para la concentración microconidios a los 25 y 37°C, para grupos de 10 larvas por triplicado. Con las concentraciones de 10^7 y 10^8 no se presentó superviviencia (ns) y no probadas (np).

	Promedio de Supervivencia		**F-test**	**t-test**		
Tratamiento microconidias/mL	**25°C**	**37°C**	**Valor Equivalente?**	**T**	**df**	**Valor-p**
10^4	9.23	9.90	No	-2.8972	36	< 0.01
10^5	1.90	8.87	Si	-17.7242	43	< 0.01
10^6	0.47	8.87	No	-38.7258	41	< 0.01
10^7	ns		np	np	np	np
10^8	ns		np	np	np	np

CONTENIDO

ESTUDIO DE LA RESPUESTA CELULAR DE LARVAS DE *GALLERIA MELLONELLA* FRENTE AL RETO CON *FUSARIUM OXYSPORUM* MEDIANTE MICROSCOPÍA CONFOCAL LÁSER 120
RESUMEN 120
1. INTRODUCCIÓN 121
1.1 microscopía confocal asistida por láser 121
1.2 microscopía diferencial de contraste de interferencia o de fases (dic), técnica de nomarski 122
1.3 respuesta celular de insectos 122
1.3.1 tipos de hemocitos en *g. mellonella.* 124
1.4 características micromorfológicas de *fusarium oxysporum* 125
1.4.1 microscopía de *f. oxysporum.* 125
2. MATERIALES Y MÉTODOS 126
2.1 material biológico 126
2.1.1 larvas de insecto. 126
2.1.2 cepa del hongo. 126
2.2 obtención de las muestras 126
2.2.1 obtención de las microconidias de *f. oxysporum.* 126
2.2.2 inyección de larvas con microconidias del hongo. 127
2.2.3 extracción de la hemolinfa. 127
2.3 colorantes utilizados 127
2.3.1 preparación del colorante rojo allura no. 40 (ra). 127
2.3.2 preparación del colorante lacto-azul de algodón (*lacto cotton blue* lcb). 127
2.4 montaje para microscopía 127
2.4.1 preparación de las muestras. 127
2.4.2 preparación de las placas para microscopía. 128
2.5 observación en microscopio láser confocal 128
3. RESULTADOS 129
3.1 observación antes de la infección 129
3.2 observación de hemocitos al inicio de la infección 130
3.3 observación a las 24 horas post-infección 132
4. DISCUSIÓN 136
4.1 observación antes de la infección 137

4.2 observación de hemocitos al inicio de la infección 137
4.3 observación a las 24 horas post-infección 138
5. CONCLUSIONES 139
6. BIBLIOGRAFÍA 139

ESTUDIO DE LA RESPUESTA CELULAR DE LARVAS DE *Galleria mellonella* FRENTE AL RETO CON *Fusarium oxysporum* MEDIANTE MICROSCOPÍA CONFOCAL LÁSER

RESUMEN

La respuesta celular de insectos está dada por la producción de diversos tipos de hemocitos, los cuales se han identificado por una combinación de las características morfológicas, antigénicas y funcionales. Aunque los hemocitos tienen funciones similares en la inmunidad en todos los insectos, los nombres de los diferentes tipos de hemocitos varían entre las especies y taxones. En *Galleria mellonella* como en todos los insectos, los hemocitos son células inmunes que constituyen el brazo celular de la respuesta inmune a los agentes patógenos y los niveles elevados de hemocitos han sido previamente asociados con una respuesta protectora contra las infecciones microbianas. En lepidópteros la densidad de hemocitos varía según el grado de infección y el tipo de patógeno. Al menos seis tipos de hemocitos han sido identificados en *G. mellonella*, aunque más tipos puedan existir en otras especies. En el presente capítulo estudiamos la respuesta celular de larvas de *G. mellonella* infectadas con microconidias de *F. oxysporum*, evaluadas a dos concentraciones (10^4 y 10^6 microconidias/mL) y dos temperaturas (25 y 37°C), logrando observar distintos tipos de células producidas en respuesta al ataque fúngico, mediante microscopía láser confocal. Se observó que antes de infectar las larvas, la hemolinfa contenía granulocitos; después de la infección se encontraron granulocitos, plasmatocitos, esferolucitos y adipocitos. Al inicio de la infección, se logró detectar la presencia tanto de microconidias de *F. oxysporum* como de hemocitos de *G. mellonella*. Se observó que al inicio de la infección con 10^4 microconidias/mL, en larvas incubadas a 25°C, se detectó la presencia tanto microconidias como granulocitos, y cuando las condiciones de temperatura y concentración variaron a 37°C y 10^6 microconidias/mL, se pudo ver que aumentó la cantidad de granulocitos y además aparecieron plasmatocitos y algunos esferulocitos. La respuesta celular de *G. mellonella* es diferente, tanto en cantidad como en diversidad de hemocitos cuando aumenta la temperatura y la concentración de microconidias del hongo.

Palabras claves: Microscopía láser confocal, Lacto azul de algodón, Rojo allura, hemocitos, Nomarski.

1. INTRODUCCIÓN

El microscopio láser confocal es básicamente un microscopio óptico que incluye como fuente de luz un láser y un sistema electrónico que ayuda a la captación de imágenes, gracias a ello se consigue por un lado, un aumento en la resolución y por otro, la obtención de imágenes de secciones ópticas extremadamente finas, eliminando así la interferencia que produce la luz que llega de los diferentes campos ópticos de todo el grosor de la muestra que se observa, consiguiendo así que el enfoque se realice sobre un único plano (confocal). Por todo ello, y a que las imágenes obtenidas son digitales, se pueden obtener aumentos superiores a la microscopía óptica tradicional (Paddock, 1999)**.**

1.1 Microscopía Confocal asistida por Láser

La técnica de escaneo láser confocal de disco giratorio y microscopía de fluorescencia se ha convertido en una herramienta esencial en la biología y las ciencias biomédicas, así como en la ciencia de los materiales debido a los atributos que no son fácilmente disponibles utilizando otros modos de contraste con microscopía óptica tradicional (Paddock,1999). El concepto básico de la microscopía confocal fue desarrollado originalmente por Marvin Minsky a mediados de la década de 1950 y patentado en 1961 (Minsky (1988). La microscopia de escaneo láser confocal (CLSM) ha abierto nuevas fronteras en la microscopía, debido al uso de luz monocromática intensa y su capacidad para hacer rebanadas ópticas delgadas para la reconstrucción tridimensional. La CLSM proporciona una alternativa a la clásica citometría de imagen, de dos dimensiones en que se basa la microscopía de campo brillante, para mediciones geométricas, rasgos citoquímicos e histoquímicos. Ambas técnicas permiten mediciones selectivas de núcleos específicos en función de su morfología. La citometría de imagen está típicamente formada en *cytospins*, que contienen todo un conjunto núcleos. La arquitectura del tejido se pierde, sin embargo, y las células relevantes pueden perderse dentro de otras poblaciones de células. Aunque la citometría de imagen utiliza secciones de tejido, es posible que los artefactos de corte no se puedan evitar en secciones convencionales de 4 mm de espesor de tejido, debido a que los diámetros de los núcleos generalmente son más grandes que el espesor de corte. Los artefactos de corte se pueden reducir mediante el aumento de espesor de la sección, pero esto resulta en superposición que genera imágenes borrosas y mediciones menos precisas. Estos problemas se pueden superar utilizando CLSM, porque utiliza el principio confocal para permitir seccionamiento óptico en lugar de seccionamiento del tejido (Ploeger, 2008).

En un microscopio confocal, un único punto de luz de excitación se explora a través de la muestra utilizando espejos de exploración. Este punto de excitación en la muestra única por lo general, se produce por enfocar un haz láser. Debido a que el rayo láser se enfoca a través de la lente del objetivo, la intensidad de la iluminación se suministra principalmente al plano del foco, reduciendo así la excitación y el enfriamiento de objetos situados fuera del plano focal. La luz fluorescente pasa de nuevo a través de la lente objetivo, el divisor de haz (ya sea un espejo dicroico o un divisor de haz acústico-óptico) y a través de la abertura del *pinhole*. Casi toda la luz fluorescente procedente de regiones a distancia desde el punto iluminado se bloquean por el *pinhole*, y la señal fuera de foco es atenuada en gran medida. La luz que pasa a través del *pinhole* y la imagen es detectada por una célula fotosensible,

típicamente un fotomultiplicador. Se obtiene una mejor calidad de imagen, con el uso de lentes de alta magnificación con la apertura numérica más alta posible. Otras configuraciones de la CLSM que influyen en la calidad de las imágenes obtenidas incluyen el rango dinámico del fotomultiplicador, el sistema de filtro para configurar de forma selectiva el ancho de banda en la que se detecta la fluorescencia, y la forma en que se realiza la división de haz. Se puede hacer fácilmente un seccionamiento óptico de parafina en secciones gruesas utilizando CLSM. A continuación, las imágenes digitales en serie se pueden almacenar en un archivo. Con el software de análisis de imagen correspondiente, estas imágenes se pueden utilizar para crear una reconstrucción en tres dimensiones de todo conjunto (Ploeger *et al*., 2008).

1.2 Microscopía diferencial de contraste de interferencia o de fases (DIC), técnica de Nomarski

La microscopía de Nomarski, es un tipo de microscopía de interferencia pero que utiliza luz polarizada que permite observar células vivas. Los diferentes constituyentes celulares (núcleo, citoplasma y mitocondrias) absorben de manera similar la luz visible. Esta ausencia de contraste hace que sea difícil distinguirlos usando un microscopio óptico clásico sin emplear tinción. Con la técnica de Nomarski se obtiene una imagen que da la impresión de un sombreado lateral del objeto, el sombreado corresponde más a una diferencia en el índice de refracción que a una simple diferencia de espesor. Esta técnica aprovecha la polarización focal del haz; un prisma comparte el haz de luz incidente de manera que una parte atraviesa una zona del objeto y la otra parte una zona muy próxima y otro prisma recombina esos dos haces de luz. Las mínimas diferencias de espesor o de índice de refracción entre los elementos adyacentes del objeto, son convertidos en una imagen clara. Esta técnica sólo permite trazar el contorno de organelos como núcleo y vacoulas, pero permite observar objetos más espesos (Lodish *et al*., 1997).

1.3 Respuesta celular de insectos

Los hemocitos de insectos se han identificado por una combinación de las características morfológicas, antigénicas y funcionales (Brehelin y Zachary, 1986). La caracterización de los procesos moleculares que regulan la función de los hemocitos ha sido también aumentada por el estudio de líneas de células de hemocitos, tales como células de *Drosophila melanogaster*, células del lepidóptero *Trichoplusia ni* y células de *Bombyx mori* (Stuart & Ezekowitz, 2005). Aunque los hemocitos tienen funciones similares en la inmunidad en todos los insectos, los nombres de los diferentes tipos de hemocitos (figura 1) varía un poco entre las especies y taxones. (Evans *et al*, 2003). La literatura sobre la hematología de insectos no es concluyente, desde los trabajos de Gupta (1969), se ha tratado de normalizar los términos empleados para los hemocitos, mediante una vasta revisión de la literatura, se propuso la terminología que los clasifica en 8 tipos de hemocitos (Staurengo da Cunha, *et al*., 1976). Los plasmatocitos representan el 90-95 % de todos los hemocitos maduros, son fuertemente adhesivos *in vitro*, y su función es la fagocitosis, mediante la cual engullen patógenos, células muertas y otras entidades que tratan de entrar en el hemocele. Las células de cristal no son células adhesivas y comprenden aproximadamente el 5 % de los hemocitos en circulación, las células de cristal son reconocidas por su morfología redondeada y la expresión en cascada de componentes PO

como propo 1 (PPO1). Los lamelocitos se identifican como células grandes y planas adhesivas, su principal función es la encapsulación de los parasitoides y otros grandes objetivos extraños. Cada uno de estos tipos de hemocitos se diferencia del precursor de prohemocitos que se originan a partir de pre-prohemocitos (figura 1). Aunque la mayoría de prohemocitos residen en los órganos hematopoyéticos, un pequeño número de prohemocitos también se observan en la circulación. En la mayoría de otros insectos, los principales hemocitos diferenciados en la circulación se denominan granulocitos (células granulares), plasmatocitos, esferulocitos y oenocytoides (Lanot *et al*, 2001; Lavine & Strand, 2002; Ribeiro & Brehelin, 2006). En la mayor parte de la literatura, donde se utilizaron métodos sólo morfológicos o histoquímicos de identificación de hemocitos, también se han utilizado otros nombres para los hemocitos (Jones, 1962; Lackie, 1988). Sin embargo, estudios más recientes indican que estas células a veces no son hemocitos sino contaminantes provenientes de otros tejidos (Strand. 2008).

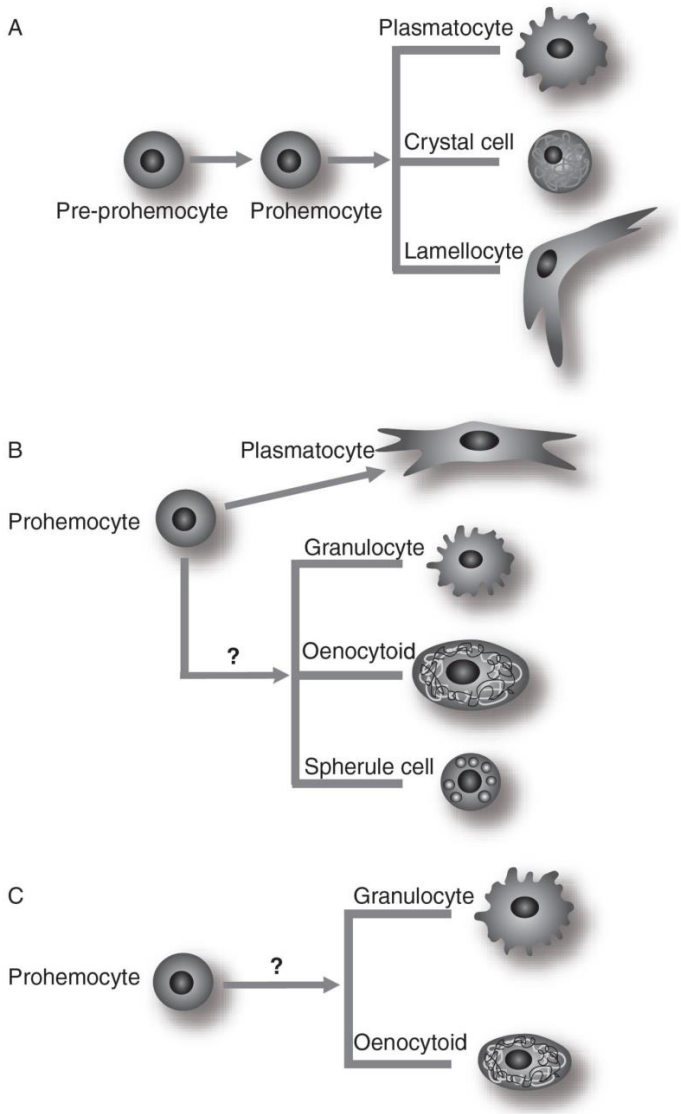


Figura 1. Tipos de hemocitos involucrados en la inmunidad de insectos (Strand, 2008).

1.3.1 Tipos de hemocitos en *G. mellonella.*

En *G. mellonella* como en todos los insectos, los hemocitos son células inmunes que constituyen el brazo celular de la respuesta inmune a los agentes patógenos y los niveles elevados de hemocitos han sido previamente asociados con una respuesta protectora contra las infecciones microbianas (Mowlds & kavanagh, 2008; Lapointe *et al.*, 2012; Solidade-Ribeiro *et al.,* 2012). En lepidópteros, la densidad de hemocitos varía según el grado de infección y el tipo de patógeno. Al menos seis tipos de hemocitos han sido identificados, aunque más tipos puedan existir en otras especies. Aunque estudios posteriores han proporcionado una clasificación alternativa que contiene nueve grupos Se han clasificado los hemocitos como: prohemocitos (6-13 um de diámetro) son pequeñas células redondas con núcleos grandes, que se dividen y se pueden distinguir de otros tipos de células. Los

plasmatocitos y granulocitos (células granulares), de 40-50 µm, son células predominantemente fagocitárias, participan también en la formación de nódulo y la encapsulación que son elementos importantes de la defensa celular del insecto contra bacterias y hongos unicelulares. Los plasmatocitos contienen enzimas lisosomales y son el tipo de células más abundantes, además, participan, en cierta medida, en la síntesis de péptidos antimicrobianos durante la respuesta humoral. Los granulocitos poseen un núcleo relativamente pequeño y gránulos ricos en citoplasma. Los esferulocitos son células ovales o redondas (25 µm) con variación del número de pequeñas inclusiones esféricas**.** Los oenocitoides son células grandes, binucleadas, no fagocitarias que pueden contener profenoloxidasa. Los coagulocitos también han sido llamados hematocitos hialinos y están implicados en el proceso de producción de coagulo (clotting). Los adipohemocitos son caracterizados por la presencia de gotitas de grasas (Kavanagh & Reeves, 2004; Strand & 2008).

1.4 Características micromorfológicas de *Fusarium oxysporum*

Colonias de color salmón o violeta, esporodoquios de color salmón, conidias sobre monofiálides cortas y robustas, generalmente hay clamidosporas (Barnett & Hunter, 1998).

1.4.1 Microscopía de *F. oxysporum.*

El hongo produce tres clases de esporas, macroconidias, microconidias y clamidosporas.

- *Microconidias:* generalmente unicelulares, sin septas, hialinas, elipsoidales a cilíndricas, rectas o curvadas; se forman sobre fiálides laterales, cortas, simples osobre conidióforos poco ramificados. Las microconidias tienen 5-12 µm de largo por 2.5-3.5 µm de ancho (figura 2).
- *Macroconidias*: de paredes delgadas, fusiformes, largas, moderadamentecurvadas en forma de hoz, con varias células y de 3 a 5 septas transversales, con la célula basal elongada y la célula apical atenuada; las macroconidias tiene un tamaño de 27 a 46 µm de largo por 3.0 a 4.5 µm de ancho (figura 2).
- *Clamidosporas:* formadas a partir de la condensación del contenido de las hifas y de las conidias, de paredes gruesas. Se forman simples o en pares, terminales o intercalares: poseen un tamaño de 5 a 15 µm de diámetro. Gracias a ellas el hongo sobrevive en condiciones ambientales desfavorables y en el suelo como saprófito de vida libre en ausencia de plantas hospedantes. Hasta el momento no se conoce la fase perfecta del hongo (Garcés de Granada *et al*., 2001).

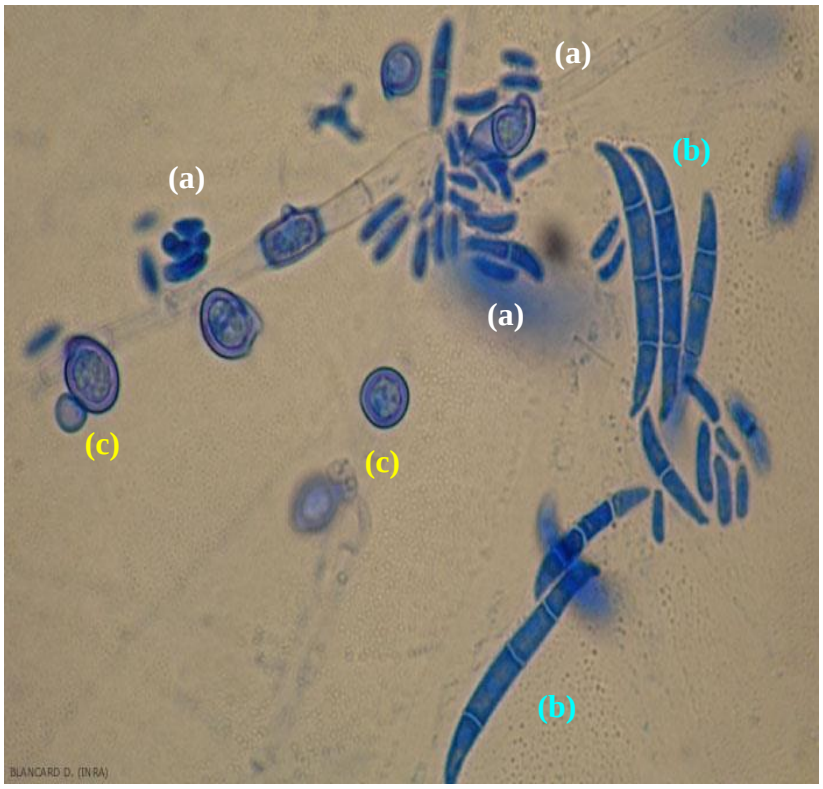


Figura 2. Características morfológicas de las microestructuras de *F. oxysporum*. (a) microconidias; (b) macroconidias; (c) clamidosporas. Imagen tomada de :http://ephytia.inra.fr/fr/C/5217/Tomate-Biologie-epidemiologie.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material Biológico

2.1.1 Larvas de insecto.

Se emplearon larvas de *G. mellonella* en la etapa final de desarrollo del estadio larval, con peso corporal entre 230-330 mg, alimentadas con dieta artificial (ver Capítulo 1, numeral 2.4).

2.1.2 Cepa del hongo.

Se empleó la cepa de *F. oxysporum* aislada en campo por el GIEM, la cual fue cultivada en medio PDA, crecida a 25°C durante 14 días, a intervalos de oscuridad y luz. Se mantuvo a 4ºC, y se repicó cada tres meses (Renwick *et al*, 2006; Coleman *et al*., 2011).

2.2 Obtención de las muestras

2.2.1 Obtención de las microconidias de *F. oxysporum*.

Según lo descrito en el capítulo 3, numeral 2.2.1. Se utilizaron $1x10^4$ y $1x10^6$ microconidias/mL.

2.2.2 Inyección de larvas con microconidias del hongo.

Según lo descrito en el capítulo 3, numeral 2.2.3.

2.2.3 Extracción de la hemolinfa.

Después de pasadas 24 horas y previo a la recolección de la hemolinfa, los insectos fueron enfriados por 15 min a 4ºC y se esterilizó la superficie con una solución de etanol del 70% (v/v). Las muestras de hemolinfa fueron obtenidas mediante perforación del abdomen larval con una aguja estéril. La hemolinfa que fluyó fuera fue transferida inmediatamente dentro de un tubo Eppendorf previamente enfriado y que contenía Feniltiourea (0.150mM) para prevenir melanización. (Cytryska *et al*., 2007; Wojda & Jakubowicz, 2007).

2.3 Colorantes utilizados

Se empleó el colorante Rojo Allura No. 40 (FDA 16035 y el colorante Lacto-azul de algodón (Fisher Scientific, Los Angeles). También se empleó el colorante Hoechst (Sigma-Aldrich) que tiñe ADN (González *et al*., 2011; Sime *et al*., 2012).

2.3.1 Preparación del colorante Rojo Allura No. 40 (RA).

Se preparó la solución stock, disolviendo 1 g de Rojo Allura No. 40-1 (RA-1) en 100 mL de agua destilada, mezclando en agitador magnético durante 24 horas. Luego se preparó la solución de trabajo (RA-2), mezclando 10 mL de Acido acético, 15 mL de glicerol y 75 mL de agua destilada, se agitó durante 3 horas, luego se adicionó 1 mL de la solución stock RA-1 (González *et al*., 2011).

2.3.2 Preparación del colorante Lacto-azul de algodón (*lacto cotton blue* LCB).

Se preparó primero el stock de azul del algodón-1 (LCB-1), disolviendo 1,0 g de cristales de Azul de anilina, se agregaron primero los cristales de azul de algodón en ácido láctico mientras se agitaba vigorosamente hasta total disolución. A continuación se filtró la solución al vacío a través de un filtro Whatmann # 50 de 90 mm (Fisher Scientific, Los Angeles) en un embudo Buchner de porcelana. Se cubrió el embudo para asegurar que no entraran partículas del aire, se procedió a filtrar, y se comprobó la claridad de la solución. Luego se preparó la solución de Lacto-azul de algodón de trabajo-2 (LCB-2), adicionando 3 mL de la solución stock de azul de algodón (LCB-1) antes preparada, en 99 mL de ácido láctico del 85% (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri), más 50 mL de agua destilada (Sime *et al*., 2002).

2.4 Montaje para microscopía

2.4.1 Preparación de las muestras.

Se emplearon cuatro tipos de muestras: *i)* hemolinfa control (sin inyección); *ii)* suspensión de $1x10^6$ microconidias/mL de *F. oxysorum; iii)* hemolinfa de larvas retadas con 10^6 microconidias/mL de *F. oxysorum*, e incubadas a 37°C y extraída pasadas 24 horas; *iv)* hemolinfa de larvas retadas con 10^4 microconidias/mL de *F. oxysorum*, e incubada a 25°C y extraída pasadas 24 horas. Se prepararon dos series de tubos eppendorf, en la primera serie se emplearon cuatro tubos, a cada uno se adicionaron 200 µL de cada una de la muestras

antes descritas, más 200 µL de colorante Rojo Allura No. 40 (RA-2) en cada una. En la segunda serie se tomaron cuatro tubos, con cada una de las muestras arriba mencionadas y se les adicionaron 200 µL de colorante Lacto azul de algodón (LCB-2). Todos los tubos se homogenizaron suavemente para evitar el daño de las células.

2.4.2 Preparación de las placas para microscopía.

Para preparar las placas de montaje se emplearon láminas y laminillas de vidrio de alta calidad. Se depositaron 50 µL de cada muestra de las dos series, evitando la formación de burbujas, se colocó inmediatamente la laminilla, se colocó la lamina cubre-objeto con la laminilla cubre-objeto de forma invertida en el porta láminas del microscopio confocal, se adicionó un agota de aceite de inmersión Olympus y se procedió a realizar la observación.

2.5 Observación en microscopio láser confocal

Las preparaciones fueron examinadas en el microscopio confocal OLYMPUS FV1000 del Instituto de Biología de la Universidad de Antioquia, provisto de 6 líneas láser, asistido por el software FV-ASW versión 2.0 avanzado para manejo de imagen fv1000. El microscopio cuenta con una unidad externa de detección de luz transmitida, compuesta por un detector fotomultiplicador de luz transmitida y de iluminación halógena convencional de 100 W, integrada tanto para el escaneado láser como para la observación Nomarski (DIC) de transmisión convencional de luz, accionado mediante un intercambiador motorizado entre iluminación de luz transmitida y detección láser. Para el procesamiento de imagen cuenta con un filtro Individual: normal, de paso bajo, Sobel, Mediana, Prewitt, 2D Laplace, con mejoramiento de borde, además realiza los cálculos: inter-imagen, matemática y lógica, con nivelación de fondo DIC. Las condiciones de adqusición de imágenes se detallan el tabla 1.

Tabla 1. Condiciones de adquisición de las imágenes. Microscopio Olypmpus FV1000

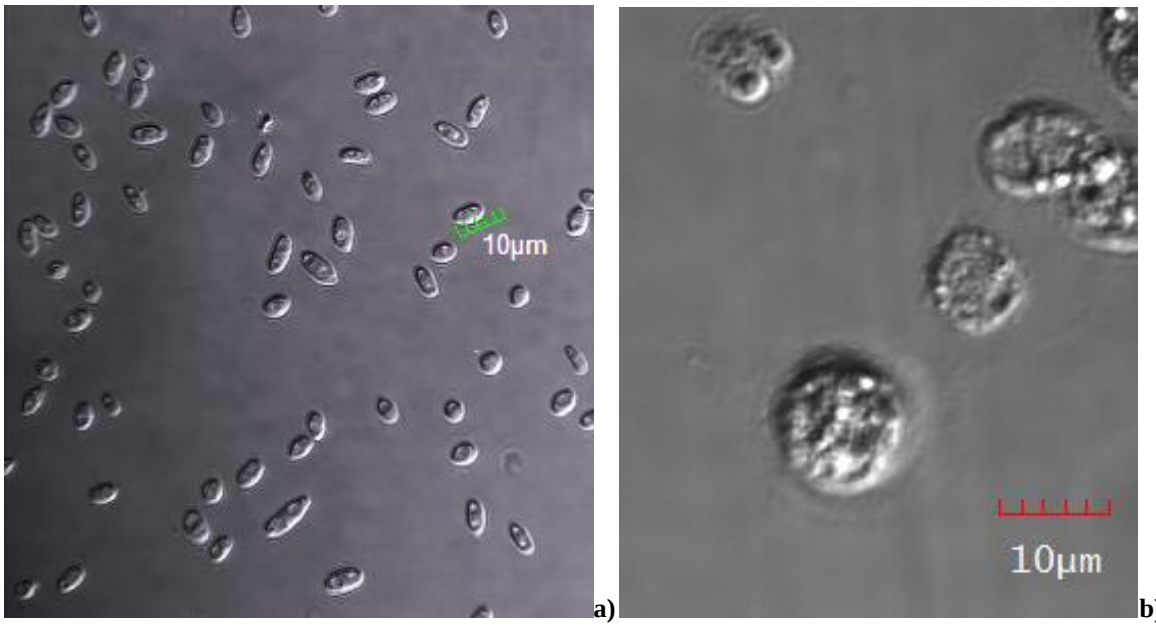
Bits / Pixel"	"12 [bits]"	"Zoom"	"x1.0"
"Device"	FV1000"	"Laser 1 Wavelength"	"405 [nm]"
"Observation Mode"	"LSM"	"Laser 1 Transmissivity"	"5.0 [%]"
"Scan Direction"	"Oneway"	"Laser 2 Wavelength"	"488 [nm]"
"Sampling Speed"	"8.0 [us/Pixel]"	"Laser 2 Transmissivity"	"5.0 [%]"
"Confocal"	OFF	"[Channel 1]"	
"C.A."	"95 [um]"	"Channel Name"	"TD1"
"Sequential Mode"	"None"	"Dye Name"	"None"
"Integration Type"	"Line Kalman"	"Spectrum Separation"	"OFF"
"Integration Count"	"2"	"PMT Detection Mode"	"Analog"
"Region Mode"	"None"	"PMT Voltage"	"284 [V]"
"Find Mode"	"x1"	"Excitation DM Name"	"DM405/488"
"Rotation"	"0.0 [deg]"	"Excitation DM Position"	"2"
"Pan X"	"0 [um]"	"Excitation Wavelength"	"488 [nm]"
"Pan Y"	"0 [um]"	"Emission Wavelength"	"0 [nm]

3. RESULTADOS

Se encontraron cuatro tipos de hemocitos de *G. mellonella* que se produjeron en respuesta a la infección con microconidias de *F. oxysporum*. Se observó que antes de infectar las larvas, la hemolinfa contenía granulocitos; después de la infección se encontraron además de los granulocitos, también se observaron plasmatocitos, esferolucitos y adipocitos.

3.1 Observación antes de la infección

El colorante Lacto-azul de algodón (figura 3a), produjo buen contraste que permitió visualizar las estructuras internas de las microconidias. En el caso de los hemocitos, se logró observar un solo tipo de hemocitos antes de la infección con las microconidias, se trataba de granulocitos (figura 3b) presentes en cantidad moderada.

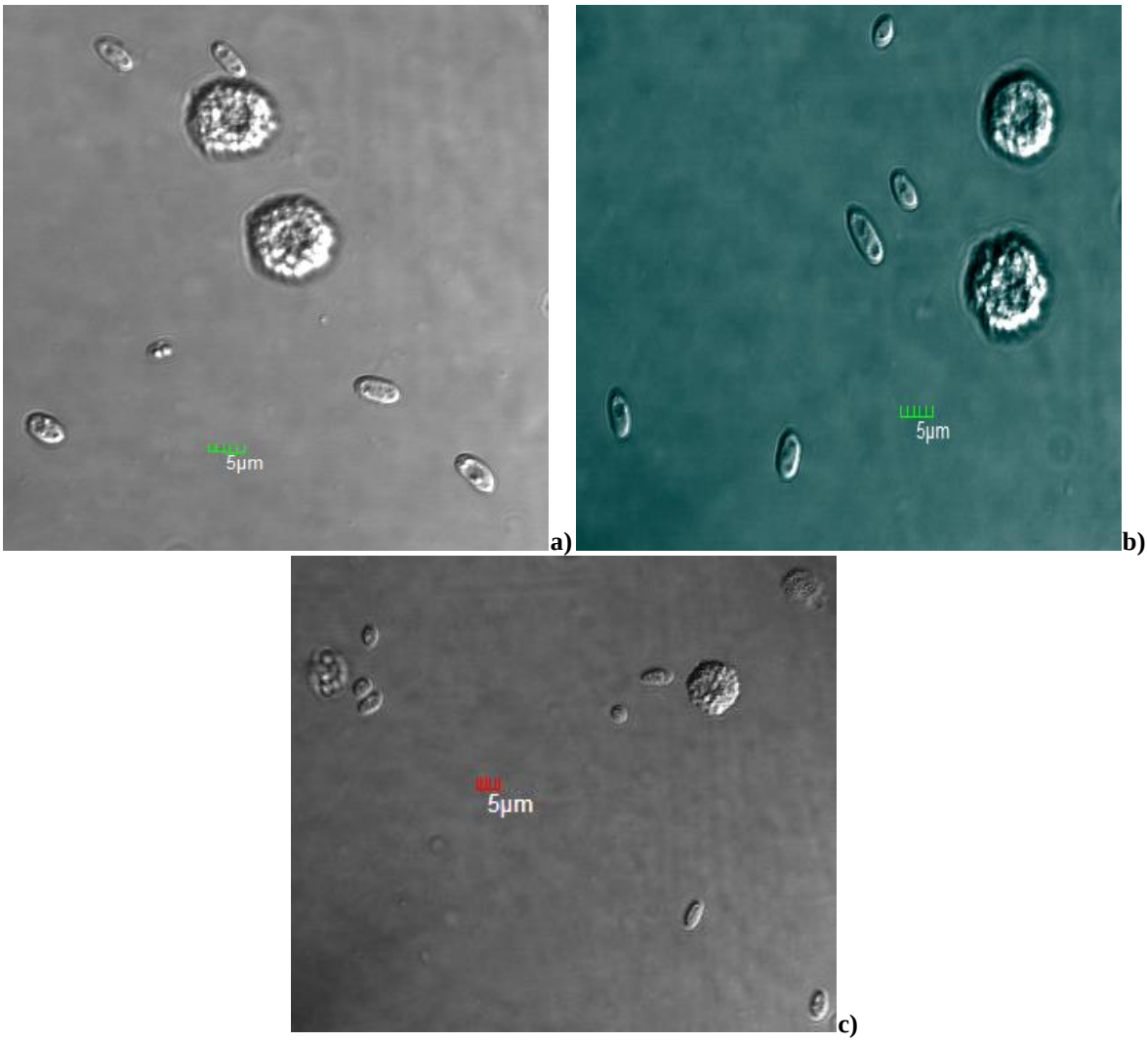


a) **b)**

Figura 3. Observación de microconidias del hongo y de células de la hemolinfa. Aspecto de las microconidias del hongo y los hemocitos de larvas, antes de la infección: **(a)** microconidias de *F. oxysporum* (10^6 conidias/mL) 512, 0.0 - 211.554 [um], 0.414 [um/Pixel- 60X, NA:1.42, colorante LCB; **(b)** Granulocitos de larvas de *G. mellonella* sin ningún reto y que habían sido mantenidas a 25°C. 512, 0.0 - 105.777 [um], 0.207 [um/Pixel]. 40X- :1.30", colorante RA.

3.2 Observación de hemocitos al inicio de la infección

En las larvas inyectadas con 10^4 microconidias/mL del hongo, e incubadas a 25°C por dos horas, se realizaron las observaciones y se logró detectar la presencia tanto de microconidias de *F. oxysporum* como de hemocitos de *G. mellonella*. A temperatura ambiente (25°C) se pueden ver tanto granulocitos como microconidias en las cercanías de estos (figura 4a, 4b y 4c). A medida que avanzó la infección se observaron cada vez menos microconidias del hongo.



a) **b)** **c)**

Figura 4. Granulocitos de *G. mellonella* y microconidias de *F. oxysporum*. Hemocitos provenientes de larvas infectadas con 10^4 microconidias/mL e incubadas a 25°C. **(a)** 1024, 0.0 - 211.761 [um], 0.207 [um/Pixel], 60X O NA:1.42, colorante LCB; **(b)** 1024, 0.0 - 211.761 [um], 0.207 [um/Pixel], 60X O NA:1.42, colorante RA; **(c)** 512, 0.0 - 211.554 [um], 0.414 [um/Pixel], 60X O NA:1.42, colorante LCB.

Una vez que las condiciones de temperatura y concentración varían a 37°C y 10^6 micrconidias/mL, se puede ver la aparición de tipos más diversos de hemocitos entre los cuales se encuentran: granulocitos, plasmatocitos y algunos esferulocitos (figura 5).

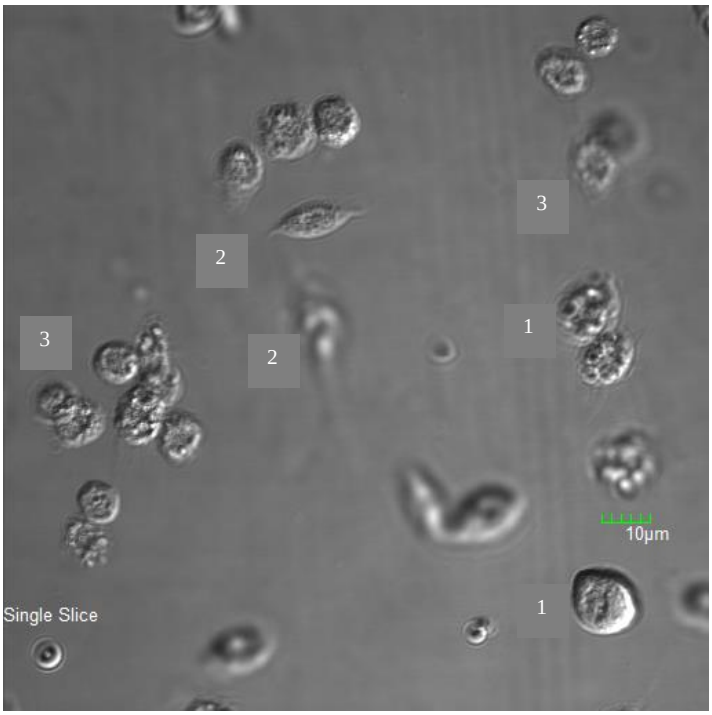


Figura 5. Observación de diferentes tipos de hemocitos de *G. mellonella*. Hemocitos provenientes de larvas infectadas con 10^6 microconidias/mL e incubadas a 37°C, de 512, 0.0 - 144.102 [um], 0.282 [um/Pixel]; Objetivo UPLFLN 40X O NA:1.30". (1) Granulocitos, (2) plasmatocitos, (3) esferulocitos, colorante LCB.

3.3 Observación a las 24 horas post-infección

Pasadas 24 horas después de la infección de las larvas con 10^4 microconidias/mL, con incubación a 25°C, se observó una reacción donde se produjo gran cantidad de lípidos (figura 6a y 6c). En la figura 6b se aprecia una microconidia de *F. oxysporum* muy cerca del granulocito y se puede ver la reacción de la célula de *G. mellonella*. En la figura 6c se observa un granulocito de *G. mellonella* (en amarillo) que comienza a ser rodeado por lípidos (flechas azules).

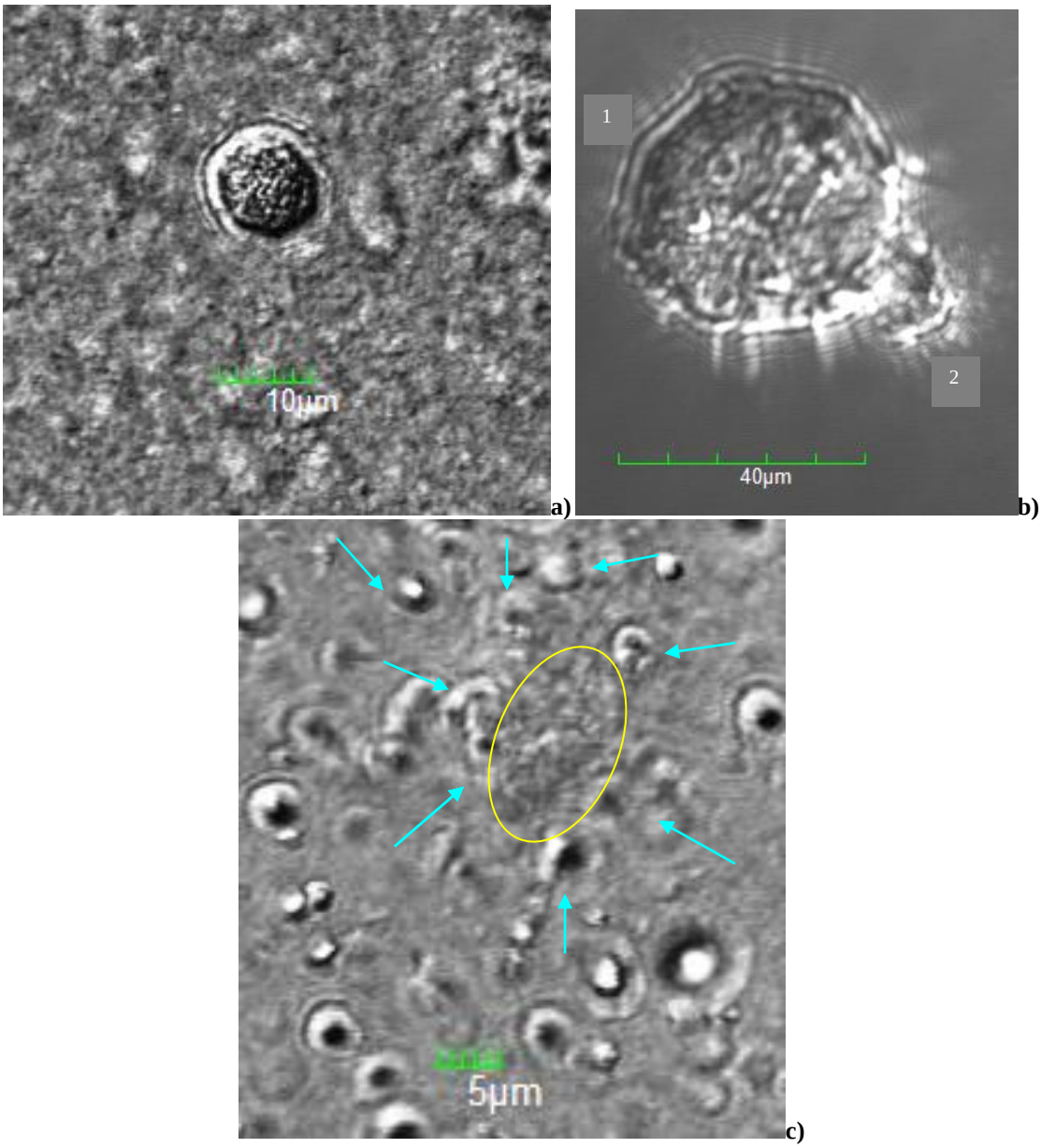


Figura 6. Observación pasadas 24 horas post-infección. Aspecto de células de hemolinfa retada con 10^4 microconidias/mL e incubadas a 25°C: **(a)** granulocitos y esferulocitos inmersos en lípido; 512, 0.0 - 126.728 [um], 0.248 [um/Pixel] Lens UPLFLN 40X O NA:1.30; **(b)** granulocito [1] y microconidia [2] de *F. oxysporum*; 512 * 512 [Pixel], 0.0 - 131.838 [um], 0.258 [um/Pixel] lens UPLFLN 40X O NA:1.30; **(c)** granulocito de *G. mellonella* (en amarillo) que comienza a ser rodeado por lípidos (flechas azules); 512 Pixel x 0.248 [um/Pixel]= 126.728 [um], lens UPLFLN 40X O NA:1.30, colorante LCB.

Con el colorante Hoechst (Sigma-Aldrich), se pudieron visualizar los núcleos (figura 7a) de los granulocitos de *G. mellonella*, debido a que este colorante se fija al ADN. Los granulocitos se encontraban formando un nódulo (figura 7b). En las figuras 7b y 7d se empleó la técnica DIC, que permitió observar las células completas como complemento a la tinción con Hoetch (figuras 7b y 7d).

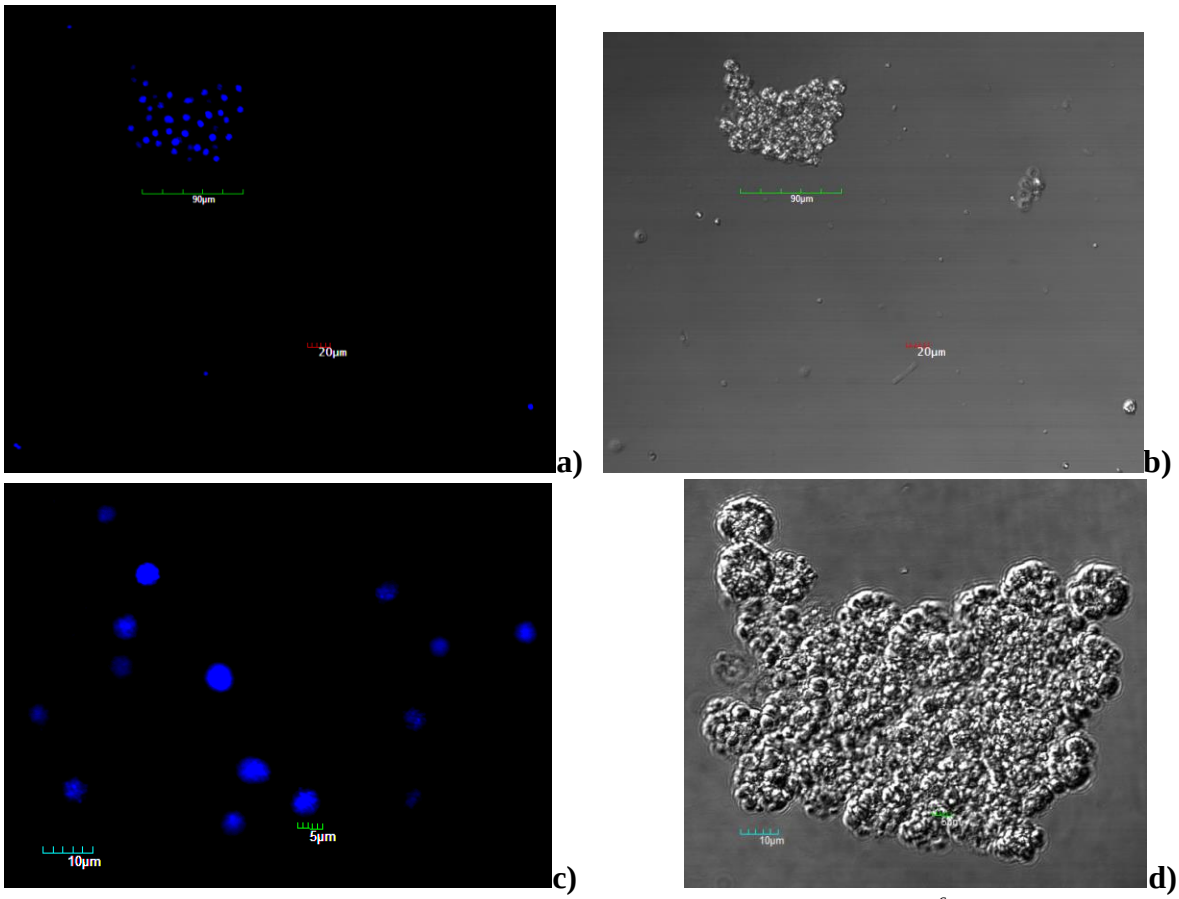
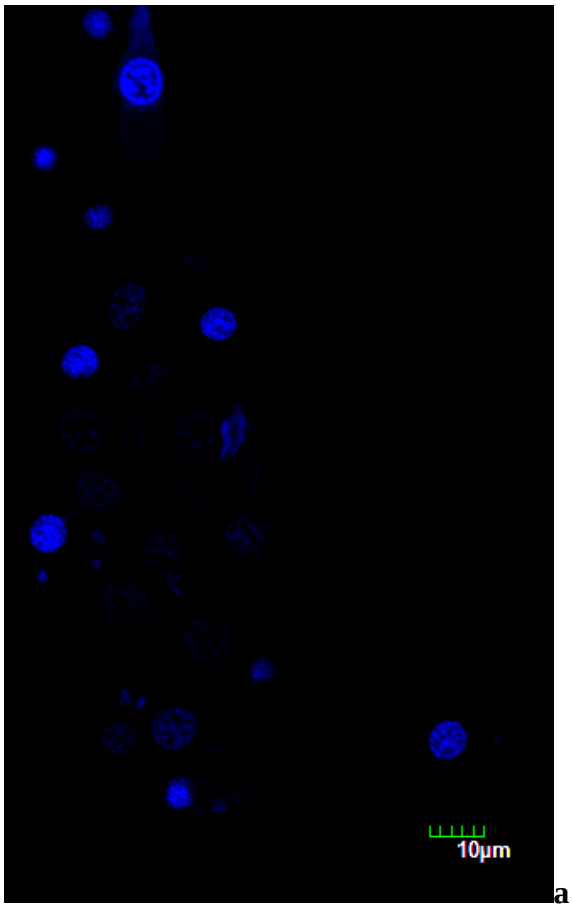
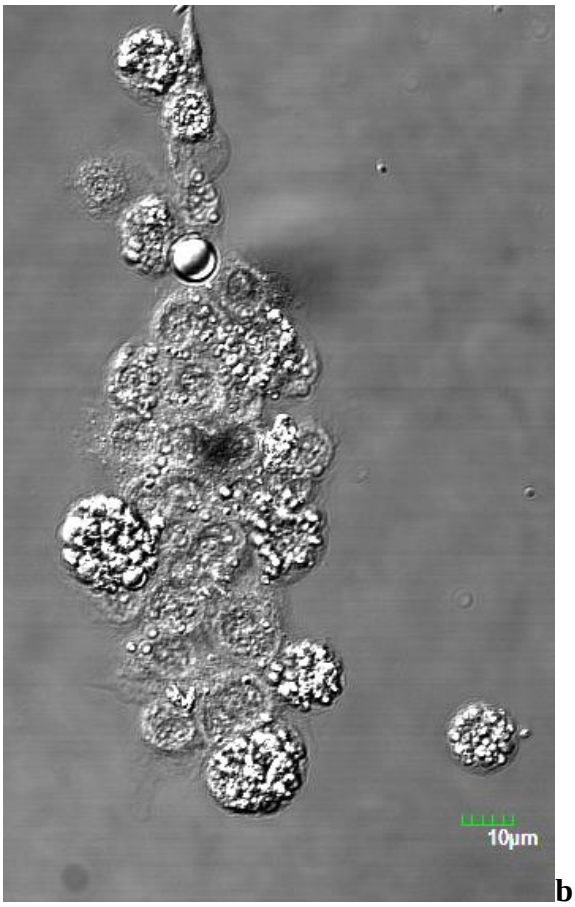


Figura 7. Aspecto de hemocitos de *G. mellonella.* Hemocitos de larvas retadas con 10^6 microconidias/mL de *F. oxysporum* e incubadas a 37°C: 024, 0.0 - 635.283 [um], 0.621 [um/Pixel]; Objective Lens" UPLSAPO 10X 2 NA:0.40; **(a)** núcleos de granulocitos coloreados con Hoetch; **(b)** Granulocitos por DIC (Nomarski); **(c)** núcleos teñidos con Hoetch; **(d)** granulocitos por DIC (Nomarski) 1024, 0.0 - 211.761 [um], 0.207 [um/Pixel] 60X O NA:1.42

Cuando se observaron las preparaciones de hemocitos provenientes de hemolinfa de larvas retadas con 10^4 microconidias/mL de *F. oxysporum*, se visualizaron los núcleos de hemocitos con el colorante Hoetch (figura 8a), aquí también los granulocitos y adipocitos se encontraban formando un nódulo como se aprecia en la figura 8b con la técnica de Nomarski.



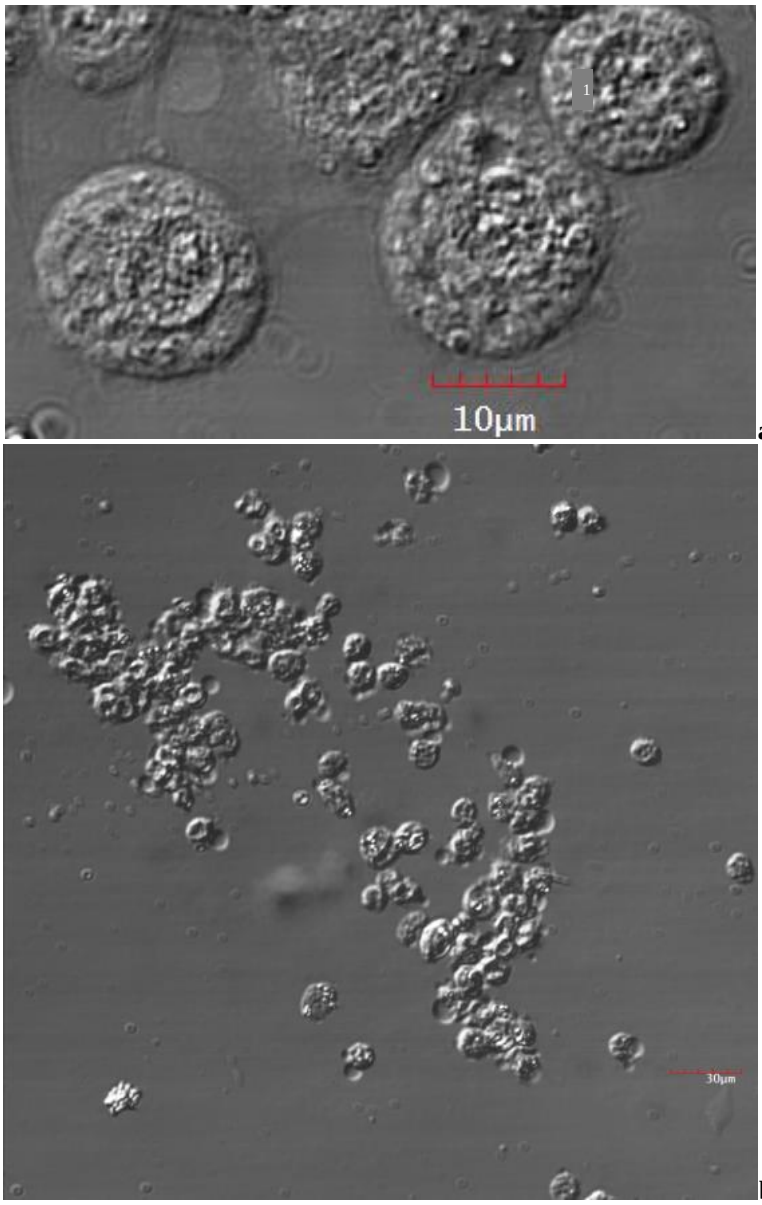
a



b

Figura 8. Células de larvas de *G. mellonella.* Aspecto de los hemocitos provenientes de la infección con 10^4 microconidias/mL de *F. oxysporum:* 1024, 0.0 - 317.13 [um], 0.31 [um/Pixel]; 40X O NA:1.30; (a) núcleos de granulocitos coloreados con Hoetch; (b) adipohemocitos y granulocitos por DIC (Nomarski)

En las figuras 9a y 9b se logró observar la presencia de esferulocitos con un buen número de pequeñas inclusiones esféricas, estas células provenían de hemolinfa de larvas infectadas con 10^4 microconidias/mL de *F. oxysporum*, e incubadas a 25°C.



a)

b)

Figura 9. Hemocitos de larvas de *G. mellonella.* Aspecto de los hemocitos (esferulocitos provenientes de la infección de larvas de *G. mellonella* retadas con 10^4 microconidias/mL de *F. oxysporum*, e incubadas a 25°C: **(a)** 1024, 0.0 - 158.565 [um], 0.155 [um/Pixel]; 40X O NA:1.30; **(b)** 1024, 0.0 - 317.13 [um], 0.31 [um/Pixel]; 10X 2 NA:0.40", colorante LCB.

4. DISCUSIÓN

Se seleccionaron las observaciones que presentaron mayor definición óptica, independientemente del colorante empleado, dado que con los dos colorantes, se obtuvo buen contraste y definición. Tanto el LCB como el RA carecen de fenol, lo cual constituye una ventaja añadida de éstos colorantes, pues su baja toxicidad es segura tanto para la muestra como para el experimentador, además son inodoros, proporcionan una excelente

rehidratación, producen tinción delicada y son fáciles de aplicar (Sime *et al.*, 2002; González *et al.*, 2011).

Para la observación de las microconidias del hongo se empleó lacto-azul de algodón (LCB), el cual es un colorante ácido que tiñe el citoplasma y la quitina presente en las células fúngicas, el ácido láctico preserva las estructuras fúngicas; gracias al gran contraste que produce este colorante, se pudo apreciar la estructura interna de las microconidias. En todos los casos, las muestras que se montaron con LCB mostraron rehidratación adecuada de las microconidias, el grado de la coloración alcanzada en este medio permitió la tinción sutil de las estructuras hialinas de las microconidas. El LCB también produjo buen contraste en los hemocitos y resultó un medio inocuo para las células, pues el ácido láctico mantiene el pH cercano a 7.0 y el glicerol actúa como protector del tejido, cualidad muy importante de este colorante pues las lámparas láser pueden desecar rápidamente las muestras. (Sime *et al.*, 2002). El RA tiñó el citoplasma celular permitiendo un buen contraste en los diferentes tipos de células estudiadas, obteniéndose una tinción diferencial (González *et al.*, 2011).

4.1 Observación antes de la infección

En los insectos, no hay vasos sanguíneos. La sangre y el líquido intersticial no se distinguen y se denomina hemolinfa la cual baña todos los tejidos, órganos y hemocitos internos, y facilita el transporte de nutrientes, productos de desecho y metabolitos. El tipo más común de hemocitos circulantes en la hemolinfa de los lepidópteros y díptero, son los granulocitos y plasmatocitos (Lavine y Strand, 2002; Kanost *et al.*, 2004). Sin embargo, los tipos de hemocitos no son comunes en todas las especies de insectos (Lavine y Strand 2002, Meister y Lagueux, 2003; Lamprou *et al*., 2007), ni necesariamente, tienen similitudes funcionales entre las diferentes especies de insectos (Tsakas & Marmaras, 2010). Los estudios muestran que en las lepidópteras la expresión de AMP varía entre varios tipos de hemocitos, entre los que se destacan los granulocitos y plasmatocitos (Lavine *et al*., 2005). Nosotros encontramos granulocitos presentes en la hemolinfa de larvas sin reto fúngico en cantidad moderada y su cantidad se vio incrementada cuando se presentó algún tipo de reto inmunológico.

4.2 Observación de hemocitos al inicio de la infección

Los grandes hemocitos granulares de *G. mellonella* presenta el mayor nivel de fagocitosis de agentes externos, como lo demuestra el trabajo de García-García, 2009, por lo cual la cantidad de microconidias disminuyó a causa de la rápida acción de los granulocitos. Nosotros observamos que una vez se infectaron las larvas con las microconidias del hongo (10^4) e incubadas a 25°C), y pasadas dos horas, se logró detectar la presencia tanto de microconidias en los alrededores de los granulocitos, pero cuando las condiciones de temperatura y concentración variaron a 37°C y 10^6 microconidias/mL, se pudo ver que aumentó la cantidad de granulocitos y además aparecieron plasmatocitos y algunos esferulocitos. Cabe anotar, que a pesar de que nos es posible observar conidias, debido a la presencia en mayor proporción de células fagocitarias (granulocitos y plasmatocitos), la respuesta celular de *G. mellonella* es diferente, tanto en cantidad como en diversidad de hemocitos cuando aumenta la temperatura y la concentración de microconidias del hongo.

4.3 Observación a las 24 horas post-infección

La gran cantidad de lípidos que se observó pasadas 24 después de la infección con microconidias, puede estar asociada a la presencia en gran producción de proteínas tipo apolipoforina implicada tanto en el transporte de lípidos como en la defensa inmune (capitulo 6). Los granulocitos fueron las células más abundantes; presentaron forma esférica, ovalada o alargada donde se observan inclusiones como las mencionadas por Caselin *et al.* (2008), las cuales está compuestas por mucopolisácaridos y glicoproteínas. Lackie (1988) señala que la morfología de estas células puede estar relacionada con su estado de actividad. Los granulocitos en insectos se han relacionado con funciones de respuesta inmune celular como el encapsulado, además del transporte de nutrientes (Gillespie *et al*., 1997; Lavine & Strand, 2002) y en que son precursores de otros tipos de hemocitos, como describe Caselin *et al*. (2008). Nosotros pudimos observar que los granulocitos se encontraban formando un nódulo, el cual es una estructura típica de reacción inmunológica contra la inyección de 10^6 microconidias/mL de *F. oxysporum*.

Nosotros observamos plasmatocitos como los descritos por Caselin *et al.* (2008) y Staurengo Da Cuhna *et al.* (1976), los cuales son menos abundantes que los granulocitos, son de forma alargada, fusiforme o esférica irregular o con prolongaciones citoplasmáticas, con citoplasma poco denso, con granulaciones mucho menos abundantes que en los granulocitos, se observaron además vacuolas citoplasmáticas de tamaño variable, cuya presencia coincide con lo observado en plasmatocitos de otro insectos de diferentes especies (Azambuja *et al*., 1991). En los insectos, los plasmatocitos realizan funciones de fagocitosis, encapsulado, nodulación y restauración de heridas y están considerados como formas de transición entre los prohemocitos y los granulocitos (Caselin *et al.*, 2008).

También pudimos observar adipositos como los encontrados por Staurengo Da Cuhna *et al.* (1976), en cantidad que aumentó proporcionalmente después de la infección con las dos concentraciones de microconidias, tanto a 25 como a 37°C. Solo logramos observar pocos esferulocitos con un buen número de pequeñas inclusiones esféricas, tal como describen Staurengo Da Cuhna *et al*. 1(976) quienes distinguieron células esféricas, sin núcleo visibles.

5. CONCLUSIONES

Se lograron realizar observaciones de gran calidad en el microscopio láser confocal, empleando los colorantes LCB y RA, de bajo costo y poco tóxicos, que proporcionaron buen contraste y definición tanto para las microconidias de *F. oxysporum*, como para los hemocitos de larvas de *G. mellonella.* Se logró identificar cuatro tipos de hemocitos provenientes de la hemolinfa de larvas de G. mellonella frente al reto fúngico, los cuales fueron granulocitos, plasmatocitos, esferulocitos y adipositos. También se observó que a medida que se aumentó la temperatura y la concentración de microconidias /mL, la respuesta celular de las larvas fue mayor y más veloz, produciéndose gran cantidad de hemocitos diferenciados. La respuesta celular de larvas de *G. mellonella* es eficiente, fagocitando la mayor parte de las microconidias de *F. oxysporum*, lo que se evidencia en la gran cantidad de larvas que sobreviven a la infección fúngica.

6. BIBLIOGRAFÍA

Azambuja P, García ES, Ratcliffe NA. Aspects of classification of Hemiptera hemocytes from six triatomine species. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Río de Janeiro. 1991;86:1-10.

Barnett HL, Hunter BB. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. APS Press, St. Paul, Minnesota. 1998.

Brehelin M, Zachary D. Insect haemocytes, a new classification to rule out controversy. In *Immunity in Invertebrates* (M. Brehelin, Ed.). 1986;36–48. Springer Verlag, Berlin.

Carrillo L. Los hongos de los alimentos y forrajes. Capitulo 6. Fusarium. © Universidad Nacional de Salta. 2003;1-126.

Caselín-Castro S, Llanderal-Cázares C, Ramírez-Cruz A, Soto Hernández M, Méndez-Montiel JT. Morphological caraterization of hemocytes from female *Dactylopius coccus* Costa (Hemiptera: Coccoidea: Dactylopiidae). Agrociencia. 2008;42:349-355.

Coleman JJ, Muhammed M, Kasperkovitz PV, Vyas JM, Mylonakis E. *Fusarium* pathogenesis investigated using *Galleria mellonella* as a heterologous host. Fungal Biol. 2011;115(12):1279–1289.

Cytryska M, Mak P, Zdybicka-Barabas Z, Suder P, Jakubowicz T. Purification and characterization of eight peptides from *Galleria mellonella* immune hemolymph. Peptides. 2007;28:533-546.

Davidovits Egger MD. Photomicrography of Corneal Endothelial Cells in vivo. Nature. 1973;244:366-367.

Egger MD, Petran M. New Reflected-Light Microscope for Viewing Unstained Brain and Ganglion Cells. Science. 1967;157:305-307.

Evans CJ, Hartenstein V, Banerjee U. Thicker than blood: Conserved mechanisms in *Drosophila* and vertebrate hematopoiesis. Dev. Cell. 2003;5:673–690.

Fuchs BB, O'Brien E, El Khoury JB, Mylonakis E. Methods for using Galleria mellonella as a model host to study fungal pathogenesis. Virulence. 2010;1(6):475–482.

Garcés de Granada E, Orozco de Amézquita M, Bautista GR, Valencia H. *Fusarium oxysporum* El hongo que nos falta conocer, Acta Biol. Colomb. 2001;6:7-26.

García-García E, García-García PL, Rosales C. An FMLP receptor is involved in activation of phagocytosis by hemocytes from specific insect species. Dev. Comp. Immunol. 2009;33:728–739.

Gillespie JP, Kanost MR, Trenczek T. Biological mediators of insect immunity. A. Rev. Ent. 1997;42:611–643.

González MS, Diamont D, Gutiérrez B. Técnica de tinción de estructuras fúngicas con colorants vegetates como una alternative no contaminante. Bioagro. 2011;23(1):65-68.

Gupta AP. Studies of the biood of *Meloidae* (Coleóptera) I. The haemocytes of *Epicauta cinérea* Froster, and a synonymy of haemocyte terminologies. Cytologia. 1969;34(2):300-344.

Jones JC. Current concepts concerning insect hemocytes. Am. Zool. 1962;2:209–246.

Kanost MR, Jiang H, Yu XQ. Innate immune responses of a lepidopteran insect, Manduca sexta. Immunol Rev. 2004;198:97–105.

Kavanagh K, Reeves EP. Exploiting the potential of insects for in vivo pathogenicity testing of microbial pathogens. FEMS Microbiol. Rev. 2004;28(1):101–112.

Lackie AM. Haemocyte behaviour. Adv. Insect Physiol. 1988;21:85–178.

Lamprou I, Mamali I, Dallas K, Fertakis V, Lampropoulou M, Marmaras VJ. Distinct signalling pathways promote phagocytosis of bacteria, latex beads and lipopolysaccharide in medfly haemocytes. Immunology. 2007;121:314-327.

Lapointe JF, Dunphy GB and Mandato GA. Hemocyte–hemocyte adhesion and nodulation reactions of the greater wax moth, Galleria mellonella are influenced by cholera toxin and its B-subunit. Results Immunol. 2012;2:54–65.

Lavine MD, Chen G, Strand MR. Immune challenge differentially affects transcript abundance of three antimicrobial peptides in hemocytes from the moth *Pseudoplusia includens*. Insect Biochem. Mol. Biol. 2005;35:1335–1346.

Lavine MD, Strand MR. Insect hemocytes and their role in immunity. Insect Biochem. Mol. Biol. 2002;32:1295–1309.

Lodish H, Baltimore D, Berck A, Zipursky SL, Matsudaira P, Darnell J. Biologie moléculaire de la cellule. 1ª Edition, De Boeck Université s.a. 1997;156.

Meister M, Lagueux M. *Drosophila* blood cells. Cell. Microbiol. 2003;(5):573-580.

Minsky M. Memoir on Inventing the Confocal Scanning Microscopy. Scanning. 1988;10:128-138.

Mowlds P, Kavanagh K. Effect of pre-incubation temperature on susceptibility of *Galleria mellonella* to infection by *Candida albicans*. Mycopathologia. 2008;165:5-12.

Nucci M, Anaissie E. *Fusarium* infections in immunocompromised patients. Clin. Microbiol. Rev. 2007;20(4):695–704.

Paddock SW. (ed.). Confocal Microscopy: Methods and Protocols, Totowa, New Jersey: Humana Press1. 999**.**

Ploeger LS, Dullens HFJ, Huisman A, van Dies PJ. Fluorescent stains for quantification of DNA by confocal laser scanning microscopy in 3-D. Biotech. Histochem. 2008;83:1-7.

Renwick J, Daly P, Reeves EP, Kavanagh K. Susceptibility of larvae of *Galleria mellonella* to infection by *Aspergillus fumigatus* is dependent upon stage of conidial germination. Mycopathologia. 2006;161:377–384.

Ribeiro C, Brehelin M. Insect haemocytes: what type of cell is that? J. Insect Physiol. 2006;52:417-429.

Sime AD, Abbott LL, Abbott SP. Un medio de montaje para su uso en los análisis de esporas trampa de calidad de aire interior. Mycologia. 2002;94(6):1087-1088.

Solidade-Ribeiro LM, Wanderley-Teixeira V, Magliano da Cunha F, Coelho-Teixeira AA and Abreu de Siqueira HA. Immunological response of resistant and susceptible *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) to *Bacillus thuringiensis.* Rev. Colomb. Entomol. 2012;38(2):208-214.

Staurengo da Cunha MA, Alves da Cunha R, da Cruz Landim C. Hemocitos presents na hemolinfa de Polystes versicolor (Hym., Vespidae). Rev. Per. Entom. 1976;19:39-42.

Strand M. Insect Hemocytes and Their Role in Immunity. In: Beckage N. Ed. Insect Immunology. Academia Press. 2008;41.

Stuart L.M, Ezekowitz RAB. Phagocytosis: Elegant Complexity. Immunity. 2005;(22):539-550.

Tsakas S, Marmaras VJ. Insect immunity and its signalling: an overview. Invertebrate Surviv. J. 2010;7:228-238.

Wojda I, Jakubowicz T. Humoral immune response upon mild heat-shock conditions in *Galleria mellonella* larvae. J. Insect Physiol. 2007;53:1134–1114.

CONTENIDO

DESARROLLO DE PROTEÓMICA CUANTITATIVA USANDO ITRAQ BASADA EN LA RESPUESTA INMUNOLÓGICA DE LARVAS DE *GALLERIA MELLONELLA* DESAFIADAS CON *FUSARIUM OXYSPORUM* 144

RESUMEN 144

1. INTRODUCCIÓN 145

1.1 La proteómica 145

1.2 Tecnología iTRAQ: etiquetas isobáricas para cuantificación absoluta y relativa (*Isobaric Tag Relative and Absolute Quantification*) 146

1.3 Expresión de proteínas de hemolinfa de larvas de *G .mellonella* retadas con *F. oxysporum* 147

1.4 Proteínas de *F. oxysporum* identificadas por iTRAQ en el modelo huésped patógeno *G. mellonela-F. oxysporum*, con estimulo con *L. plantarum.* 148

2. MATERIALES Y MÉTODOS 149

2.1 Cuantificación de proteínas y preparación de las muestras 150

2.2 Identificación y caracterización de péptidos y proteínas por medio del etiquetado isobárico para cuantificación relativa y absoluta de proteínas: iTRAQ 150

2.3 Espectrometría de masas triple TOF 150

2.4 Estadística y análisis bioinformáticos 151

2.5 Estructura secundaria y terciaria de las proteínas seleccionadas 151

2.6 Análisis bioinformático para *F. oxysporum* y *L. plantarum* 152

3. RESULTADOS 152

3.1 Identificación de proteínas dentro de la hemolinfa de las larvas infectadas con el hongo 152

3.2 Expresión de proteínas en la hemolinfa de las larvas desafiadas 153

3.3 Análisis bioinformático y ontología de genes de proteínas de lepidóptera 157

3.4 Estructura hipotética de proteínas no identificadas de *G. mellonella* 159

3.5 Identificación de proteínas de *F. oxysporum* 164

3.5.1 Proteínas de *L. plantarum* 167

3.5.2 Respuesta de proteínas de *G. mellonella* en canales 119 y 121 168

4. DISCUSIÓN 170

4.1 Modelo inmunológico y rendimiento iTRAQ 170

4.2 Expresión de proteínas inducida por el ataque de hongos 170

4.3 Expresión en la respuesta inmune y la estructura de dos reconocidas proteínas ortólogas 175

4.4. PROTEÍNAS DE *F. OXYSPORUM* 176

5. CONCLUSIONES 178

6. BIBLIOGRAFÍA 178
ANEXO 1.....186
ANEXO 2.....188

DESARROLLO DE PROTEÓMICA CUANTITATIVA USANDO ITRAQ BASADA EN LA RESPUESTA INMUNOLÓGICA DE LARVAS DE *Galleria mellonella* DESAFIADAS CON *Fusarium oxysporum*

RESUMEN

Galleria mellonella se ha convertido en un modelo invertebrado potencial para examinar la inmunidad innata. Las larvas son fáciles de manejar en los ensayos de huésped-patógeno. En el presente trabajo llevamos a cabo la investigación proteómica para entender la respuesta inmune en un huésped heterólogo cuando es desafiado con microconidias de *Fusarium oxysporum*. El objetivo de este estudio fue investigar las proteínas de la hemolinfa que son expresadas diferencialmente entre los conjuntos de control y las larvas retadas con *F. oxysporum* a dos temperaturas. El enfoque iTRAQ permitió observar los efectos de los retos inmunes de una manera clara y robusta, identificando 63 proteínas de *G. mellonella* y *F. oxysporum*, 17 de ellas probablemente involucradas en la respuesta inmune. Los cambios en la expresión de proteínas fueron estadísticamente significativos, especialmente cuando se aumentó la temperatura con 10^4 o 10^6 microconidias/mL de *F. oxysporum.* Algunas proteínas fueron sobre-expresadas a partir del desafío inmunológico con microconidias del hongo cuando la temperatura cambió desde 25 hasta 37°C. Tras el análisis de las proteínas identificadas por bioinformática y meta-análisis, los resultados revelaron que estaban involucradas en el transporte, la respuesta inmune, en el almacenamiento, en óxido-reducción y catabolismo, de las cuales 20 eran de *G. mellonella*, 20 más pertenecían a otras especies de lepidópteros y 19 se encontraban repartidas en bacterias, protistas, especies de hongos y animales. Entre estas, se examinaron 13 proteínas y 2 péptidos para su expresión inmune, y las estructuras 3D hipotéticas de 2 proteínas bien conocidas, no anotadas para *G. mellonella*, actina y CRABP, se resolvieron utilizando péptidos emparejados con *Bombyx mori* y *Danaus plexippus*, respectivamente. La conclusión principal de este estudio fue que la herramienta iTRAQ constituye un método consistente para detectar proteínas asociadas con el sistema inmune innato de *G. mellonella* en respuesta a la infección causada por *F. oxysporum*. Además, iTRAQ fue un enfoque proteómico cuantitativo fiable para detectar y cuantificar los niveles de expresión de proteínas y péptidos del sistema inmune, en particular, se encontró que con 10^4 microconidias/mL a 37°C se sobre-expresaron muchas más proteínas que con los otros tratamientos. La técnica de iTRAQ permitió caracterizar más 20 proteínas de *G. mellonella* y 1 de *F. oxysporum*, y se logró estudiar en varias de ellas, su regulación bajo condiciones de estrés, su actividad en el sistema inmune e inferir su estructura.

Palabras claves: iTRAQ, análisis bioinformático, expresión de proteínas, proteomica, espetrometría de masas, triple TOF.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 La proteómica

Proteómica, término acuñado por Marc Wilkins en 1994 (Wilkins *et al.,* 1996) para referirse simplemente al "complemento de proteínas de un genoma" ("PROTein complement of a genOME"). La proteómica se ha convertido en algo más que un apéndice de la genómica o de un enfoque experimental de una disciplina científica compleja para abordar el estudio del proteoma celular. En el sentido más amplio, el proteoma puede ser definido como el conjunto total de especies de proteínas presentes en una unidad biológica (organela, célula, tejido, órgano, individuo, especies, ecosistemas) en cualquier etapa de desarrollo y bajo condiciones ambientales específicas. Mediante el uso de la proteómica se pretende conocer cómo, dónde, cuándo y para qué son los diversos cientos de miles de especies de proteínas individuales producidas en un organismo vivo, y cómo interactúan entre sí y con otras moléculas para construir el edificio celular, y entender cómo funcionan entre sí para adaptarse, para programar crecimiento y desarrollo, y para interactuar con su biótica y el medio ambiente abiótico (González-Fernández, *et al.*, 2010).

En los últimos diez años, han aparecido excelentes revisiones y monografías sobre los fundamentos, conceptos, aplicaciones, el poder y las limitaciones de la proteómica, algunas de ellas relacionadas con hongos patógenos (Tan *et al.,* 2009). En el caso de hongos, se puede también definir una nueva área: la secretómica (el secretoma se define como la combinación de proteínas nativas y la maquinaria celular que participa en su secreción), ya que muchos hongos secretan un gran número de proteínas para acomodar su estilo de vida saprotrofitico, lo que sería el caso de las proteínas implicadas en la adhesión a la superficie de la planta, la penetración de los tejidos del huésped y efectores de invasión y otros factores de virulencia (Dodds *et al.,* 2009; Houterman *et al.,* 2008).

En insectos, la comprensión de la función de su sistema inmunológico ha avanzado con el advenimiento de la tecnología que permite estudiar los mecanismos involucrados a nivel celular o molecular, empleando técnicas de transcriptómica y proteómica como lo evidencian entre otras, las investigaciones de Duncan *et al.* (2012), en *Aedes aegypti* y de Contreras *et al*., (2013), *en Tribolium castaneum.*

La proteómica se renueva constantemente para responder a la cuestión de la función de las proteínas expresadas en un organismo vivo. En los últimos diez años, ha habido una explosión de nuevos protocolos y plataformas con continuas mejoras realizadas en todas las etapas de flujo de trabajo, a partir del laboratorio (tejido y fraccionamiento de la célula, la extracción de proteína, agotamiento, la purificación, separación, análisis MS) y terminando en la computadora (algoritmos para la identificación de proteínas y las herramientas bioinformáticas para el análisis de datos y bases de datos). A pesar de los logros tecnológicos en la proteómica, sólo una pequeña fracción del proteoma celular se ha caracterizado hasta ahora, y sólo para unos pocos sistemas biológicos (humanos, mosca de la fruta, *Arabidopsis*, arroz). Incluso para estos organismos, la función de un gran número de proteínas sigue siendo investigada. Las técnicas de proteómica tienen un número de limitaciones, como la sensibilidad, resolución y velocidad de captura de datos. También se

enfrenta a una serie de desafíos, como por ejemplo, en lo más profundo de la cobertura del proteoma, la proteómica de organismos no secuenciados llamados organismos "huérfanos", proteómica top-down (Han *et al.*, 2006), cuantificación de proteínas, e interactómica. La mayoría de estas limitaciones y desafíos reflejan la dificultad de trabajar con la diversidad biológica de las proteínas y su gama de propiedades fisicoquímicas. Un buen ejemplo es el patosistema *F. oxysporum*-tomate, en el cual fue identificado y secuenciado el primer efector de raíz de hongos invasores, en este caso por espectrometría de masas (MS), el Six1, correspondiente a una proteína de 12 kDa rica en cisteina. Otros efectores adicionales de la proteína han sido caracterizados en diferentes hongos (González-Fernández, *et al.*, 2010).

1.2 Tecnología iTRAQ: etiquetas isobáricas para cuantificación absoluta y relativa (*Isobaric Tag Relative and Absolute Quantification*)

En la década del 2000 se desarrolló la tecnología iTRAQ aplicada a la identificación multidimensional de proteínas (MudPIT), enfoque en el que las proteínas están fragmentadas con tripsina u otra enzima proteolítica y posteriormente son químicamente marcadas con etiquetas isobáricas. Esta plataforma se convirtió en el centro de la tecnología en la investigación proteómica moderna, siendo ampliamente utilizada en todas las áreas de investigación, A pesar de que este enfoque parece ser sencillo, muchos aspectos de la plataforma proteómica puede añadir fuentes de variabilidad, y en los límites de la confianza en la salida de la identificación de proteínas y la cuantificación (Owiti *et al*., 2011; Pottiez *et al*., 2012).

La estrategia proteómica de multiplexados de alto rendimiento proporcionan una visión integrada y más amplia de las redes y vías biológicas regulatorias (Kingsmore, 2006). La actividad de las proteínas es una tarea crucial que depende de las interacciones y modificaciones de las proteínas sinérgicas y antagónicas (Kingsmore, 2006). iTRAQ es adecuado para los estudios moleculares de exploración de los mecanismos patogénicos y la fisiopatología de las enfermedades (Thongboonkerd, 2007).

El método iTRAQ es una tecnología que utiliza un reactivo isobárico multiplexado químicamente marcado que permite la multiplexación de dos a ocho muestras de proteínas y produce idénticos MS/MS de iones de secuenciación para todas las ocho versiones del mismo péptido tríptico derivatizado. Esto facilita en gran medida la identificación de péptidos debido a las intensidades de la matriz y los fragmentos de iones superiores resultantes. La cuantificación se logra mediante la comparación de las áreas de los picos y las relaciones pico resultantes, ya sea para cuatro MS/MS iones reportero, que van desde 114 hasta 117 Da, u ocho MS/MS de iones reportero, que van desde 113 hasta 119 y 121 Da, el análisis de espectrometría de masas se lleva a cabo en un espectrómetro de masas AB Sciex 5600 Triple Tof con el software de cuantificación Proteín-Pilot (Wu, 2006).

iTRAQ es una alternativa para el análisis de proteínas en una forma global. La cuantificación basada en iTRAQ es un atractivo método de proteómica de gran alcance que proporciona una mayor cobertura que otras estrategias, que permite la dentificación y

cuantificación sistemática de proteínas expresadas en un sistema biológico (Wu, 2006; Pottiez *et al.*, 2012; Conteras *et al.*, 2013).
La tecnología iTRAQ es adecuada para muestras con alta complejidad y alto alcance dinámico de concentraciones de proteína, tales como fluidos corporales (suero, plasma, líquido cefalorraquídeo, etc.), se puede utilizar después de la transformación de cualquier muestra, por ejemplo, lisado de células y proteínas obtenidas a partir de orgánulos. El software para la identificación de proteínas y la cuantificación se encuentra bastante desarrollado y probado en numerosos entornos experimentales (Pottiez *et al.*, 2012). Los enfoques estándar para la proteómica, han sido electroforesis bidimensional en gel o cromatografía líquida (LC), seguida por espectrometría de masas. Para los métodos basados en gel, las proteínas se separan por punto isoeléctrico (PI) y/o pesos moleculares, detectando por tinción, y cuantificado de acuerdo a las intensidades de tinción. Las proteínas se cortan a continuación del gel, luego son digeridas, e identificadas por espectrometría de masas. Para los métodos basados en cromatografía líquida, las proteínas o péptidos se separan por columnas LC y, a continuación, son detectadas, identificadas, y se cuantifican por espectrometría de masas. El objetivo de las primeras investigaciones de proteómica fue simplemente la identificación y caracterización de proteínas. El objetivo se ha extendido a estudios cuantitativos y comparativos, gracias a los recientes avances en la cromatografía, la espectrometría de masas, y la bioinformática (Wu, 2006).

Un objetivo común de los estudios de proteómica utilizando la espectrometría de masas (MS) es la identificación de las proteínas que se incrementan o disminuyen únicamente, por ejemplo, en la enfermedad o en procesos infecciosos. La tecnología iTRAQ proporciona una vía para la cuantificación relativa de proteínas a partir de muestras múltiples (hasta ocho) dentro de un solo análisis MS. La aplicación exitosa de la tecnología iTRAQ y MS, requiere una caracterización exhaustiva de las limitaciones específicas de análisis para la detección y la cuantificación precisa de la abundancia relativa de proteínas dentro de muestras para la cuantificación relativa y absoluta (iTRAQ), tiene puntos fuertes y limitaciones que han sido experimentalmente comparadas (Gan *et al*., 2007; Ferreira de Oliveira & de Graaff, 2011; Pottiez *et al.*, 2012).

1.3 Expresión de proteínas de hemolinfa de larvas de *G. mellonella* retadas con *F. oxysporum*

Las larvas de *G. mellonella* ofrecen ventajas considerables como modelo de infección y virulencia porque son simples de manejar y pueden ser obtenidas en gran cantidad y bajo costo (Bender *et al.*, 2013). Lo más importante, y a diferencia de muchos otros modelos de invertebrados, los experimentos se pueden realizar a 37°C, una temperatura óptima para la gran mayoría de los patógenos humanos (Chamilos *et al*., 2007). Las ventajas de este modelo también se basan en que la respuesta inmune innata de las larvas de *G. mellonella*, comparte un alto grado de homología con la de mamíferos (Champion *et al*., 2009).

Además, *G. mellonella* ha sido ampliamente utilizado como un huésped heterólogo para varios hongos patógenos, incluyendo *Candida albicans* (Brennan *et al*., 2002), *Cryptococcus neoformans* (Fuchs *et al*., 2010) y *Aspergillus fumigatus* (Jackson *et al*., 2009; Slater *et al*., 2011). Una correlación positiva se ha observado en la patogenicidad

utilizando estas levaduras u hongos ya que este modelo insecto es comparable a los modelos de mamíferos (Mylonakis *et al*., 2005). Por lo tanto, es incuestionable que *G. mellonella* debería emerger como un modelo de defensa del huésped frente a la infección por hongos (Fuchs *et al*., 2010), dado que los hemocitos en la hemolinfa producen una explosión oxidativa robusta, que funciona de manera similar a las células fagocíticas de mamífero, en respuesta a las infecciones bacterianas (Bergin *et al*., 2005). Esta característica, entre otros aspectos conservados del proceso anti-microbiano, podría explicar la correlación positiva entre los datos obtenidos de *G. mellonella* y las infecciones en ratones (Jander *et al*., 2000) con patógenos procariotas o eucariotas. *G. mellonella* emerge como un modelo que ha sido aplicado con éxito para evaluar la virulencia en una variedad de bacterias, incluyendo el complejo *Burkholderia cepacia* (Seed & Dennis, 2008) *Enterococcus faecium* (Lebreton *et al*., 20119), *Francisella tularensis* (Aperis *et al*., 2007), *Legionella pneumophila* (Harding *et al*., 2012), *Listeria monocytogenes* (Mukherjee *et al*., 2010), *Pseudomona aeruginosa* ((Jander *et al*., 2000; Miyata *et al*., 2003) y diversas corinebacterias (Ott *et al*., 2012). Además, se ha utilizado en la evaluación de algunos en virus, tales como baculovirus (Fraser *et al*., 1983) y parvovirus (Simpson *et al*., 1998).

F. oxysporum es un patógeno trans-reino y es bien conocido por la producción de metabolitos secundarios dañinos, llamados micotoxinas, que causan varias enfermedades en los seres humanos, animales, insectos, y plantas (Navarro-Velasco *et al*., 2011; Coleman *et al*., 2011). Este hongo filamentoso es el agente causal de la marchitez vascular, que afecta a una amplia gama de especies vegetales, pero que también puede producir infecciones diseminadas en los seres humanos y los ratones inmunodeprimidos. Las especies de *Fusarium* son un modelo ideal para un análisis comparativo de la virulencia fúngica en huéspedes vegetales y animales, ya que son capaces de manifestar una multitud de infecciones clínicas (Navarro-Velasco *et al*., 2011). Pocos estudios se han desarrollado para utilizar las larvas de *G. mellonella* como huésped heterólogo para la fusariosis. *G. mellonella* es capaz de resistir altas concentraciones de microconidias de *F. oxysporum*. La inyección de conidios del hongo provenientes de aislamientos clínicos o ambientales, en el hemocoel de larvas de éste lepidóptero, pueden causar la muerte de las mismas (Coleman *et al*., 2011).

En cuanto a la respuesta inmune de los insectos contra infecciones causadas por hongos, la hemolinfa de insectos juega un papel crítico, actuando como medio de transporte de células, proteínas y péptidos, oxígeno, hormonas, nutrientes y metabolitos asociados con el sistema inmune (Lehane, 2005; Lesch, 2007). Los estudios inmunológicos de insectos representan un importante desafío para entender los mecanismos moleculares de la respuesta inmune innata en el reino animal. Además, el sistema inmune innato es bien conocido como la principal defensa contra el ataque de patógenos o de competidores, ya que se encuentra muy extendido en todos los reinos de la vida (Schmidt *et al*., 2008).

1.4 Proteínas de *F. oxysporum* identificadas por iTRAQ en el modelo huésped patógeno *G. mellonela-F. oxysporum*, con estimulo con *L. plantarum*.

La técnica de iTRAQ es una excelente herramienta para identificar proteínas de modelos de interacción compleja, como son las del sistema inmune (ZaK and Andersen, 2009),

interacción huésped-patógeno (Quiblier *et al.*, 2013), de sistemas complejos de microorganismos (Maeda *et al.*, 2014), cáncer (Glen *et al.*, 2008), neuronas (Rudrabhatla *et al.*, 2010) o el estudio de todo el organismo completo de un hongo unicelular tal como *Saccharomyces cerevisiae* (Ross *et al.*, 2004).

Igualmente iTRAQ se ha utilizado para el estudio de hongos más complejos que *S. cerevisiae*, como son *Aspergillus* (Adav *et al.*, 2010) y *Candida* (Prasad *et al.*, 2010) entre otros, y aunque para el caso de *S. cerevisiae* y *C. albicans*, es una herramienta reconocida, podríamos decir son excepcionales, dado que para otros hongos, no es el caso. Sin embargo, iTRAQ aún es una técnica muy reciente para desarrollos de estudios proteómicos más completos de patogénesis en hongos.

Varias proteínas de *F. oxysporum* han sido identificadas como claves en el proceso de interacción de su patogénesis ya sea en virulencia como en infección, como por ejemplo: MAP quinasas, PR-1, Pf1, fga1, cysteine-rich, FOW1, entre muchas otras aún desconocidas. Sin embargo, enmarcar en un solo tipo de proteínas patogénicas a *F. oxysporum*, un patógeno trans-reino no es un objetivo real, dado que muy seguramente las mismas microconidias no secretarán exactamente el mismo tipo de proteínas invadiendo un vertebrado, un insecto o una planta. De otra parte se han utilizado otras organismos adicionales a los involucrados en la relación huésped patógeno, como bacterias lácticas para estimular la reacción inmunológica del sistema inmune del huésped o la reacción de virulencia del patógeno, como en el caso de *Saccharomyces* (Mak *et al*., 2010).

En éste capítulo se presenta la primera investigación que utiliza iTRAQ para detectar proteínas de larvas *G. mellonella* después de una infección con *F. oxysporum*, el principal obstáculo para el desarrollo de un enfoque computacional con iTRAQ es la falta de disponibilidad del genoma de *Galleria*, lo que hace que la identificación de proteínas sea problemática. Nuestra propuesta en este trabajo experimental y de biología computacional, fue aplicar un enfoque alternativo, haciendo coincidir los péptidos y proteínas aisladas por iTRAQ, con las pocas proteínas de *G. mellonella* reportadas en las bases de datos, e incluso con las de lepidóperos afines u otros organismos que han sido reportados previamente en las bases de datos. En este trabajo, hemos implementado un enfoque proteómico basado en iTRAQ para detectar y cuantificar los patrones de expresión de proteínas en hemolinfa de larvas de *G. mellonella* que habían sido retadas con una infección subletal de microconidios de *F. oxysporum*, con el fin de inducir una respuesta del sistema inmune innato. También en éste capítulo se abordó el estudio de las proteínas encontradas de *F. oxysporum* en el modelo huésped-patógeno y el objetivo fue identificar por iTRAQ, las proteínas del hongo que interactúan con la larva para vencer su sistema inmune y causar infectacción. Así mismo se describió el efecto de la batería láctica, *L. plantarum*, utilizada para pre-estimular el sistema inmune innato de *G. mellonella*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Se emplearon las muestras de hemolinfa obtenidas según la metodología descrita en los numerales 2.2.3 y 2.2.4 del Capítulo 3.

2.1 Cuantificación de proteínas y preparación de las muestras

Empleando el método Bradford se determinó la concentración de proteína total de las muestras de hemolinfa libre de hemocitos (tabla 1) (Bradford, 1976; Andrejko, *et al*., 2009).

Tabla 1. Cuantificación de proteínas totales por el método Bradford de los diferentes tratamientos de hemolinfa de larvas de *G. mellonella*, etiquetadas (113-121) para iTRAQ 8-plex

I.D.	Proteína mg/mL	iTRAQ 8-plex	Tratamiento de la hemolinfa
AM100m	2.50	113	Hemolinfa retada con *F. oxysporum* 10^4 microconidias/mL a 25°C
CR102y	2.31	114	Hemolinfa de control de inyección con Tween-80 (0.1% v/v) a 25°C
BT101p	3.46	115	Hemolinfa retada con *F. oxysporum* 10^4 microconidias/mL a 37ºC
FM103x	2.21	116	Hemolinfa de control sin inyección a 25°C
HK104u	2.75	117	Hemolinfa retada con *F. oxysporum* 10^6 microconidias/mL a 37ºC
WH107c	2.18	118	Hemolinfa control de inyección con Tween-80 (0.1% v/v) a 37ºC
RE105a	2.98	119	Hemolinfa inoculada con *L. plantarum* + *F. oxysporum* 10^4 mic/mL a 37ºC
KA106w	2.12	121	Hemolinfa inoculada con *L. plantarum* a 37ºC

2.2 Identificación y caracterización de péptidos y proteínas por medio del etiquetado isobárico para cuantificación relativa y absoluta de proteínas: iTRAQ (*Isobaric Tag Relative and Absolute Quantification*)

Se partió de 100 µg de proteínas de cada una de las muestras de hemolinfa retada y sin retar. Se procesaron las muestras descritas en la tabla 1, empleando el protocolo de Applied Biosystems (iTRAQ 8-plex).

2.3 Espectrometría de masas triple TOF

La reacción química de etiquetado isobárico multiplexado fue elaborada en el laboratorio de proteómica, Yale Cancer Center Mass Spectrometry Resource & W.M. Keck Foundation Biotechnology Resource Laboratory. Los péptidos se separaron en un sistema Waters nanoACQUITY provisto de una columna C18 de 75 µm x 150 mm BEH y se eluyó a 500 nL/min, el análisis de MS se realizó en un espectrómetro de masas AB Sciex 5600, Triple TOF. El iTRAQ permite la multiplexación de 2 a 8 muestras de proteínas y produce iones de secuenciación MS/MS idénticos para todas las versiones del mismo péptido tríptico derivatizado. La cuantificación se logra mediante la comparación de las áreas de los picos y

las proporciones de picos resultantes de los ocho MS/MS iones reportero, que van desde 113 hasta 119 y 121 Da. El análisis espectrométrico de masas se visualizó usando el software Peakview® y se cuantificó con ProteinPilot™ (AB Sciex, MA, EE.UU.).

2.4 Estadística y análisis bioinformáticos

Los datos brutos de LC/MS/MS fueron analizados utilizando el *software* Mascot™, Distiller versión 2.2 (Matrix Science, Reino Unido), para buscar coincidencias con los péptidos de una base de datos de proteínas utilizando el primer parámetro por defecto. El tipo de relación de proteínas se establece para la mediana, el método de normalización era la proporción mediana, sin eliminación de las demás, fue elegido y el umbral del péptido se estableció en al menos una homología. Se utilizó el motor de búsqueda Mascot con el *software* ProteinPilot. Se realizó la búsqueda de proteínas utilizando la base de datos no redundante: NCBInr_20121109 (National Center for Biotechnology Information). Las proteínas que emparejan dos o más péptidos fueron consideradas como una identificación positiva, pero los péptidos de tripsina, la enzima que digiere proteínas, fueron excluidos del análisis. Las concentraciones de proteínas se determinaron utilizando el software ProteinPilot, versión 4.0 (AB Sciex, MA, EE.UU.) para inferir concentraciones con base a las cantidades de péptidos asignadas. El software ProteinPilot que emplea el algoritmo de búsqueda Paragon, se utilizó para la coincidencia de péptidos, la identificación de proteínas y la cuantificación relativa de proteínas. La herramienta ProteinPilot: Plantilla Estadística descriptiva (Descriptive Statistics Template, PDST) genera automáticamente una gran cantidad de información importante de datos intensivos de experimentos de proteómica. El coeficiente de expresión de proteínas se calcula a partir de la comparación por pares de dos canales iTRAQ. Para cada relación, el área del pico iTRAQ se corrigió por la correlación sesgada observada. El nivel general de confianza fue del 66% para los accesos de proteínas. El porcentaje de confianza se expresó en unidades ProtScore. Los niveles de confianza fueron del 99% (2,0), 95% (1,3), 90% (1.0) y 66% (0,47), y las unidades ProtScore se presentan entre paréntesis. Los datos del archivo de resultados se almacenaron en la base de datos de proteómica YPED (Yale Protein Expression Database), de Escuela de Medicina de la Universidad de Yale y de la Fundación WM Keck. El valor-p (Probabilidad de que la desviación de la unidad ocurra por casualidad) de proporciones se calculó (parcial y no sesgada). Las proteínas identificadas de Lepidóptera, se compararon con los péptidos de *G. mellonella* hallados, utilizando alineamiento por pares con el algoritmo BLAST versión BLAST 2.2.29 (Altschul *et al*., 1990) y múltiples alineamientos con la versión 3.2 de MUCLE (Edgar, 2004). Los datos de proteínas se analizaron en Uniprot, Pfam, Gene Ontology y KEGG, para identificar los procesos biológicos asociados a las funciones inmunológicas.

2.5 Estructura secundaria y terciaria de las proteínas seleccionadas

Se han usado péptidos de dos proteínas no anotadas para *G. mellonella* que tenían una cobertura adecuada de péptido (más del 50%) para alinearse con otras secuencias de proteínas. Los péptidos de cada proteína se volvieron a analizar por BLAST versión 2.2.29 (Altschul *et al*., 1990 y los alineamientos se elaboraron utilizando los algoritmos MUSCLE, versión 3.2 (Edgar, 2004) y ClustalW versión 2.0 (Larkin *et al*., 2007). Las estructuras secundarias y terciarias se definieron a partir del servidor en línea Phyre versión 2.0 y del

software independiente I-TASSER versión 3.0. Los archivos generados se visualizaron en UCSF Chimera versión 1.8. Los aminoácidos mutados fueron utilizados para generar estructuras terciarias que fueron alineadas con la base de datos de estructura del PDB. Además, las estructuras terciarias fueron alineadas utilizando comparación estructural y juego 3D en Chimera. Se analizaron las estructuras hipotéticas y se reportaron (Kelley &, Sternberg, 2009; Zhang, 2008).

2.6 Análisis bioinformático para *F. oxysporum* y *L. plantarum*

Los análisis bioinformáticos para *F. oxysporum* y *L. plantarum,* presentan algunas novedades no realizadas en el primer análisis (numeral 2.4), tales como, el estudio sistemático de las estructuras de las proteínas de *F. oxysporum*. Sin embargo todo el modelo estructural se realizó empleando las plataformas Phyre y iTASSER, empleadas para el estudio de las proteínas Actina y CRABP de *G. mellonella.*

3. RESULTADOS

3.1 Identificación de proteínas dentro de la hemolinfa de las larvas infectadas con el hongo

Se identificaron un total de 374 péptidos correspondientes a 59 proteínas diferentes en cada tratamiento realizado por iTRAQ 8-plex. En cuanto a los lepidópteros, iTRAQ 8-plex identificó 351 péptidos dispersos entre 40 proteínas (tabla 2). Entre éstas, se identificaron 47 proteínas con un nivel de confianza ≥ 99%, y 54 proteínas se identificaron con un nivel de confianza ≥ 95%. A partir de este conjunto de proteínas identificadas, 20 corresponden a *G. mellonella* y 20 al orden Lepidoptera: *Danaus plexippus* (4), *Bombyx mori* (3), *Corcyra cephalonica* (2), *Hyphantria cunea* (1), *Papilio polytes* (1), *Manduca sexta* (1), *Sesamia nonagrioides* (1), *Pieris rapae* (1), *Arcte modesta* (1), *Chilo suppressalis* (1), *Papilio xuthus* (1), *Samia ricini* (1), *Choristoneura fumiferana* (1), *Spodoptera exigua* (1) (tabla 2). Las proteínas restantes se identificaron como pertenecientes a otras órdenes de Insecta, otros invertebrados, bacterias, protozoos y hongos. En particular, se asignaron más de 350 péptidos de las proteínas de lepidópteros (tabla 2).

Entre las 59 proteínas identificadas por iTRAQ, 17 mostraron una buena cobertura con dos o más péptidos, tal como se resume en la figura 1. Entre estos, la cobertura mínima de péptidos fue de 59,85%, que corresponde a una proteína celular de unión a ácido retinoico con 3 péptidos; la cobertura máxima de arylforina con 340 péptidos marcados detectados (péptidos en los coeficientes de la figura 1), que corresponde a 48 péptidos diferentes (figura 2). Seleccionamos las 17 proteínas, no sólo por su cobertura, sino también por su excelente nivel de detección en LC/MS/MS en los diferentes tratamientos. De esas proteínas, 15 corresponden a *G. mellonella*, 1 a *B. mori*, actina y 1 a *D. plexippus*, proteína de unión a ácido retinoico celular [cellular retinoic acid binding protein], perteneciente a la familia de la lipocalina. En cuanto a las 20 proteínas de lepidópteros, 18 mostraron coberturas de péptidos inferiores al 50% (tabla 2).

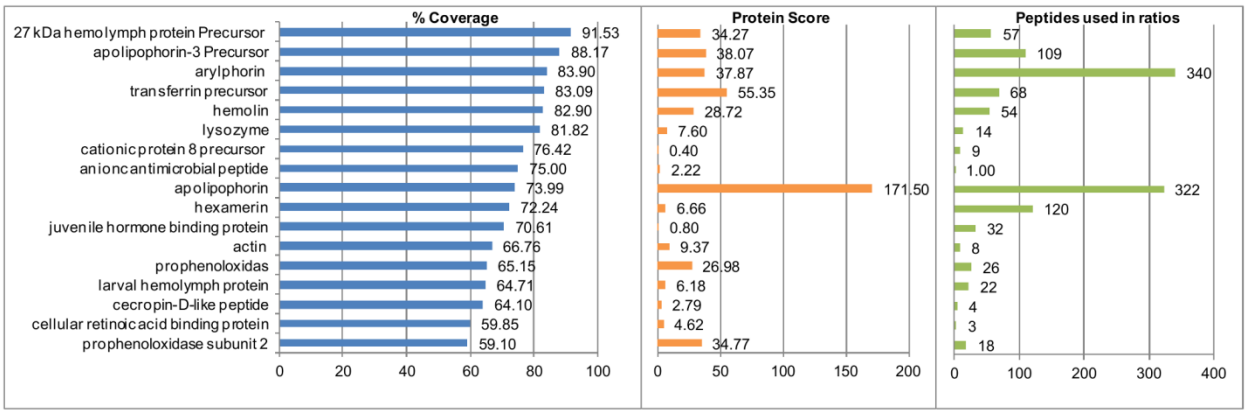


Figura 1. Análisis de datos de los péptidos de 17 proteínas seleccionadas. El porcentaje de cobertura de péptidos está representado por las barras azules a la izquierda; la puntuación de proteínas mediante el diagrama de barras de color naranja en el medio; y los péptidos utilizados en las proporciones por las barras verdes a la derecha. Las proporciones de péptidos y las puntuaciones de proteínas se calcularon utilizando el *software* ProteinPilot. Las proteínas seleccionadas tenían cobertura de más del 58%.

3.2 Expresión de proteínas en la hemolinfa de las larvas desafiadas

Se comparó la relación entre las tasas de los tratamientos para determinar la expresión de cada proteína. Fueron desarrollados análisis estadísticos sesgados y no sesgados para establecer las mejores diferencias. La tabla del anexo 1, muestra las proporciones (ratios) o relaciones de datos (no sesgado) entre los valores de los diferentes tratamientos y sus valores de p para la prueba de hipótesis de que la desviación de la unidad ocurre por casualidad. Los valores de p inferiores a 0,05 indican diferencias significativas entre los valores de los tratamientos comparados para el denominador 113 (canal). A partir de las 17 proteínas analizadas, solamente 2 de ellas tuvieron un péptido (no significativo, sin p-valor). Para las otras 15, 4 p-valores significativos para la relación (ratio) 115:113, 8 valores de p fueron significativos para la relación 116:113 y 12 valores de p significativos se observaron para la relación 117:113, ver tabla del anexo 2.

Se analizaron 17 proteínas dentro de cada tratamiento que se vieron afectadas (sobre-expresadas o sub-expresadas) por una infección del patógeno *F. oxysporum* (10^4 o 10^6 microconidias/mL) a dos temperaturas (25 o 37°C). Los resultados de expresión de proteínas relevantes, se resumen en la figura 2, aunque sólo se muestran los tres tratamientos más notables (larvas retadas con 10^4 microconidias/mL a 25 o 37°C y larvas retadas con 10^6 microconidias/mL a 37°C) con los controles (larvas sin inyección de microconidias, e incubadas a 25°C).

Cuando las larvas se inocularon con 10^4 microconidias/mL a 25 C, algunas proteínas bajaron sus concentraciones en comparación con las de larvas no tratadas a 25°C; las proteínas que son sub-expresadas incluyen: arilforina [arylphorin], hexamerina [hexamerin], proteína de hemolinfa larval [larval hemolymph protein], apolipoforina [apolipophorin], apolipoforina 3 precursor, proteína de unión de la hormona juvenil [juvenile hormone binding protein], precursor de transferrina [transferrin precursor], proteína de unión a ácido retinoico celular y el péptido antimicrobiano aniónico 2 [anionic

antimicrobial peptide 2]. Por el contrario, las siguientes proteínas fueron sobre-expresadas en las mismas condiciones (10^4 microconidias /mL a 25°C) en comparación con larvas sin tratamiento a 25°C: precursor de proteína de hemolinfa 27 kDa [27 kDa hemolymph protein; precursor], precursor de proteína catiónica 8 [cationic protein 8 precursor], hemolina [hemolin], precursor de transferrina, subunidad 2 de profenoloxidasa [prophenoloxydase subunit 2], lisozima [lysozyme] y actina [actin]. El nivel del péptido tipo cecropina-D [cecropin-D-like peptide] evidentemente era bajo y se había sub-regulado con 10^4 microconidias/mL a 25°C; esta concentración es la más baja entre las 17 proteínas (figura 2).

En cuanto a la expresión de proteínas en la hemolinfa de larvas inyectadas con 10^4 microconidias/mL a 37°C, en comparación con 10^4 microconidias/mL a 25°C o sin ningún tratamiento a 25°C, los resultados fueron muy diferentes. Con la excepción de apolipoforina 3, todas las proteínas fueron sobre-expresadas con respecto al control (véase sin tratamiento a 25°C, apolipoforina 3, figura 2) y mostraron concentraciones de proteína más altas. Sin embargo, es más interesante, en cada caso de tratamiento con 10^4 microconidias/mL a 37°C, la concentración de proteínas fue mayor que con 10^4 microconidias/mL a 25°C, incluida la de apolipoforina 3 (figura 2).

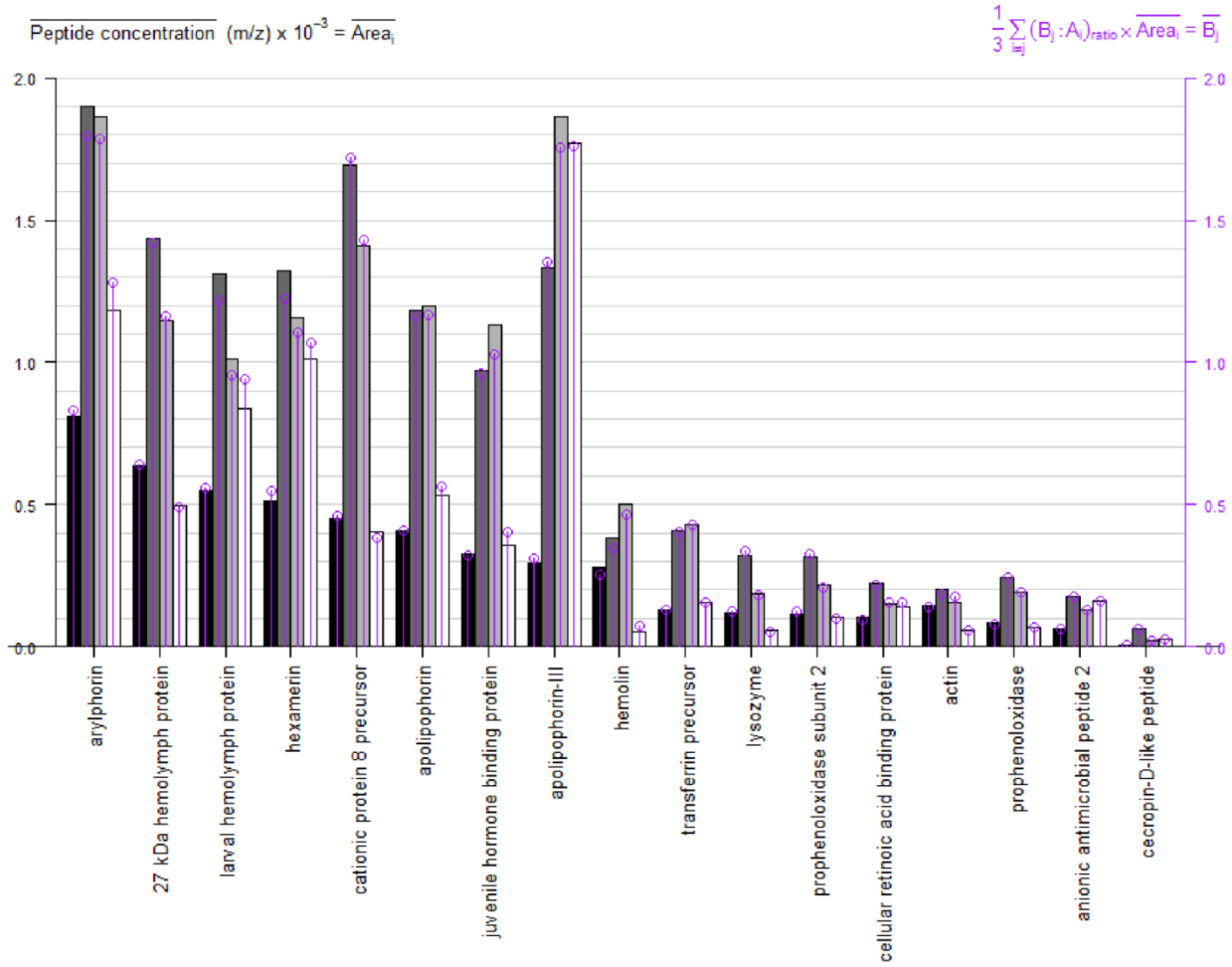
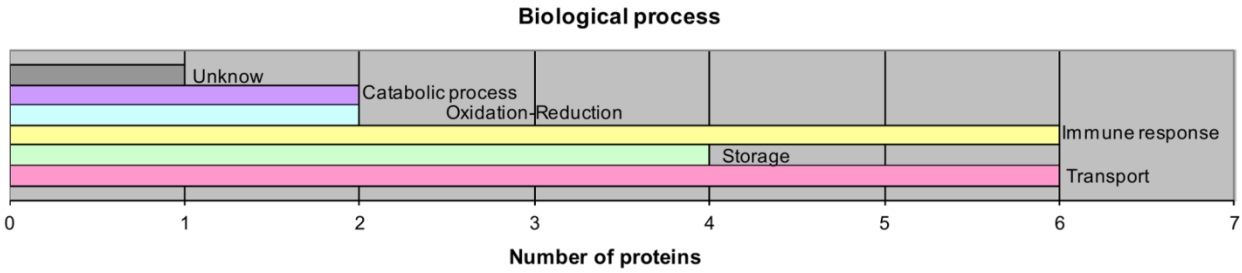


Figura 2. Resultados de expresión de las 17 proteínas. La gráfica representa un nivel de expresión de datos comparativo de la concentración cuantitativa de péptidos de 0 a 2.000 unidades, de los principales resultados seleccionados de 17 proteínas identificadas por iTRAQ utilizando ProteinPilot. Las barras negras corresponden a 10^4 microconidias/mL a 25°C, las barras grises oscuras corresponden a 10^4 microconidias/mL a 37°C, las barras de color gris claro corresponden a 10^6 microconidias/mL a 37°C y las barras blancas corresponden a los controles a 25°C sin tratar. El eje Y es el promedio de la suma de las áreas de péptidos, m/z (Area), como se representa en barras de color negro, gris y blanco. A la derecha del eje Y (líneas de color púrpura) representan el promedio de la suma de las proporciones iTRAQ por la media de la suma de la áreas de péptidos, m/z o Vp.

En la comparación de hemolinfa de larvas retadas con 10^4 o 10^6 microconidias/mL, independientemente de la temperatura, se observaron dos grupos de expresión de proteínas: uno con altos niveles de concentración (a la izquierda de la figura 2) y el otro con bajos niveles de concentración (a la derecha de la gráfica; la figura 2). El primer grupo incluyó arylforina, hexamerina [hexamerin], precursor de proteína de hemolinfa 27 kDa, precursor de proteína catiónica 8, apolipoforina, proteína de unión de la hormona juvenil, apolipoforina 3. El segundo grupo incluía hemolina, precursor de transferrina, profenoloxidasa subunidad 2, lisozima, actina, proteína de unión al ácido retonoico celular, péptido antimicrobiano aniónico y péptido tipo cecropina-D.

A. Plot



B. Grid

Hemolymph untreated at 25°C		Hemolymph with 10^4 at 25°C		Hemolymph with 10^4 at 37°C		Hemolymph with 10^6 at 37°C	
apolipophorin-3	1773	arylphorin	812	arylphorin	1902	arylphorin	1864
arylphorin	1180	27 kDa hemolymph	636	apolipophorin-3	1696	apolipophorin-3	1863
hexamerin	1011	larval hemolymph	545	cationic 8 precursor	1435	cationic 8 precursor	1407
larval hemolymph	838	hexamerin	512	apolipophorin	1329	apolipophorin	1198
apolipophorin	531	cationic 8 precursor	449	hexamerin	1321	hexamerin	1154
27 kDa hemolymph	495	apolipophorin	408	27 kDa hemolymph	1310	27 kDa hemolymph	1145
cationic 8 precursor	400	juvenile hormone binding	325	juvenile hormone binding	1184	juvenile hormone binding	1132
juvenile hormone binding	356	apolipophorin-3	294	larval hemolymph	968	larval hemolymph	1011
anionic antimicrobial peptide 2	158	hemolin	280	hemolin	408	hemolin	502
transferrin precursor	153	actin	147	transferrin precursor	380	transferrin precursor	429
cellular retinoic acid binding	140	transferrin precursor	129	prophenoloxidase	321	prophenoloxidase subunit 2	219
prophenoloxidase subunit 2	102	lysozyme	119	prophenoloxidase	314	prophenoloxidase	189
hemolin	52	prophenoloxidase subunit 2	114	lysozyme	244	lysozyme	186
prophenoloxidase	66	cellular retinoic acid binding	103	actin	223	actin	152
actin	58	prophenoloxidase	80	cellular retinoic acid binding	201	cellular retinoic acid binding	152
lysozyme	55	anionic antimicrobial peptide 2	63	anionic antimicrobial peptide 2	176	anionic antimicrobial peptide 2	126
cecropin-D-like peptide	25	cecropin-D-like peptide	2	cecropin-D-like peptide	64	cecropin-D-like peptide	22

Figura 3. Proceso biológico de las 17 proteínas. Los colores en el gráfico A y el cuadro B se relacionan. El gráfico A muestra el número de proteínas reportadas en bases de datos en relación con la respuesta inmune. La cuadrícula B representa los controles o concentraciones de microconidias en la columna de cada tratamiento (microconidias/mL). La columna a la izquierda del nombre de la proteína proporciona el color de

la función biológica. Algunas proteínas tienen dos o más funciones, pero para la actividad inmunológica se seleccionaron dos, incluyendo la respuesta inmune. La columna a la derecha del nombre de la proteína muestra el nivel de concentración de péptidos. El gris representa una función desconocida, pero los dominios de la proteína se identificaron como sigue: púrpura: proceso catabólico; azul: oxidación-reducción; amarillo: respuesta inmune; verde: almacenamiento; y rojo: transporte.

En cuanto al tratamiento con 10^6 microconidias/mL a 37°C, algunas de las proteínas fueron ligeramente sobre-expresadas en comparación con el tratamiento $10^{4,}$ tal como sigue: apolipoforina, proteína de unión de la hormona juvenil, apolipoforina, apolipoforina 3, hemolina y precursor de transferrina (estas proteínas están en el centro de la figura 2). Este patrón difiere de las proteínas restantes que no superaron el resultado obtenido con el tratamiento 10^4 microconidias/mL a 37°C.

3.3 Análisis bioinformático y ontología de genes de proteínas de lepidóptera

El enfoque iTRAQ fue útil para identificar, no sólo los niveles de expresión de proteínas con diferentes concentraciones de microconidias, sino también nuevas proteínas homólogas en *G. mellonella* debido a la falta de toda anotación del genoma de este insecto. Este enfoque fue interesante porque ProteinPilot y Mascot Distiller están diseñados principalmente para identificar proteínas en el propio genoma de las especies consideradas. Por ejemplo, de las 17 proteínas seleccionadas, dos no se hallan anotadas para *G. mellonella*: actina y proteína de unión a ácido retinoico celular. Entre las 40 proteínas de lepidópteros, encontramos 20 nuevas que aún no se habían anotado para *G. mellonella* (enumeradas en la tabla 2).

Tabla 2. Listado de las proteínas identificadas por iTRAQ, desde la más alta a la puntuación de proteína más baja. Las 3 columnas de la izquierda muestran 20 proteínas de *G. mellonella*. Las 3 columnas a la derecha muestran 20 proteínas de otras especies de lepidópteros, que no se identifican con alguna secuencia de proteínas de *G. mellonella* reportadas en bases de datos, pero coincidían con otras especies de mariposas.

Accession	Nombre de la Proteína de *G. mellonella*	Péptidos	Accesión	Nombre de la Proteína de otras especies de Lepidóptera	Péptidos
AAT76806	Apolipophorin	89	EHJ68005	apolipophorins, *Danaus plexippus (*	2
AAA74229	Arylphorin	48	AGR44824	actin, *Bombyx mori*	7
AAQ63970	transferrin precursor	31	ADA84299	hexamerin receptor, *Corcyra cephalonica*	6
AAA19801	Hexamerin	22	Q6VU70	apolipophorin-3 precursor, *Hyphantria cunea*	1
P80703	apolipophorin-3; precursor	20	ADR64702	antennal esterase CXE5, *Spodoptera exigua*	1
AAQ75026	prophenoloxidase subunit 2	11	BAK82317	apolipophorin precursor, *Bombyx mori*	2
P83632	27 kDa hemolymph protein; precursor	12	EHJ79039	cellular retinoic acid binding protein, *Danaus plexippus*	3
ACU09501	Hemolin	21	BAM18997	imaginal disc growth factor 4, *Papilio polytes*	4
AAK64363	prophenoloxidase	14	Q25490	apolipophorin-2; precursor, *Manduca sexta*	3
AAN06604	juvenile hormone binding protein	8	NP_001037386	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *Bombix mori*	1
P82174	lysozyme; 1,4-beta-N-acetylmuramidase	6	AAG44959	hexamerin 2, *Corcyra cephalonica*	1
CAK22401	beta-1,3-glucan recognition protein precursor	1	AAY26453	moderately methionine rich storage protein, *Sesamia nonagrioides*	2
ADI87454	cationic protein 8 precursor	5	ACZ68116	masquerade-like serine proteinase, *Pieris rapae*	3
ABG91580	larval hemolymph protein	5	EHJ65451	moderately methionine rich storage protein, *Danaus plexippus*	2
AAL47694	32 kDa ferritin subunit	4	EHJ75277	serpin 1, *Danaus plexippus*	1
ACQ99193	proline-rich protein	2	ADX62478	isocitrate dehydrogenase, *Arcte modesta*	1
AAG41120	26kDa ferritin subunit	3	AEW46856	seminal fluid protein, *Chilo suppressalis*	1
P85210	cecropin-D-like peptide	1	BAM19609	peptidoglycan recognition protein , *Papilio xuthus*	2
P85216	anionic antimicrobial peptide 2	1	BAF42698	hemolymph storage protein 1, *Samia ricini*	1
ADK26057	kunitz-type protease inhibitor precursor	1	AAC35429	diapause associated protein 2, *Choristoneura fumiferana*	2

Nuestra búsqueda en Uniprot, Pfam y KEGG nos permitió correlacionar la información con Gene Ontology y asociar el proceso biológico con su función inmunológica. La figura 3A muestra los resultados de esta búsqueda. Hemos definido cinco funciones biológicas para estas 17 proteínas, apoyados por metadatos de información bioinformática en la base de

datos de ontología de genes: de transporte, de respuesta inmune, de almacenamiento, de óxido-reducción y catabolismo. De esas 17 proteínas, 6 están especializados en el transporte; 6 en llevar a cabo las respuestas inmunológicas; 4 en el trabajo de almacenamiento; 2 operan en óxido-reducción; y 2 más sirven en el catabolismo. Una proteína parecía poseer una función desconocida: precursor de proteína de hemolinfa 27kDa (Figura 3A y 3B). Apolipoforina, arilforina, lisozima y actina son todas proteínas esenciales que han sido muy bien estudiadas. Además, algunas de estas y otras proteínas fueron reportadas previamente por jugar papeles importantes en los procesos inmunológicos, tales como apolipoforina, precursor de proteína catiónica 8, hemolina, péptido antimicrobiano aniónico 2, lisozima, y el péptido tipo cecropina-D. El papel de profenoloxidasa en el proceso de óxido-reducción y la función de la lisozima y actina en el proceso catabólico también son bien conocidos. Como veremos más adelante, los resultados identificaron proteínas desconocidas de *G. mellonella* que se encuentran muy probablemente asociadas con el transporte, almacenamiento o desafíos de la respuesta inmunológica y afectadas por la invasión de microconidias del hongo.

Otras funciones biológicas son también muchas veces asociadas a respuestas inmunológicas. Sin embargo, la gráfica de la figura 3A representa una o dos funciones principales de las 17 proteínas estudiadas, en relación con la defensa inmunológica en larvas de lepidópteros orientada por la invasión de hongos. La figura 3B muestra el proceso biológico para cada proteína. El precursor de Apolipoforina 3, arylforina, apolipoforina, actina y lisozima realizan dos funciones que probablemente están asociados con las defensas inmunológicas, como se muestra en nuestros resultados. Por el contrario, hexamerina, proteína de hemolinfa larval, precursor de proteína catiónica 8, proteína de unión de la hormona juvenil, precursor de transferrina, proteína de unión a ácido retinóico celular, profenoloxidasa subunidad 2, hemolina, profenoloxidasa [prophenoloxidase] y dos péptidos antimicrobianos (el aniónico 2 y el tipo cecropina-D) contribuyen a una función conocida relacionada con la respuesta inmunológica. No hay información relativa al precursor de proteína de hemolinfa 27 kDa, en las bases de datos existentes (figura 3-B).

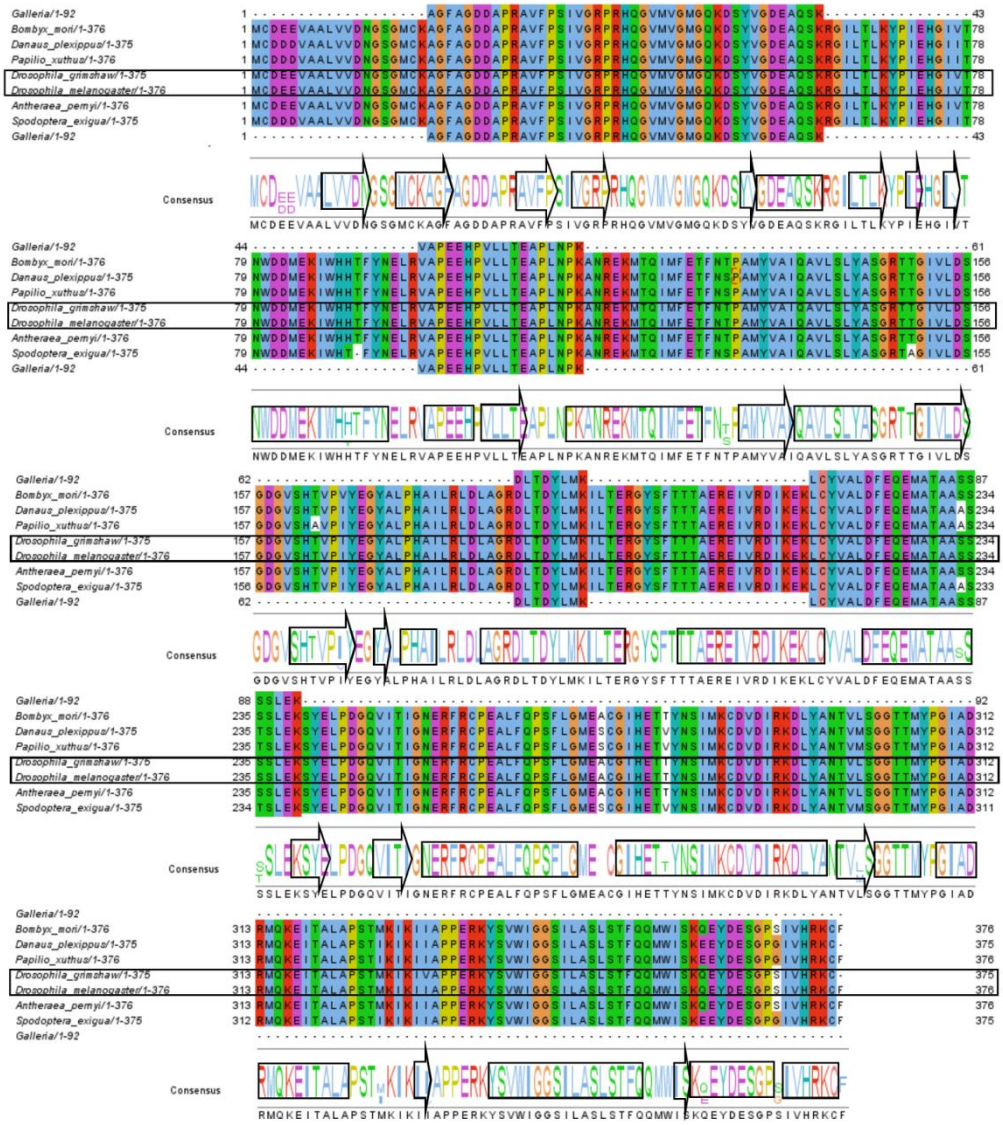
3.4 Estructura hipotética de proteínas no identificadas de *G. mellonella*

Dos proteínas no han sido anotadas para *G. mellonella* en ningún banco de datos de proteínas: actina (actina 4) y la proteína de unión a ácido retinoico celular, de la familia de lipocalina. Esas proteínas ortólogas importantes se infieren sobre la base de secuencias de especies cercanas de lepidópteros, tales como *B. mori* para actina 4 (GenBank: AGR44824.1 o AGR44827.1) y *D. plexippus* para la proteína de unión a ácido retinoico celular (GenBank: EHJ79039.1).

Los péptidos de actina 4 identificados por iTRAQ 8-plex en *G. mellonella* coinciden exactamente, es decir, con el 100% de la actina 4 de *B. mori* (GenBank: AGR44824.1, 376 AA), la actina de *D. melanogaster* (GenBank: AAA28314.1 o NP_511052 0,1, 376 AA), la actina de *D. grimshaw* (GenBank: XP_001986647, 375 AA), y la actina de *Antherae pernyi* (GenBank: ADJ67594, 376 AA). Estos péptidos también coinciden en un 98,91% con las siguientes especies de Lepidóptera debido a su mutación de aminoácidos en S233A y con *D. plexippus* (GenBank: EHJ70060), *S. exigua* (ADJ67594.1, 376 AA) y con la actina de *P.*

xuthus (GenBank: BAG30799) (figura 4A). La similaridad de secuencia entre 376 AA de *B. mori* y *D. melanogaster* es del 100%. El alineamiento con estas secuencias de actina ha demostrado que los dominios conservados son el dominio de unión de nucleótidos de la *sugar* quinasa/HSP70/superfamilia de actina y que los residuos del sitio catalítico son exactamente la misma secuencia que para *D. plexippus* (K18, D157, K213, E214, T303, M305, Y306, K336, y la estructura secundaria y terciaria son muy conservadas; figura 5A y 5B en azul). La secuencia *consensus* toma la estructura secundaria hipotetizada por los servidores Phyre y Tysser. Nosotros también hipotetizamos una estructura terciaria utilizando la estructura de actina 3MN6 (Protein Data Bank) de *D. melanogaster* como modelo, comparándolo con la actina 4 AGR44824.1 de *B. mori*. Las sustituciones probables se muestran en amarillo y verde (figura 4B), con las siguientes 18 posibles sustituciones de aminoácidos en *G. mellonella:* T149A, T163A, S233A, A272S, T279V, Q361E, S369G, (en amarillo) E4D, E5D, V77I, T130S, I166V, S235T L300M, M326I, I331V (en verde), H89del, y F276del (figura 4B).

A


Galleria/1-92
Bombyx_mori/1-376
Danaus_plexippus/1-375
Papilio_xuthus/1-376
Drosophila_grimshaw/1-375
Drosophila_melanogaster/1-376
Antheraea_pernyi/1-376
Spodoptera_exigua/1-375
Consensus

B

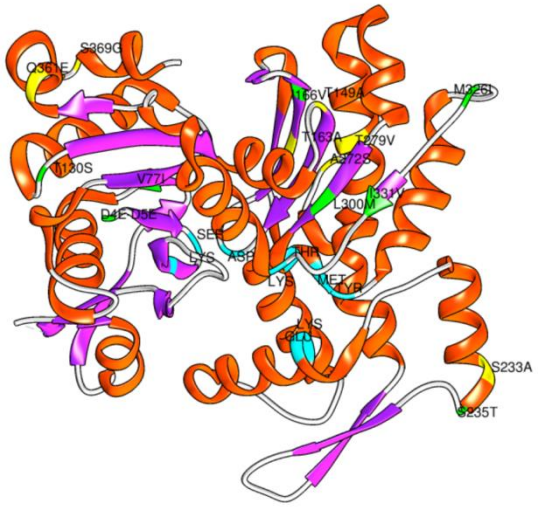

S369G
Q361E
T149A
M326L
T163A
T279V
A272S
T130S
V77L
I331V
L300M
D4E
D5E
SER
LYS
ASP
THR
LYS
MET
TYR
LYS
GLU
S233A
S235T

Figura 4. Actina 4, alineamiento y estructura 3D hipotética. A. El alineamiento de secuencias de proteína actina de Lepidoptera, coincide con la del péptido actina de *G. mellonella* (primeras secuencias discontinuadas y punteadas) y alinea bien (100%) con la proteína de *B. mori.* También se incluyeron las especies relacionadas y de *Drosophila*. Un consenso se obtuvo en Jalview utilizando un algoritmo Clustal. La secuencia de consenso incluye flechas (α hélice) y cilindros (β-hoja) obtenidos por el análisis estructural. El alineamiento muestra inserciones, deleciones o sustituciones. **B.** 3MN6 (Protein Data Bank) el patrón de actina terciaria original y sustituciones de aminoácidos probables están marcados en amarillo y verde. Los residuos del sitio catalítico se pueden encontrar en azul.

Los tres péptidos de la proteína de unión a ácido retinoico celular de G. *mellonella*, identificados por iTRAQ 8-plex, coinidían exactamente con el 100% de la proteína de unión a ácido retinoico celular de *D. plexippus* (GenBank: EHJ79039.1, 132 AA). Una coincidencia de menor porcentaje se encontró para la proteína de unión a ácido retinoico celular de *M. sexta* (GenBank: AAC24317.1, 132 AA), de *B. mori* (GenBank: NP_001037364.1, 132 AA), de *Plutella xylostella* (GenBank: BAD26694.1, 132 AA) y de *Antheraea yamamai* (GenBank: AGG56524.1, 132 AA). Los alineamientos con las secuencias de la proteína de unión a ácido retinoico celular, mostraron los dominios conservados entre ellos (superfamilia lipocalina) y su estructura secundaria conservada constante (figura 5A). La secuencia consensus tomó la estructura secundaria hipotetizada por los servidores Phyre y Tysser. Las sustituciones probables mostraron los 20 aminoácidos con más probabilidades de ser reemplazados en *G. mellonella*: E2D, V11I / V11T, T22A / T22V, I23L, E28D, T37N, R43K, Q44K / Q44R, D45E, N48G / N48E / N48D, F49Y, V50N, K65S, E68Q, T90I, A98P / A98Q / A98D, L101S, V106I, A120T y V131A. Nosotros también hipotetizamos una estructura terciaria usando como patrón la proteína de unión a ácido retinoico celular (EHJ79039.1) de *D. plexippus* en el servidor Phyre. El alineamiento 3D entre la estructura hipotética (naranja) y 2CBR (Protein Data Bank, en azul con ATP) proteína de unión a ácido retinoico celular (136 AA) de *Bos taurus* se hizo utilizando el servidor Phyre y se visualizaó con UCSF Chimera versión 1.8. Este alineamiento mostró una similaridad estructural con ligeras diferencias estructurales, a pesar de la baja similaridad de secuencia con la secuencia de *B. taurus* (figura 5B).

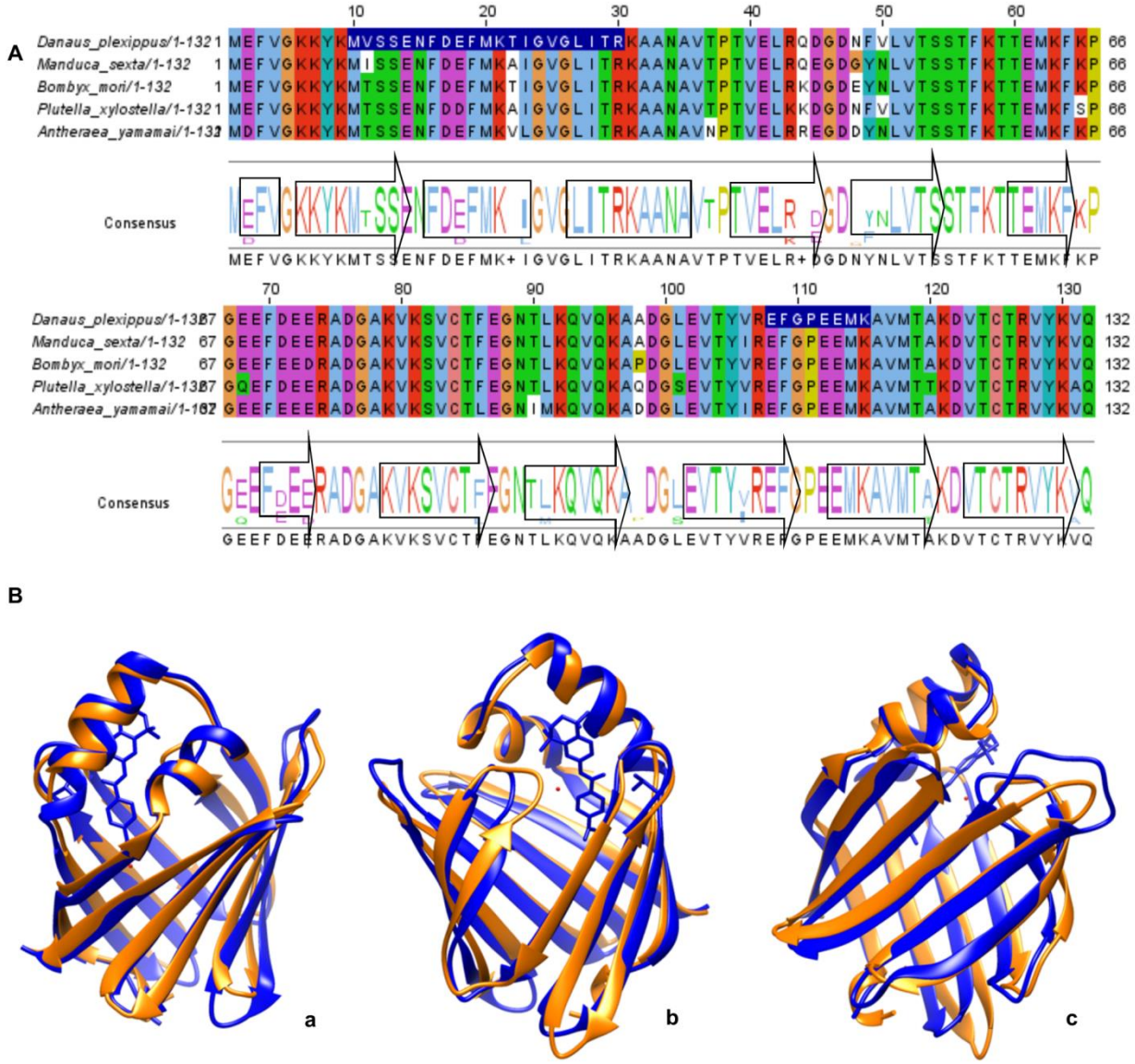


Figura 5. Proteína de unión a ácido retinoico celular (CRABP) o lipocalina. A. Alineamiento de diferentes proteínas de unión al ácido retinoico celular (cellular retinoic acid binding) de cinco secuencias diferentes de Lepidoptera. Los péptidos identificados por iTRAQ, aparecen resaltados en azul, se pueden encontrar sobre la secuencia de *D. plexippus*. Un consenso se obtuvo en Jalview utilizando el algoritmo Clustal, incluyendo las flechas (α- hélice) y cilindros (β-hoja) obtenidos a través de un análisis estructural. **B.** Tres ángulos laterales diferentes en medio de 2CBR terciaria (Protein Data Bank) de patrones de unión al ácido retinoico celular con nuestra estructura lipocalina hipotética. El alineamiento de las estructuras 3D (a, b, c) entre el hipotético CRABP de *G. mellonella* (naranja) y 2CBR (Protein Data Bank, en azul con ATP) proteína de unión a ácido retinoico celular (136 AA) de *B. taurus*.

3.5 Identificación de proteínas de *F. oxysporum*

Es importante recordar que solo los canales 113, 115, 117 y 119 debieron contener péptidos de proteínas de *F. oxysporum*. Dada la rigurosidad del análisis solo se encontró un solo péptido de cada una de las 4 proteínas de *F. oxysporum*. Esas proteínas fueron: proteína hipotética FOXB_00653 ó Fo5176, GenBank: EGU88810.1, proteína hipotética FPSE_10944 ó CS3096, NCBI Reference Sequence: XP_009262336.1, proteína hipotética FOXB_16 ó Fo5176, GenBank: EGU750.1 y proteína hipotética FOXB_13674 ó Fo5176] GenBank: EGU75807.1. Para este caso un solo péptido permitió identificar una sola proteína y para estos análisis ProteinPilot no permite realizar cuantificación y solo valorizan la presencia de la proteína sin establecer su comportamiento en los canales donde debe aparecer sobre- o sub-expresada. A pesar de esta rigurosidad del sistema iTRAQ, estas cuatro proteínas se pudieron identificar, donde la proteína hipotética FOXB_00653 ó Fo5176 ó GenBank: EGU88810.1, corresponde a la conocida proteína ubicuitaria HSP90, cuyo alineamiento presenta alta similaridad con *S. cerevisiae* y *Drosofila melanogaster* (Figura 6). Es importante aclarar que las proteínas de F. oxysporum FOXB_00653 y FPSE_10944 son el mismo tipo de proteína HSP90. Por lo tanto todos los análisis se hicieron con FOXB_00653.

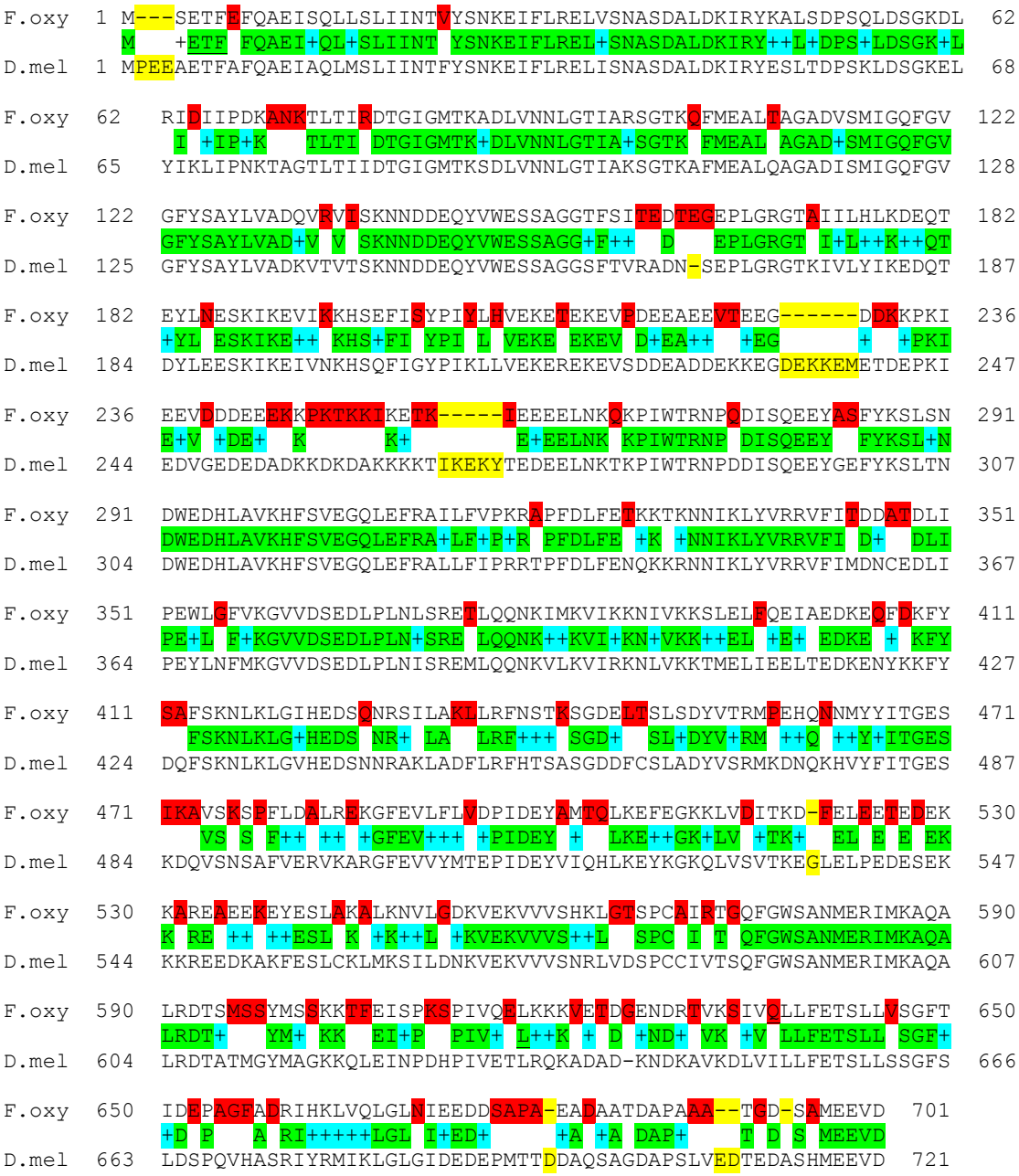


Figura 6. Alineamiento entre las proteínas HSP90 de *F. oxysporum* FOXB_00653 y HSP90 de *D. melanogaster*.

Esta alta similaridad con las proteínas HSP90 de *D. melanogaster* y 2CG9 de *S. cerevisiae* permitió obtener la estructura hipotética completa de la proteína HSP90 de *F. oxysporum*. La figura 7, muestra las estructuras obtenidas en los servidores Phyre2 e I-TASSER. Ambos servidores lograron una estructura consenso idéntica lo que permitió alinear ambas estructuras en el programa Chimera. Sin embargo, el programa Phyre2 fue menos riguroso,

dado que eliminó aminoácidos, de los *loops* más grandes, que I-TASSER bien tuvo a conservar, ambos en azul en la parte inferior de la figura 7.



Figura 7. Comparación estructural de alineamiento de HSP90 de F. oxysporum realizado en Chimera, de los resultado obtenidos por Phyre2 e iTysser. Se observa la eliminación de aminoácidos de Phyre2 (dorado) y a su lado la conservación de estos aminoácidos por iTysser (turquesa).

Realizando una comparación de la estructura de HSP90 de *F. oxysporum* con 2CG9 de *S. cerevisiae*, se observa lo fidedigno del cálculo estructural del servidor I-TASSER. En la figura 8, se observa la comparación de HSP90 2CG9 (azul) y HSP90 de *F. oxysporum* (naranja), donde estos *loops* son colocados como rayas discontinuas en la estructura de 2CG9 de *S. cerevisiae* de la base de datos Protein Data Bank (www.rcsb.org).

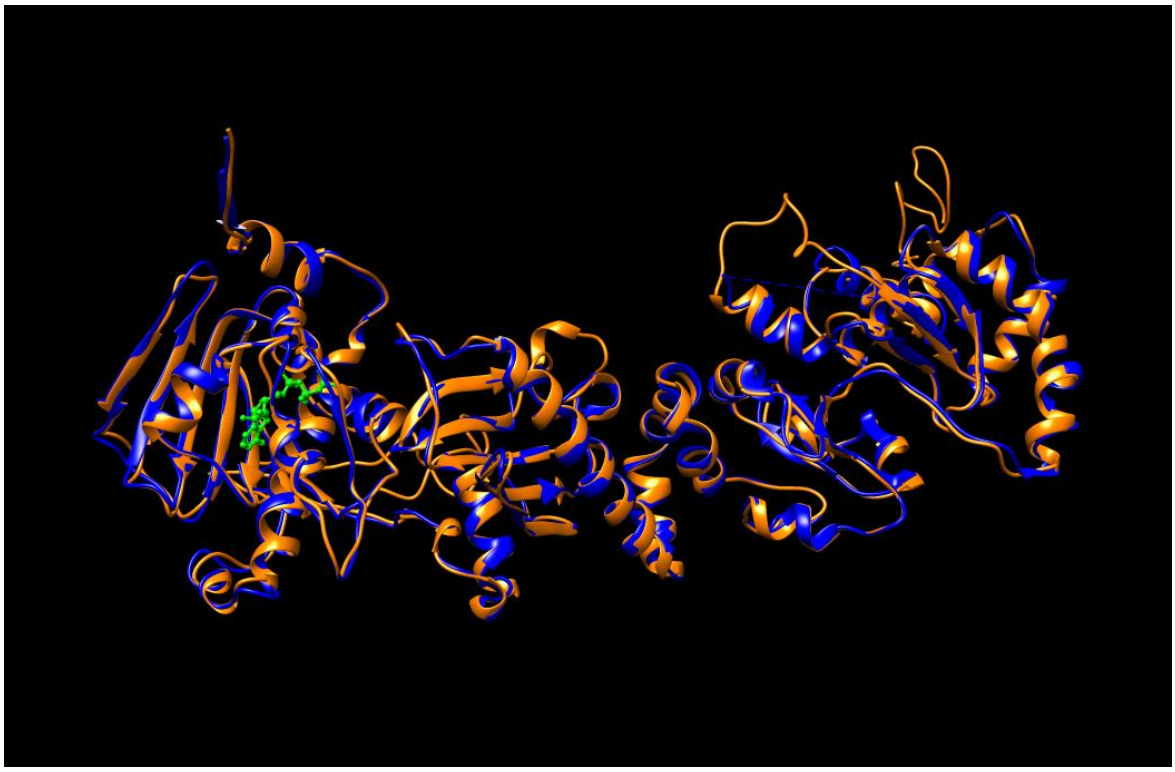


Figura 8. Alineamiento estructural entre HSP90 de *F. oxysporum* (naranja) y 2CG9 de *S. cerevisiae* (azul) con su ATP correspondiente (verde) de la proteína obtenida de Protein Data Bank (www.rcsb.org)

El dominio funcional del ATP (figura 8) en verde, en la de ambas proteínas es idéntico, conservando los mismos tipos de aminoácidos. Lo que demuestra ya no solo similaridad estructural sino igualmente funcional.

3.5.1 Proteínas de *L. plantarum*

Como en el caso anterior es importante recordar que solo los canales 119 y 121 debieron contener proteínas de *L. plantarum*. Sin embargo, dada la rigurosidad del análisis con el programa ProteinPilot, este muy posiblemente desestimó la presencia de los péptidos en solo 2 canales (119 y 121) por no estar presentes en la mayoría de canales (4 o más). A diferencia del caso anterior con *F. oxysporum* que un solo péptido permitió identificar una sola proteína. Para este caso, ProteinPilot no tuvo en consideración los péptidos de las proteínas de *L. plantarum,* quizás por la baja representatividad en todos los canales. Pero el efecto de estas protínas y otras moléculas, si permitió observar que éstas tiene un efecto diferencial en el sistema inmune del insecto, eso con respecto a los demás tratamientos con y sin hongo exclusivamente. En la sección siguiente se reporta además de las algunas de las 17 proteínas de *G. mellonella* ya estudiadas, otras nuevas proteínas, seguramente importantes que no solo se estimularón por la presencia del hongo, sino que posiblemente por la adición conjunta de la bacteria.

3.5.2 Respuesta de proteínas de *G. mellonella* en los canales 119 y 121

Estos dos canales permitieron corroborar los datos iniciales encontrados con los canales 113, 114, 115, 116, 117, 118, para las primeras bien caracterizadas 17 proteínas estudiadas, especialmente hemolina, lizosima, proteína larval de la hemolinfa, apolipoforina 3 y CRABP entre otras, pero sobretodo, igualmente permitieron corroborar la actividad específica de los péptidos anti-bacterianos, tipo cecropina y el péptido Antimicrobiano Aniónico (figura 9). Igualmente estos dos canales (o tratamientos) permitieron identificar otras proteínas importantes que presentan actividad asociada a la respuesta inmune por la invasión por el hongo-bacteria, y se observa también que algunas de ellas presentan alta respuesta por la adición de la bacteria como son: precursor de beta 1,3 glucano, factor 4 de crecimiento de disco imaginal, gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa, subunidad de ferritina 26 kDa, y de ferritina 32 kDa, isocitrato deshidrogenasa, proteína rica en prolina, HSP60 de *G. mellonella*, proteína hipotética TREMEDRAFT_44037, inhibidor de proteasa Kunitz tipo y proteína de reconocimiento de peptidoglicano (figura 9).

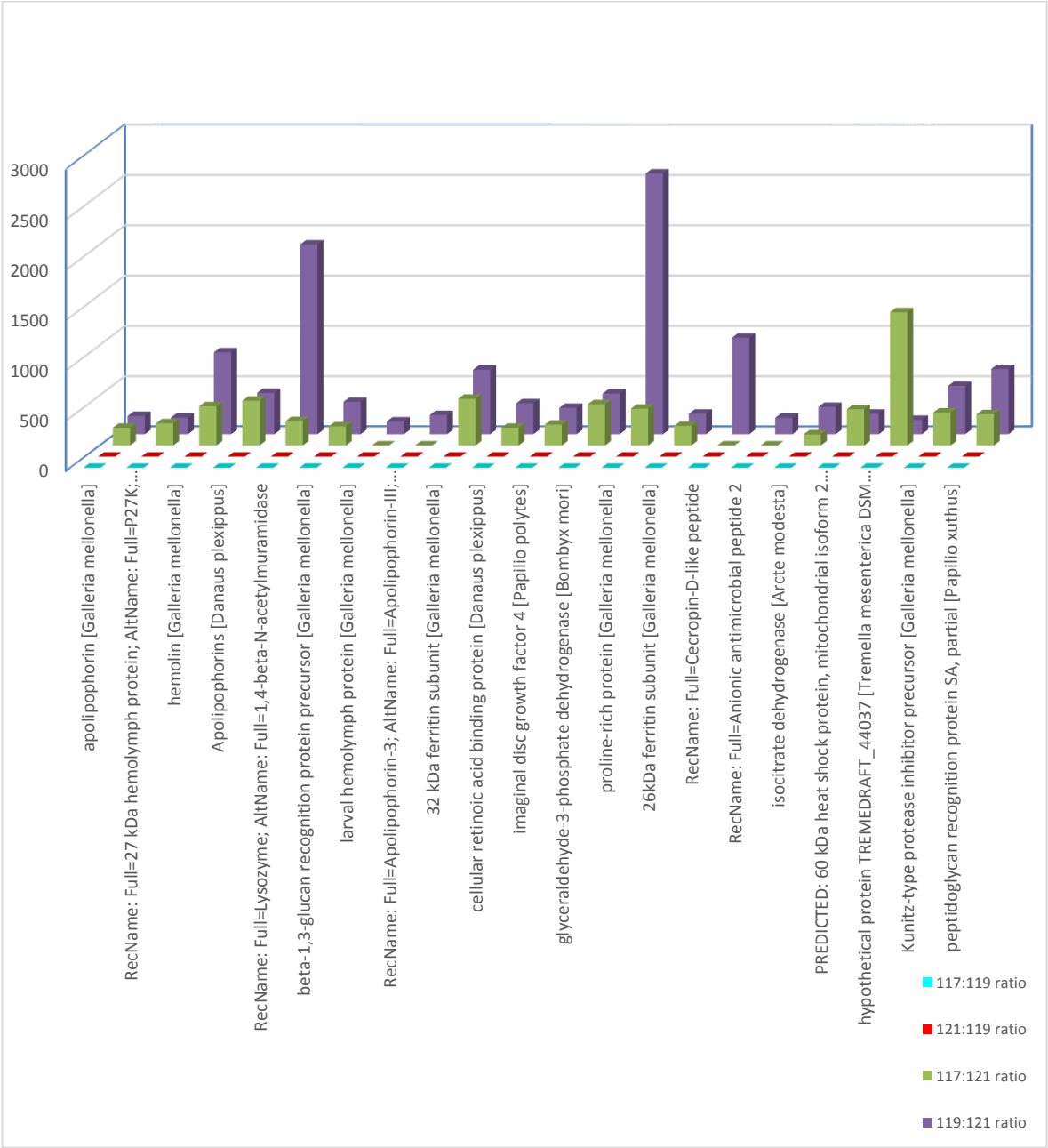


Figura 9. Gráfica de los datos correspondientes a las tasas del canal 119 (Hemolinfa inoculada con *L. plantarum* 10^8 ufc/mL y luego retada con *F. oxysporum* 10^4 microcon/mL a 37°C) y del canal 121 (Hemolinfa retada con *L. plantarum* 10^8 ufc/mL a 37°C) comparados con el canal 117 (Hemolinfa retada con *F.oxysporum* 10^6 microcon/mL a 37°C).

4. DISCUSIÓN

4.1 Modelo inmunológico y rendimiento iTRAQ

Las larvas de *G. mellonella* son un modelo excelente para estudiar los procesos biológicos tales como las respuestas inmunológicas y los mecanismos de virulencia y el sistema inmune innato. En nuestro estudio, se infectaron las larvas con suspensiones de microconidias de *F. oxysporum*. La supervivencia y mortalidad fueron estadísticamente consistentes. Las proteínas de la hemolinfa estaban en alta concentración, como se ha señalado mediante un ensayo de Bradford.

El hongo *F. oxysporum* es un patógeno trans-reino y un patógeno emergente en humanos, mamíferos y vertebrados (Assaf *et al*., 2000). La misma cepa del hongo podría afectar igualmente a los animales y a plantas (Ortoneda *et al*., 2004). Hemos tomado nota de que las larvas de *G. mellonella* incubadas a 37°C mostraron una respuesta inmune humoral mejorada después de la infección por hongos en comparación con larvas infectadas que se incubaron a 25°C. Esta respuesta mejorada se manifiesta por un aumento de la expresión de las proteínas, que ya antes, otros autores habían observado lo mismo con levaduras u hongos (Jackson *et al*., 2009; Wojda I, Jakubowicz, 2007; Mowlds & Kavanagh, 2008; Mylonakis, 2008). La hemolinfa de larvas es capaz de inhibir la filamentación de *Fusarium*, y después de 48 h todavía pudo resistir 10^4-10^6 microconidias/mL. La cuantificación por iTRAQ se logra mediante la comparación de las áreas de los picos y de las proporciones de picos resultantes para los iones reportero LC/MS/MS de ocho etiquetas (113 -114- 115- 116- 117- 119 y 121 Da). La relación de las intensidades de la señal de estas etiquetas actúa como un indicador de la proporción relativa de dicho péptido entre las muestras marcadas de manera diferente (Unwin, 2010). La cantidad mínima de proteínas identificadas después del análisis complejo iTRAQ 8-plex, se atribuyó principalmente a la falta de información sobre el genoma de *G. mellonella*. Sin embargo, la coincidencia con péptidos de especies estrechamente relacionadas, nos permitió resolver e identificar proteínas de *G. mellonella* durante la respuesta inmune. Por lo tanto, debería ser factible esperar un gran número de proteínas para ser identificado por su similitud con los insectos bien caracterizados, tales como *Anopheles gambiae, Aedes aegypti, Apis mellifera* y *D. melanogaster*. Estos resultados parecen indicar que las especies de lepidópteros podrían haber evolucionado de forma independiente, hace mucho tiempo, de otros insectos o, al menos, que las proteínas de la hemolinfa de *G mellonella*, relacionadas con el sistema inmune innato, pueden estar ausentes en otras especies de insectos.

4.2 Expresión de proteínas inducida por el ataque de hongos

Las mariposas son insectos holometábolos, lo que significa que las pupas no se alimentan durante la metamorfosis; en cambio, dependen de los nutrientes que se acumularon anteriormente en el período larval. Las proteínas, los lípidos y los hidratos de carbono que se han tomado de la hemolinfa en forma selectiva por el cuerpo graso de las larvas antes de la pupación (Hansen *et al*., 2003) proporcionan energía y permiten la construcción de bloques de aminoácidos para los tejidos imaginales.

Banville *et al*. (2012), encontraron una regulación de la sub-expresión, de una serie de proteínas asociadas con la respuesta inmune, en un análisis del proteoma de larvas con 7 días de privación de alimento. En nuestro caso, encontramos el mismo resultado después de una infección con *F. oxysporum* a 25°C con 2 días de ayuno, en contraste con una notable sobre-expresión del proteoma a 37°C. Las 48 horas de inanición con desafío por infección, activan la respuesta inmune rápidamente; al aumentar la temperatura desde 25 hasta 37°C, mejora la expresión de proteínas relacionadas con la respuesta inmune. A diferencia de las larvas en etapa de privación de alimento, en las cuales se redujo la expresión en una serie de proteínas antimicrobianas e inmunológicas, incluyendo apolipoforina y arylforina (Banville *et al*., 2012), en nuestro caso, estas proteínas presentaron un notable aumento en la expresión a 37°C.

En nuestro estudio, arylforina (AAA74229), que es una hexamerina, tenía la mejor cobertura de péptidos y era la proteína probable más abundante en la hemolinfa, junto con apolipoforinas. Estos datos se encontraron porque arylforina se había sub-regulado a 25°C, pero notablemente sobre-expresada a 37°C, a la misma concentración de microconidias. Apolipoforina (ALP, AAT76806) es una lipoproteína que juega un papel en el transporte de lípidos y es probable que esté asociada con actividad antimicrobiana porque los lípidos son secretados para prevenir invasiones microbianas. Además, las propiedades funcionales de la lipoforina como un vehículo lipídico están bien caracterizados (Ryan & van der Horst, 2000). Recientemente, el estudio de Banville *et al*., (2012) demostró la reducción de la expresión de una serie de péptidos antimicrobianos que son sub-regulados en asociación con la respuesta inmune.

Apolipoforina III precusor (apoLPIII, P80703) fue la proteína más sub-expresada en este estudio, sobre todo después del reto con 10^4 microconidios/mL a 25°C, pero fue ligeramente sobre-expresada con 10^6 microconidios/mL (no significativo). Esta proteína parece permanecer sin modificarse bajo condiciones fisiológicas y todas las funciones y efectos observados deben ser inherentes a la estructura de la proteína (Weise *et al*., 1998). Las apolipoproteínas de mamíferos, tales como la apolipoproteína E (apoE), están involucradas en la detoxificación de lipopolisacaridos (LPS), la fagocitosis, y, potencialmente, en el reconocimiento de patrones. La proteína de insecto apoLp-III es homóloga a apoE (Whitten *et al*., 2004); apoLpIII estimula el incremento de la actividad antibacteriana en la hemolinfa (Park *et al*., 2005) y la producción de super-óxido de los hemocitos de insecto (Dettloff & Wiesner, 1999). La proteína fue encontrada por participar en reacciones inmunes como una proteína de unión a LPS (LBP) o como un potenciador de la actividad bacteriolítica en la hemolinfa, pero no participó en las funciones de transporte de lípidos (Bulet *et al*., 1999; Casteels, 1998). Creemos que es probable que ApoLpIII, estimule la actividad antimicótica en la hemolinfa de *G. mellonella.*

La proteína de hemolinfa 27 kDa precursor (P27k, P83632) ha sido poco estudiada, y se sabe muy poco acerca de ella en los lepidópteros. Una proteína similar en la hemolinfa, Spz C-106, controla la expresión del péptido antifúngico Drosomycin (DRS), actuando como un ligando de Toll 1 y en la inducción de una vía de señalización intracelular (Weber *et al*., 2003). En nuestro estudio, es evidentemente la presencia de esta proteína en la hemolinfa

antes de la infección y está sobre-expresada, incluso a 25°C. Sin embargo, su expresión se incrementó notablemente a 37°C. Estos resultados son sorprendentes porque, sobre la base de nuestro meta-análisis previo, esta notable expresión fue inesperada. Richards y Edwards (1999), detectaron el precursor de proteína de hemolinfa 27kDa, después de 3 días de parasitación. Nuestros resultados indican que la invasión de microconidias estimula esta expresión después de 2 días.

El precursor de proteína catiónica 8 (CP8, ADI87454) fue una proteína abundante que fue notablemente sobre-expresada a 25°C o 37°C en respuesta a la infección fúngica. Esta proteína es un receptor multiligando que puede reconocer tres microorganismos seleccionados en otros estudios: *Escherichia coli, Micrococcus luteus, y C. albicans* (Kim *et al*., 2010). Los autores trataron de determinar cuáles respuestas inmunes fueron causadas por la unión de la proteína a estos microorganismos. De acuerdo con sus resultados, CP8 en *G. mellonella* presentó actividad opsonina para la fagocitosis de los tres microorganismos por los hemocitos (Kim *et al*., 2010). Los datos iTRAQ proporcionados para esta proteína mostraron una elevada sobre-expresión con la invasión de las dos concentraciones de microconidias (10^4 y 10^6), a 37°C.

La proteína de hemolinfa larval (LHP, ABG91580) detectada por iTRAQ, mostró que esta glicoproteína es sub-expresada a 25°C, pero sobre-expresada a 37°C, en respuesta a la infección. Esta proteína se considera como una glicoproteína de almacenamiento que puede tener diferentes grados de glicosilación, incluyendo diferentes modelos y tamaños moleculares (LHP74, 76, 76) 81, 82 y 84 (Miller & Silhacek, 1982). La expresión de los dos genes LHP de secuencias conocidas (Lhp76 y Lhp82) fueron controlados tanto en larvas de *G. mellonella* en diapausa como las larvas que no estaban en diapausa (Godlewski *et al*., 2001; Godlewski *et al*., 2003). Sin embargo, esos excepcionales estudios no fueron específicos para las respuestas inmunes, y en la actualidad, esta proteína es poco investigada en *G. mellonella*, a diferencia de décadas pasadas durante las cuales se estudió profusamente esta proteína (Miller & Silhacek, 1982; Levenbook, 1985; Ray *et al*., 1987).

La Hexamerina (AAA19801) fue otra proteína abundante en los resultados de *G. mellonella* con la infección con microconidias, la proteína es sub-expresada a 25°C y es sobre-expresada a 37°C en respuesta a la infección. Las hexamerinas de almacenamiento son importantes miembros de la superfamilia de hemocianinas. Aunque los insectos tienen hexamerinas de almacenamiento, se sabe muy poco acerca de sus caracteres o funciones específicas en *G. mellonella* y en general en los insectos (Tang *et al*., 2010). Las hexamerinas tienen funciones primordiales en metamorfosis de insectos, pero también pueden tener funciones fuera de su papel en el almacenamiento, potencialmente, incluso en la respuesta inmune (Ramos Martins & Bitondi, 2012).

La proteína de unión a la hormona juvenil (JHBP, AAN06604) es uno de los principales reguladores del desarrollo de los insectos y la reproducción. Es crucial para el adecuado desarrollo del insecto, actuando como un transportador, protector y depósito de la altamente hidrofóbica y químicamente lábil hormona juvenil, JH (de Kort & Granger, 1996). Se ha demostró que la expresión se mantiene a un nivel constante cuando las larvas de *G.*

mellonella fueron desafiadas con β-glucano (Mowlds *et al*., 2010). Se ha encontrado que JHBP sub-regula la transferrina (Geiser & Winzerling, 2012) y que se une a apolipoforina, arylforina y hexamerina en la hemolinfa, cada una de las cuales están implicadas en el tráfico molecular de JHBP (Zalewska *et al*., 2009). Estos resultados están en concordancia con nuestros hallazgos, donde es probable que JHBP esté interactuando con arylforina, apolipoforina, hexamenrin (alta concentración) y con precursores de transferrina. En nuestro estudio, JHBP mantuvo casi la misma concentración a 25°C después de la infección con microconidios, sin embargo, fue sobre-expresada a 37°C.

La transferrina tiene la capacidad de eliminar iones de hierro esenciales para resistir la invasión de patógenos, retardando de este modo la colonización microbiana del hemocele del insecto (Seitz *et al*., 2003). Banville *et al.*, (2012) encontraron que los precursores de ferritina y transferrina, se redujeron en la expresión en aproximadamente un 50% en las larvas privadas de alimentos. En nuestro estudio, el precursor de transferrina (AAQ63970) se había sub-expresado a 25°C, pero se fue sobre-expresada a 37°C. Seitz, *et al*, 2003 han encontrado genes que mostraron homologías con moléculas tales como transferrina, que es conocida por estar involucrada en la inmunomodulación después de la infección bacteriana en *G. mellonella*. La transferrina, que es bien conocida por su papel en la eliminación de los iones de hierro en los vertebrados, creando así entornos desfavorables para las bacterias (Kumagai *et al*., 1992), también podría estar involucrada en estrategias antibacterianas de retención de hierro en los insectos (Ciencialova *et al*., 2008). Es probable que la transferrina participe en la inmunomodulación después de la infección micótica para crear un ambiente desfavorable en la hemolinfa para la invasión de hongos, debido a la eliminación de hierro el cual es muy importante para los patógenos. La transferrina actúa como un mediador antimicótico, previene el estrés oxidativo y mejora la supervivencia contra las infecciones.

La Hemolina (ACU09501), es un miembro de la superfamilia de proteínas de inmunoglobulina, interactúa en Lepidóptera como una opsonina, en la defensa contra patógenos potenciales y puede jugar un papel en la morfogénesis de tejidos. La Hemolina también parece estar implicada en la defensa de insectos contra las infecciones virales (Terenius, 2008), pero no exhibe actividad antibacteriana directa. Se ha encontrado que podría estar sobre-expresada hasta 18 veces después de la inyección de bacterias en pupas de *Hyalophora cecropia* y de 30 a 40 veces más en larvas de *M. sexta* (Bettencourt *et al.*, 1997) se cree que esta proteína es la principal proteína inducible contra hongos en la hemolinfa. En nuestro caso, encontramos resultados similares debido a que la proteína fue sobre-expresada de 5 a 10 veces con 10^4-10^6 microconidias/mL de *F. oxysporum* a 37°C. El mecanismo incluye la interacción viral con la hemolina anclada a la membrana celular de los hemocitos, debido a que hemolina se asocia con los hemocitos (Ladendorff & Kanost, 1991; Zhao & Kanost, 1996), su función como opsonina facilita el reconocimiento de patógenos y median las respuestas inmunes hemocíticas (Lanz-Mendoza *et al*., 1996; Yu *et al*., 2002). Consideramos que hemolina ha mostrado una actividad importante en la respuesta inmune antimicótica, dado que su expresión siempre fue sobre-expresada cuando la temperatura o la concentración de microconidias fueron elevadas.

También se encontró que profenoloxidasa (POO, AAK64363) y la subunidad profenoloxidasa 2 (PPOs2, AAQ75026) son proteínas importantes en la respuesta inmune. Estas proteínas forman el otro grupo de proteínas encontrada en este estudio, similar a apolipoforinas y hexamerinas. En general, se produce fenoloxidasa en la hemolinfa o en hemocitos de artrópodos en su forma inactiva, llamada profenoloxidasa proenzima (PPO) (Ashida & Yamazaki, 1990; Brunet, 1980). La activación de la profenoloxidasa desencadena la reacción enzimática que sintetiza quinonas citotóxicas. La última proteína puede ser tóxica para el tejido huésped si no es expresada en el sitio de la infección (Mylonakis *et al*., 2005). La proteína se ha estudiado después de la invasión de microconidias, las hemolinfas de larvas que recibieron una inyección de 10^5 conidios de *A. fumigatus* mostraron la mayor unión de PPO a los conidios en comparación con las hemolinfas de larvas de control; sin embargo, todos los pre-tratamientos resultaron en niveles más altos de esta proteína de unión (Fallon *et al*., 2011). No hubo pruebas de una interacción entre el sistema de coagulación y la activación de la cascada de profenoloxidasa (Li *et al*., 2002).

Una defensa importante en el sistema inmune innato en invertebrados en respuesta a agentes patógenos o a tejidos dañados, es la melanización. Este proceso constituye la primera defensa humoral y es controlado por la enzima fenoloxidasa (PO) (Cerenius & Söderhäll, 2004). El sistema proPO-activación se activa por la presencia de pequeñas cantidades de compuestos de orígenes microbianos, tales como β-1,3-glucanos, lipopolisacáridos, y peptidoglicanos, asegurando que el sistema se active en presencia de agentes patógenos potenciales (Cerenius & Söderhäll, 2004). Hemos encontrado que las proteínas PPO y PPO subunidad 2, tenían los mismos patrones de expresión con diferentes tratamientos y mantuvieron la misma concentración a 25°C, con o sin infección con microconidias. Sin embargo, estas proteínas fueron significativamente sobre-expresadas con 10^4-10^6 microconidias/mL de *F. oxysporum* a 37°C.

Las Lisozimas (P82174) son las enzimas antibacterianas mejor estudiadas y actúan como modelo para estudios de estructura-función (Jolles & Jolles, 1984). Sin embargo, estas proteasas han sido poco estudiadas en los sistemas inmunes innatos de insectos. La respuesta inmune del insecto está mediada por las proteínas de reconocimiento de patrones que señalan a los efectores de expresión, incluyendo la proteína lisozima antibacteriana (Kanost *et al*., 2004; Sotelo-Mundo *et al*., 2007). Encontramos que lisozima comprende importantes actividades enzimáticas antimicóticas, como se ha señalado por su actividad antiviral o antibacteriana en muchos estudios *in vitro*. Hemos observado la notable sobre-expresión de lisozimas en todos los tratamientos con microconidias en comparación con los controles. Parece que las lisozimas toman otras funciones además de degradar la pared celular bacteriana, y se ha demostrado que esta proteasa inhibe la actividad enzimática de la fenoloxidasa de mosquito, modulando de esta manera la melanización (Li & Paskewitz, 2006; Mak et al., 2001).

Recientemente, el estudio de Banville *et al*. (2012) demostró la expresión reducida de una serie de péptidos antimicrobianos que son regulados en la expresión de una variedad de proteínas asociadas con la respuesta inmune. Nos pareció que era una coincidencia

interesante que el péptido tipo cecropina-D (P85210) y el péptido antimicrobiano aniónico 2 (P85216) estuvieron presentes en bajas concentraciones las cuales iTRAQ fue capaz de detectar, siendo lo más probable, que sea la técnica más exacta para el estudio de estos péptidos. Las cecropinas pueden normalmente ofrecer protección contra bacterias, pero encontramos una marcada sub-regulación de Cecropina-D como del péptido aniónico antimicrobiano 2. En larvas desafiadas con el hongo, estos péptidos fueron ligeramente sobre-regulados a 37°C, en comparación con los controles y con otras proteínas. Es posible que estos péptidos sean de los más importantes en la respuesta inmune de los insectos a las bacterias, de acuerdo con Mak *et al.*, 2001, pero son irrelevantes para la respuesta inmunes a los hongos. Deben llevarse a cabo otros estudios para aclarar mejor su papel final *in vivo*, ya que estos péptidos han sido bien estudiados *in vitro*, (Cytryńska *et al*., 2007; Hultmark *et al*., 1982; Brogden *et al*., 2003). Un interesante estudio del transcriptoma llevado a cabo por Vogel *et al*. (2011), ha catalogado las respuestas inmunes de un gran número de péptidos y proteínas contra lipopolisacáridos. En nuestro estudio con el hongo, encontramos una baja expresión del inhibidor de la proteasa serina; sin embargo, creemos que todavía es difícil correlacionar la respuesta inmune entre el transcriptoma y proteoma con diferentes antígenos.

4.3 Expresión en la respuesta inmune y la estructura de dos reconocidas proteínas ortólogas

A diferencia de las proteínas más recientemente discutidas, actina (AGR44824 de *B. mori*) y la proteína celular de unión a ácido retinoico (CRABP, familia lipocallin), han sido bastante bien estudiadas, aunque, todavía no se han anotado en *G. mellonella* y están asociadas a muchos procesos biológicos, incluyendo la respuesta inmune. En este estudio, la expresión de actina fue sobre-expresada de forma continua con cualquier concentración de microconidias o cualquier temperatura establecida. Este resultado está de acuerdo con los otros autores, porque actina-5C, una de las dos proteínas del citoesqueleto, es sobre-expresada después de tratamientos cortos con H_2O_2 u otras situaciones de estrés, como la anoxia o tratamiento con etanol en *D. melanogaster* (Courgeon *et al*., 1993). El análisis genómico funcional de la fagocitosis también estableció la participación de proteínas de regulación de actina del citoesqueleto en la inmunidad innata de *D. melanogaster* (Rämet *et al*., 2002). Durante el curso de una infección, las células inmunes migran hacia el sitio de entrada microbiana con el objetivo de eliminar los agentes patógenos. Este proceso requiere no sólo la migración de células sino también cambios en la adhesión celular y la fagocitosis, que universalmente depende de la dinámica de la red de actina, es decir, la polimerización o despolimerización de filamentos de actina (Fauvarque & Williams, 2011).

La proteína de unión a ácido retinoico celular [Cellular retinoic acid binding protein] (CRABP, EHJ79039 de *D. plexippus*), es un importante portador de ácido retinoico (RA o vitamina A), y en los mamíferos, está implicada en la inflamación y la desintoxicación. RA es un agente quimioterapéutico potencial en el tratamiento de cáncer (Lotan, 1996; Chomienne *et al*., 1996) y es crítica como un regulador de la apropiada función de la piel (Fisher & Voorhees, 1996). Hay pocos estudios sobre CRABP y el sistema inmune innato en los insectos; Sin embargo, varios trabajos han caracterizado la proteína en otros organismos (Mansfield *et al*., 1998; Evans & Wheeler, 1999). Esta es una cuestión

importante en los mamíferos porque RA es un modulador clave del sistema inmune innato (Wojtal *et al*., 2013). Al igual que en otras proteínas en nuestro estudio, CRABP se había sub-expresado con 10^4 microconidias/mL a 25°C, pero fue sobre-expresada a 37°C (no significativo). CRABP tampoco se vio afectada, en otra palabras, se producen resultados similares a los observados con los controles, con 10^6 microconidias/mL a 37°C, mostrando que probablemente CRABP transporta RA y lípidos durante condiciones de estrés para estimular el sistema inmune.

El enfoque iTRAQ no sólo fue útil para detectar y cuantificar los péptidos, también lo fue para determinar estructuras de proteínas. Fue interesante abordar un análisis estructural en 3D usando péptidos de secuencia porque la información de proteínas homólogas en especies cercanas, ha sido bien apoyada, y la estructura de la proteína ha sido investigada a fondo. Actina ha sido estudiada en los insectos (Manseau *et al*., 1998) y las estructuras tridimensionales se han caracterizado en *D. melanogaster*, tales como la estructura de actina 3MN6 en el Protein Data Bank (Ducka *et al*., 2010). En comparación con la actina de otros lepidópteros o de insectos, nuestros péptidos se conservan de manera significativa, lo que permite la inferencia de la estructura secundaria o terciaria de la actina. Incluso si la estructura de la actina de *G. mellonella* es ligeramente diferente de la actina de *D. mellanogaster*, la similaridad de 7 péptidos con la actina de *D. plexippous*, permite el estudio de tales estructuras en Lepidoptera. Las sustituciones no sinónimas no parecen cambiar la estructura básica de la actina del insecto, como se determina con *D. mellanogaster* 3MN6. Una delección estaba presente sólo en la última AA C-terminal, y el número de α-hélices y β-hojas hipotéticas no cambió dominios

La estructura de CRABP ha sido bien estudiada en humanos (Chaudhuri *et al*., 1999), y las estructuras tridimensionales se han examinado en la estructura de *B. taurus*, 2CBR CRABP (Protein Data Bank). La similaridad estructural de CRABPs entre los insectos y mamíferos es considerable, reflejando sus funciones conservadas entre los animales (Chaudhuri *et al*., 1999). En *M. sexta*, la estructura de la proteína notablemente similar a la de ratones y de *B. taurus*, como en nuestro caso (Mansfield *et al*., 1998). Las sustituciones no sinónimas no cambiaron la estructura básica o dominios. Finalmente, el número de α-hélices y β-hojas hipotéticas era un poco más corto o más largo que en la proteína de vaca 2CBR CRABP.

4.4. Proteínas de *F. oxysporum*

Las cuatro proteínas de *F. oxysporum* identificadas en este estudio: FOXB_00653, FPSE_10944, FOXB_16 FOXB_13674, no habían sido descritas en esta actividad de ataque o virulencia. Especialmente se destaca la proteína HSP90 de *F. oxysporum* FOXB_00653. Esta proteína chaperona siempre está presente dentro de la célula y según Parsell y Lindquist, (1993), esta proteína constitutiva es la más abundante en condiciones de estrés en todas las células eucariotas.

La proteína hipotética FOXB_00653 de *F. oxysporum* es una proteína tipo Histidina-ATPasa-N-terminal-C-HSP90 ya bien caracterizada estructuralmente (Ali *et al*., 2006). Esta una proteína de la superfamilia del dominio ATPase de HSP90, chaperona que tiene varias funciones importantes para la célula, es una proteína que asiste a otras proteínas en el

ensamblaje, estabilizando otras proteínas contra el estrés calórico y la degradación. Muy seguramente esta proteína es excretada por *F. oxysporum* para tratar de estabilizar las proteínas del hongo contra el ataque de las proteínas de *G. mellonella*. Dado que *F. oxysporum* resiste la temperatura de 37°C esta proteína es una de las contribuiría a esa resistencia. Por esta razón este trabajo de investigación sugiere el nombre de FoxHATPcHSP90. Igualmente la proteína FPSE_10944, en cual su péptido alineó con *F. gramineum*, alinea otros dos péptidos diferente a FOXB_00653, indicando que el gen HSP90 de la cepa Foxy-GIEM de *F. oxysporum*, difiere en algunas bases y aminoácidos de la secuencia de HSP90 publicada de *F. oxysporum*.

Aunque se esperaba encontrar muchas más proteínas de *F. oxysporum*, una hipótesis que se puede manejar, es que a las 48 horas la gran mayoría de microconidias fueron atrapadas por una red de glicolípidos de la hemolinfa, atrapando muy posiblemente, una gran cantidad de proteínas del hongo.

4.5 Proteínas *L. plantarum* y *G. mellonella*

A pesar de la dificultad para identificar proteínas de *L. plantarum*, esta bacteria láctica no patógena, estimuló de manera significativa y diferencial proteínas que no habían sido estimuladas solo con la adición del hongo (tasa 119:121). Igualmente se observa que la bacteria sola no produjo efecto en las proteínas (tasa 121:119). De estas nuevas proteínas caracterizadas se destaca la proteína 32 kDa ferritina, ésta proteína permite el almacenamiento de hierro en los insectos, el cual es altamente tóxico (Kim *et al.*, 2004). Muy posiblemente esta proteína facilita hierro en defensa del ataque del hongo.

Otra proteína es el precursor de beta 1,3 glucano, esta proteína completa (ensamblada todas las precursoras) es importante en respuesta inmune, y ha sido previamente caracterizada en lepidópteros, la cual es una proteína de reconocimiento de peptidoglicanos (Kanost *et al.*, 2004) e interactúa con otra proteína llamada proteína de reconocimiento de peptidoglicano la cual fue también identificada en este estudio.

El factor 4 de crecimiento imaginal de disco, es una proteína bien caracterizada en *D. melanogaster*. Las estructuras epidermales de los adultos de la mosca, se derivan de las hojas larvales de las celulas epiteliales llamadas discos imaginales. Esta proteína pertenece a una nueva familia de glicosil hidrolasa (Varela *et al.*, 2002).

Otra proteína importante que se sobre-expresó en este estudio, fue la proteína rica en prolina (prolin rich), que ha sido muy estudiada en el sistema inmune de vertebrados y especialmente mamíferos y humanos, dado que se encuentra en la saliva; en insectos igualmente se conoce bien su papel de defensa en el sistema inmune innato contra polifenoles tóxicos, en nuestro caso polifenoles o taninos provenientes de *F. oxyspurum* los cuales pueden ser altamente tóxicos (Mak *et al.*, 2010; Mak *et al.*, 2001).

Finalmente otras proteínas importantes que fueron encontradas en este sistema, las cuales resta aclarar su papel, fueron: gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa, isocitrato

deshidrogenasa, HSP60 de *G. mellonella*, proteína hipotética TREMEDRAFT_44037, y el inhibidor de proteasa tipo Kunitz.

5. CONCLUSIONES

Como en otros trabajos, nuestro estudio verificó que el uso de etiquetas isobáricas para cuantificación relativa y absoluta (iTRAQ) de la expresión de proteínas es una poderosa herramienta proteómica que se puede combinar con la precisión de la espectrometría de masas para la identificación de proteínas. Esta herramienta constituye un método consistente para detectar proteínas asociadas con el sistema inmune innato de *G. mellonella* en respuesta a la infección causada por *F. oxysporum.* Además, iTRAQ es un enfoque proteómico cuantitativo fiable para detectar y cuantificar los niveles de expresión de proteínas del sistema inmune y péptidos, que muestra expresiones diferenciales con diferentes temperaturas y concentraciones de microconidias, especialmente cuando las larvas fueron resistentes al tratamiento con microconidias. Nuestro estudio proteómico nos permitió un seguimiento del mejoramiento de la respuesta inmune de *G. mellonella* contra desafíos con *F. oxysporum* a 37°C. En particular, se encontró que con 10^4 microconidias/mL a 37°C se sobre-expresaron muchas más proteínas que con otros tratamientos. Es probable que la mayoría de las 17 proteínas principales contribuyeran a la supervivencia de las larvas mediante la protección contra la infección por el hongo, aprovechando el choque térmico, lo que genera un beneficio real en términos de aptitud evolutiva.

La técnica iTRAQ también permitió identificar proteínas del patógeno, no en la misma proporción del huésped. Como hipótesis se puede inferir que es necesario un mejor tratamiento de las proteínas, pues gran cantidad de proteínas de *F. oxysporum* quedan atrapadas entre los glicolípidos antimicrobianos de la hemolinfa. Quizás el mismo efecto pudo suceder con los péptidos de *L. plantarum*. Ésta técnica permitió identificar más de 63 proteínas de *G. mellonella* y *F. oxysporum*, y se logró estudiar en varias de ellas, su regulación bajo condiciones de estrés, su actividad en el sistema inmune e inferir su estructura. En total 29 proteínas de *G. mellonella* y 1 de *F. oxysporum* pudieron ser caracterizadas en este modelo huésped-patógeno.

6. BIBLIOGRAFÍA

Adav SS, Li AA, Manavalan A, Punt P, Sze SK. Quantitative iTRAQ secretome analysis of Aspergillus niger reveals novel hydrolytic enzymes. J. Proteome Res 2010;9(8):3932-3940.

Ali MMU, Roe SM, Vaughan C, Meyer P, Panaretou B, Piper PW, *et al*. Crystal structure of an Hsp90-nucleotide-p23/Sba1 closed chaperone complex. Nature. 2006;440:1013.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 1990;215:403–410.

Andrejko M, Mizerska-Dudka M, Jakubowicz T. Antibacterial activity in vivo and in vitro in the hemolymph of *Galleria mellonella* infected with *Pseudomonas aeruginosa.* Comp. Biochem. Physiol. B. 2009;152:118–123.

Aperis G, Fuchs BB, Anderson CA, Warner JE, Calderwood SB, *et al.* *Galleria mellonella* as a model host to study infection by the *Francisella tularensis* live vaccine strain. Microbes Infect. 2007;9:729–734.

Applied Biosystems AB Sciex. Protocol. iTRAQ Reagents - 8 plex. Amine-Modifying Labeling Reagents for Multiplexed Relative and Absolute Protein Quantitation. AB Sciex Pte Ltd. 2010.

Ashida M, Yamazaki HI. Biochemistry of the phenoloxidase system in insects: With special respect to its activation, in Molting, and Metamorphosis. In: Ohnishi E, Ishizaki H, editors. Tokyo: Japan Sci. Soc. Press. 1990;pp:239-256.

Assaf C, Goerdt S, Seibold M, Orfanos C. Clinical picture Cutaneous hyalohyphomycosis. Lancet. 2000;356:1185.

Banville N, Browne N, Kavanagh K. Effect of nutrient deprivation on the susceptibility of *Galleria mellonella* larvae to infection. Virulence. 2012;3:497–503.

Bender JK, Wille T, Blank K, Lange A, Gerlach RG. LPS structure and PhoQ activity are important for Salmonella Typhimurium virulence in the *Galleria mellonella* infection model. PLoS One. 2013;8:e73287.

Bergin D, Reeves EP, Renwick J, Wientjes FB, Kavanagh K. Superoxide Production in *Galleria mellonella* Hemocytes : Identification of Proteins Homologous to the NADPH Oxidase Complex of Human Neutrophils. Infect. Immun. 2005;73:4161-4170.

Bettencourt R, Lanz-Mendoza H, Lindquist KR, Faye I. Cell adhesion properties of hemolin, an insect immune protein in the Ig superfamily. Eur. J. Biochem. 1997;250:630–637.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 1976;72:248–254.

Brennan M, Thomas DY, Whiteway M, Kavanagh K. Correlation between virulence of *Candida albicans* mutants in mice and *Galleria mellonella* larvae. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 2002;34:153–157.

Brogden KA, Ackermann M, McCray Jr PB, Tack BF. Antimicrobial peptides in animals and their role in host defences. Int. J. Antimicrob. Agents. 2003;22:465–478.

Brunet PCJ. The metabolism of the aromatic amino acids concerned in the cross-linking of insect cuticle. Insect Biochem. 1980;10:467-500.

Bulet P, Hetru C, Dimarcq JL, Hoffmann D. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. Dev. Comp. Immunol. 1999;23(4-5):329–344.

Casteels P. Immune response in Hymenoptera. In: Brey PT, Hultmark D, editors. Molecular mechanisms of immune responses in insects. London: Chapman & Hall.1998;92–110.

Cerenius L, Söderhäll K. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. Immunol. Rev. 2004;198:116–126.

Chamilos G, Lionakis MS, Lewis RE, Kontoyiannis DP. Role of mini-host models in the study of medically important fungi. Lancet Infect Dis. 2007;7:42–55.

Champion OL, Cooper IAM, James SL, Ford D, Karlyshev A, *et al.* *Galleria mellonella* as an alternative infection model for *Yersinia pseudotuberculosis*. Microbiology. 2009;155:1516–1522.

Chaudhuri BN, Kleywegt GJ, Broutin-L'Hermite I, Bergfors T, Senn H, *et al.* Structures of cellular retinoic acid binding proteins I and II in complex with synthetic retinoids. Acta Crystallogr. 1999;55:1850–1857.

Chomienne C, Fenaux P, Degos L. Retinoid diferentiation therapy in promyelocytic leukemia. FASEB J. 1996;10:1025–1030.

Ciencialova T, Neubauerova M, Sanda R, Sindelka J, Cvacka Z, *et al.* Mapping the peptide and protein immune response in the larvae of the fleshfly *Sarcophaga bullata.* J. Pept. Sci. 2008;14:670–682.

Coleman JJ, Muhammed M, Kasperkovitz PV, Vyas JM, Mylonakis E. *Fusarium* pathogenesis investigated using *Galleria mellonella* as a heterologous host. Fungal Biol. 2011;115(12):1279–1289.

Contreras E, Rausell C, Real MD. Proteome Response of *Tribolium castaneum* Larvae to *Bacillus thuringiensis* Toxin Producing Strains. Plos One. 2013;8(1):e55330.

Courgeon AM, Maingourd M, Maisonhaute C, Montmory C, Rollet E, *et al.* Effect of hydrogen peroxide on cytoskeletal proteins of Drosophila cells: comparison with heat shock and other stresses. Exp. Cell. Res. 1993;204:30-37.

Cytryska M, Mak P, Zdybicka-Barabas Z, Suder P, Jakubowicz T. Purification and characterization of eight peptides from *Galleria mellonella* immune hemolymph. Peptides. 2007;28:533-546.

de Kort CAD, Granger NA. Regulation of JH titers: the relevance of degradative enzymes and binding proteins. Arch. Insect Biochem. Physiol. 1996;33:1–26.

Dettloff M, Wiesner A. Immune stimulation by lipid-bound apolipophorin III. In: Wiesner A, Dunphy GB, Marmaras VJ, Morishima I, Sugumaran M, Yamakawa M, editors. Techniques in Insect Immunology. Fair Haven: SOS Publications. 1999;243–251.

Dodds PN, Rafiqi M, Gan PHP, Hardham AR, Jones DA, Ellis JG. Effectors of biotrophic fungi and oomycetes: pathogenicity factors and triggers of host resistance. New Phytol. 2009;183:993–1000.

Ducka AM. Joel P, Popowicz GM, Trybus KM, Schleicher M, *et al.* Structures of actin-bound Wiskott-Aldrich syndrome protein homology 2 (WH2) domains of Spire and the implication for filament nucleation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010;107:11757–11762.

Duncan AB, Agnew P, Noel V, Demettre E, Seveno M, Brizard J-P, Michalakis Y. Proteome of *Aedes aegypti* in response to infection and coinfection with microsporidian parasites Ecol. Evol. 2012;681-689.

Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucleic Acids Res. 2004;32:1792–1797.

Fallon JP, Troy N, Kavanagh K. Pre-exposure of *Galleria mellonella* larvae to different doses of *Aspergillus fumigatus* conidia causes differential activation of cellular and humoral immune responses. Virulence. 2011;2:413–421.

Fauvarque MO, Williams MJ. *Drosophila* cellular immunity: a story of migration and adhesion. J. Cell. Sci. 2011;1:1373-1382.

Ferreira de Oliveira JMP, de Graaff LH. Proteomics of industrial fungi: trends and insights for biotechnology. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2011;89:225–237.

Fisher GJ, Voorhees JJ. Molecular mechanisms of retinoid actions in skin. FASEB J. 1996;10:1002–1013.

Fraser, MJ, Smith GE, Summers MD. Acquisition of Host Cell DNA Sequences by Baculoviruses: Relationship Between Host DNA Insertions and FP Mutants of Autographa *californica* and *Galleria mellonella* Nuclear Polyhedrosis Viruses. J. Virol. 1983;47:287–300.

Fuchs BB, O'Brien E, El Khoury JB, Mylonakis E. Methods for using *Galleria mellonella* as a model host to study fungal pathogenesis. Virulence. 2010;1(6):475–482.

Gan CS, Chong PK, Pham TK, Wright PC. Technical, experimental, and biological variations in isobaric tags for relative and absolute quantitation (iTRAQ). J. Proteome Res. 2007;6(2):821−827.

Geiser DL, Winzerling JJ. Insect transferrins: multifunctional proteins. Biochim. Biophys. Acta. 2012;1820:437–451.

Glen A, Gan CS, Hamdy FC, Eaton CL, Cross SS, Catto JW, *et al.* iTRAQ-facilitated proteomic analysis of human prostate cancer cells identifies proteins associated with progression. J. Proteome Res. 2008; *7*(3): 897-907.

Godlewski J, Kludkiewicz B, Grzelak K, Cymborowski BX. Expression of larval hemolymph proteins (Lhp) genes and protein synthesis in the fat body of greater wax moth (*Galleria mellonella*) larvae during diapause. J. Insect Physiol. 2001;47:759–766.

Godlewski J, Kłudkiewicz B, Grzelak K, Beręsewicz M, Cymborowski BX. Hormonal regulation of the expression of two storage proteins in the larval fat body of the greater wax moth (*Galleria mellonella*). J. Insect Physiol. 2003;49:551–559.

González-Fernández R, Prats E, Jorrín-Novo JV. Proteomics of Plant Pathogenic Fungi. J. Biomed. Biotechnol. 2010;ID 932527:1-36.

Hansen IA, Gutsmann V, Meyer SR, Scheller K. Functional dissection of the hexamerin receptor and its ligand arylphorin in the blowfly *Calliphora vicina*. Insect. Mol. Biol. 2003;12:427–432.

Harding CR, Schroeder GN, Reynolds S, Kosta A, Collins JW, *et al.* *Legionella pneumophila* pathogenesis in the *Galleria mellonella* infection model. Infect. Immun. 2012;80:2780–2790.

Houterman PM, Cornelissen BJC, Rep M. Suppression of Plant Resistance Gene-Based Immunity by a Fungal Effector. PLoS Pathogens. 2008;4(5):e1000061.

Hultmark D, Engstrom A, Bennich H, Kapur R, Boman HG. Insect Immunity: Isolation and Structure of Cecropin D and Four Minor Antibacterial Components from Cecropia Pupae. Eur. J. Biochem. 1982;217:207–217.

Jackson JC, Higgins L, Lin X. Conidiation color mutants of *Aspergillus fumigatus* are highly pathogenic to the heterologous insect host *Galleria mellonella*. PLoS One 2009;4:e4224.

Jander G, Rahme LG, Ausubel FM. Positive correlation between virulence of *Pseudomonas aeruginosa* mutants in mice and insects. J. Bacteriol. 2000;182(13):3843–3845.

Jolles P, Jolles J. What's new in lysozyme research? Always a model system, today as yesterday. J. Mol. Cell. Biochem. 1984;63:165–189.

Kanost MR, Jiang H, Yu XQ. Innate immune responses of a lepidopteran insect, *Manduca sexta.* Immunol Rev. 2004;198:97–105.

Kelley LA, Sternberg MJE. Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. Nat. Protoc. 2009;4:363–371.

Kim CH, Shin YP, Noh MY, Jo YH, Han YS, *et al.* An insect multiligand recognition protein functions as an opsonin for the phagocytosis of microorganisms. J. Biol. Chem. 2010;285:25243–25250.

Kim BS, Lee CS, Seol JY, Yun CY, Kim HR. Cloning and expression of 32 kDa ferritin from Galleria mellonella. Arch. Insect Bioch.Physiol. 2002;51(2):80-90.

Kingsmore SF. Multiplexed protein measurement: technologies and applications of protein and antibody arrays. Nat. Rev. Drug. Discov. 2006;5:310–320.

Kumagai T, Awai M, Okada S. Mobilization of iron and iron-related proteins in rat spleen after intravenous injection of lipopolysaccharides (LPS). Pathol. Res. Pract. 1992;188:931–941.

Ladendorff NE, Kanost MR. Bacteria-induced protein-P4 (hemolin) from Manduca sexta—a member of the immunoglobulin superfamily which can inhibit hemocyte aggregation. Arch. Insect Biochem. Physiol. 1991;18:285–300.

Lanz-Mendoza H, Bettencourt R, Fabbri M, Faye I. Regulation of the insect immune response: the effect of hemolin on cellular immune mechanisms. Cell Immunol. 1996;169:47–54.

Larkin M, Blackshields G, Brow, NP, Chenna R. McGettigan P, *et al*. Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinforma. Appl. Note. 2007;23:2947–2948.

Lebreton F, Le Bras F, Reffuveille F, Ladjouzi R, Giard JC, Leclercq RCV. *Galleria mellonella as a model for studying Enterococcus faecium* host persistence . J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 2011;21:191–196.

Levenbook L. Insect storage proteins. In: Kerkut GA, Gilbert LI, editors. Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology. Oxford: Pergamon Press. 1985;307–346.

Li B, Paskewitz SM. A role for lysozyme in melanization of Sephadex beads in Anopheles gambiae. J. Insect Physiol. 2006;52:936–942.

Li D, Scherfer C, Korayem a M, Zhao Z, Schmidt O, Theopold U. Insect hemolymph clotting: evidence for interaction between the coagulation system and the prophenoloxidase activating cascade. Insect Biochem Mol Biol. 2002;32(8):919–928.

Lotan R. Retinoids and their receptors in modulation of differentiation, development, and prevention of head and neck cancers. Anticancer Res. 1996;16:2415–2420.

Maeda K, Nagata H, Ojima M, Amano A. Proteomic and Transcriptional Analysis of Interaction between Oral Microbiota Porphyromonas gingivalis and Streptococcus oralis. J. Proteome Res 2014;*in press.*

Mak P, Zdybicka-Barabas A, Cytryńska M. A different repertoire of Galleria mellonella antimicrobial peptides in larvae challenged with bacteria and fungi. Dev Comp Immunol. 2010;34(10):1129–1136.

Mak P, Chmiel D, Gacek GJ. Antibacterial peptides of the moth *Galleria mellonella*. Acta Biochim. Pol. 2001;48:1191–1195.

Manseau LJ, Ganetzky B, Craigt EA. Molecular and genetic Characterization of the *Drosophila melanogaster* 87E Actin Gene Region. Genetics. 1988;119:407–420.

Mansfield SG, Cammer S, Alexander SC, Muehleisen DP, Gray RS, *et al*. Molecular cloning and characterization of an invertebrate cellular retinoic acid binding protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998;95:6825–6830.

Miller SG, Silhacek DL. Identification and purification of storage proteins in tissues of the greater wax moth *Galleria mellonella*. Insect Biochem. 1982;12:277–292.

Miyata S, Casey M, Frank DW, Frederick M, Ausubel FM. Use of the *Galleria mellonella* Caterpillar as a Model Host To Study the Role of the Type III Secretion System in *Pseudomonas aeruginosa* Pathogenesis. Infect. Immun. 2003;71:2404–2413.

Mowlds P, Coates C, Renwick J, Kavanagh K. Dose-dependent cellular and humoral responses in *Galleria mellonella* larvae following beta-glucan inoculation. Microbes Infect. 2010;12:146–153.

Mowlds P, Kavanagh K. Effect of pre-incubation temperature on susceptibility of *Galleria mellonella* to infection by *Candida albicans*. Mycopathologia. 2008;165:5-12.

Mukherjee K, Altincicek B, Hain T, Domann E, Vilcinskas A, Chakraborty T. *Galleria mellonella* as a model system for studying *Listeria* pathogenesis. Appl. Environ. Microbiol. 2010;76:310–317.

Mylonakis E. *Galleria mellonella* and the Study of Fungal Pathogenesis: Making the Case for Another Genetically Tractable Model Host. Mycopathologia. 2008;165:1–3.

Mylonakis E, Moreno R, El Khoury JB, Idnurm A, Heitman J, Calderwood SB, *et al*. *Galleria mellonella* as a Model System To Study *Cryptococcus neoformans* Pathogenesis. Infect Immun. 2005;73(7):3842–3850.

Navarro-Velasco GY, Prados-Rosales RC, Ortíz-Urquiza A, Quesada-Moraga E, Di Pietro A. *Galleria mellonella* as model host for the trans-kingdom pathogen *Fusarium oxysporum,* Fungal Genet. Biol. 2011;48:1124–1129.

Ortoneda M, Guarro J, Madrid MP, Caracuel Z, Roncero MI, Mayayo E, *et al*. *Fusarium oxysporum* as a multihost model for the genetic dissection of fungal virulence in plants and mammals. Infect. Immun. 2004;72:1760–1766.

Ott L, McKenzie A, Baltazar MT, Britting S, Bischof A, *et al*. Evaluation of invertebrate infection models for pathogenic corynebacteria. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 2012;65:413–421.

Owiti J, Grossmann J, Gehrig P, Dessimoz C, Laloi C, Hansen MB, *et al*. H. iTRAQ-based analysis of changes in the cassava root proteome reveals pathways associated with post-harvest physiological deterioration. Plant J. 2011;67(1):145−156.

Park SY, Kim CH, Jeong WH, Lee JH, Seo SJ, *et al*. Effects of two hemolymph proteins on humoral defense reactions in the wax moth, *Galleria mellonella*. Dev. Comp. Immunol. 2005;29:43–51.

Parsell DA, Lindquist S. "The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins." Ann. Rev Genetics.1993;27.1: 437-496.

Pottiez G, Wiederin J, Fox HS, Ciborowski P. Comparison of 4-plex to 8-plex iTRAQ Quantitative Measurements of Proteins in Human Plasma Samples. J. Proteome Res. 2012;11:3774−3781.

Prasad TSK, Keerthikumar S, Chaerkady R, Kandasamy K, Renuse S, Marimuthu A, *et al*. Comparative proteomic analysis of *Candida albicans* and *Candida glabrata.* Clinical proteomics. 2010;6(4):163-173.

Quiblier C, Seidl K, Roschitzki B, Zinkernagel AS, Berger-Bächi B, Senn MM. Secretome analysis defines the major role of SecDF in staphylococcus aureus virulence. PloS One. 2013; 8(5): e63513.

Rämet M, Manfruelli P, Pearson A, Mathey-Prevot B Ezekowitz RA. Functional genomics analysis of phagocytosis and identification of a *Drosophila* receptor for *E. coli*. Nature. 2002;416:644-648.

Ramos Martins J, Bitondi M. Nuclear Immunolocalization of Hexamerins in the Fat Body of Metamorphosing Honey Bees. Insects. 2012;3:1039–1055.

Ray A, Memmel NA, Kumaran AK. Developmental regulation of the larval hemolymph protein genes in *Galleria mellonella*. Roux Arch. Dev. Biol. 1987;196:414–420.

Renwick J, Daly P, Reeves EP, Kavanagh K. Susceptibility of larvae of *Galleria mellonella* to infection by *Aspergillus fumigatus* is dependent upon stage of conidial germination. Mycopathologia. 2006;161:377–384.

Richards EH, Edwards JP. Parasitism of *Lacanobia oleracea* (Lepidoptera, noctuidae) by the ectoparasitic wasp *Eulophus pennicornis*, results in the appearance of a 27 kDa parasitism-specific protein in host plasma. Insect Biochem. Mol. Biol. 1999;29:557–569.

Ross PL, Huang YN, Marchese JN, Williamson B, Parker K, Hattan S, *et al*. "Multiplexed protein quantitation in Saccharomyces cerevisiae using amine-reactive isobaric tagging reagents". Mol. Cell. Proteomics. 2004; **3** (12): 1154–1169.

Rudrabhatla P, Grant P, Jaffe H, Strong MJ, Pant HC. Quantitative phosphoproteomic analysis of neuronal intermediate filament proteins (NF-M/H) in Alzheimer's disease by iTRAQ. The FASEB Journal. 2010; 24(11): 4396-4407.

Ryan RO, van der Horst DJ. Lipid transport biochemistry and its role in energy production. Ann. Rev. Entomol. 2000;45:233–260.

Seed KD, Dennis JJ. Development of *Galleria mellonella* as an alternative infection model for the *Burkholderia cepacia* complex. Infect. Immun. 2008;76:1267–1275.

Seitz V, Clermont A, Wedde M, Hummel M, Vilcinskas A, Schlatterer K, *et al*. Identification of immunorelevant genes from greater wax moth (*Galleria mellonella*) by a subtractive hybridization approach. Dev. Comp. Immunol. 2003;27:207–215.

Simpson AA, Chipman PR, Baker TS, Tijssen P, Rossmann MG. The structure of an insect parvovirus (*Galleria mellonella* densovirus) at 3.7 Å resolution. Structure. 1998;6:1355–1367.

Slater JL, Gregson L, Denning DW, Warn PA. Pathogenicity of *Aspergillus fumigatus* mutants assessed in *Galleria mellonella* matches that in mice. Med. Mycol. 2011;49(Suppl 1):S107-S113.

Sotelo-Mundo RR, López-Zavala AA, García-Orozco KD, Arvizu-Flores AA, Velázquez-Contreras EF, *et al*. The lysozyme from insect (*Manduca sexta*) is a cold-adapted enzyme. Protein Pept. Lett. 2007;14:774–778.

Tang B, Wang S, Zhang F. Two storage hexamerins from the beet armyworm *Spodoptera exigua*: cloning, characterization and the effect of gene silencing on survival. BMC Mol. Biol. 2010;11:1–13.

Tan K-C, Ipcho SVS, Trengove RD, Oliver RP, Solomon PS. Challenges for molecular plant pathology over the next ten years Assessing the impact of transcriptomics, proteomics and metabolomics on fungal phytopathology. Mol. Plant Pathol. 2009;10(5):703–715.

Terenius O. Hemolin-A lepidopteran anti-viral defense factor? Dev. Comp. Immunol. 2008;32:311–316.

Thongboonkerd V. Practical points in urinary proteomics. J. Proteome Res. 2007;6:3881-3890.

Unwin RD. Quantification of proteins by iTRAQ. In: Cutillas PR, Timms JF, editors. LC-MS/MS in Proteomics. Methods in Molecular Biology. Dordrecht: Springer Science+Bussiness media LLC. 2010;658:205–215.

Varela PF, Llera AS, Mariuzza RA, Tormo J. Crystal structure of imaginal disc growth factor-2: A member of a new family of growth-promoting glycoproteins from *Drosophila melanogaster*. J. Biol. Chemistry. 2002.

Vogel H, Altincicek B, Glöckner G, Vilcinskas A. A comprehensive transcriptome and immune- gene repertoire of the lepidopteran model host *Galleria mellonella*. BMC Genomics. 2011;12:308.

Weber ANR, Tauszig-Delamasure S, Hoffmann J.A, Lelièvre E, Gascan H, *et al*. Binding of the *Drosophila* cytokine Spätzle to Toll is direct and establishes signaling. Nat. Immunol. 2003;4:794–800.

Weise C, Franke P, Kopácek P, Wiesner A. Primary structure of apolipophorin-III from the greater wax moth, *Galleria mellonella*. J. Protein Chem. 1998;17:633–641.

Whitten MM, Tew IF, Lee BL, Ratcliffe N. A novel role for an insect apolipoprotein (apolipophorin III) in beta-1,3-glucan pattern recognition and cellular encapsulation reactions. J. Immunol. 2004;172:2177–2185.

Wilkins MR, Sanchez JC, Gooley AA, Appel RD, Humphery-Smith I, Hochstrasser DF, *et al*. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. Biotechnol. Genet. Eng. Rev. 1996;13:19-50.

Wojda I, Jakubowicz T. Humoral immune response upon mild heat-shock conditions in *Galleria mellonella* larvae. J. Insect Physiol. 2007;53:1134–1144.

Wojtal KA, Wolfram L, Frey-Wagner I, Lang S, Scharl M, *et al*. The effects of vitamin A on cells of innate immunity in vitro. Toxicol. Vitr. 2013;27:1525–1532.

Wu WW, Wang G, Baek SJ, Shen R-F. Comparative Study of Three Proteomic Quantitative Methods, DIGE, cICAT, and iTRAQ, Using 2D Gel- or LC-MALDI TOF/TOF. J. Proteome Res. 2006;5:651-658.

Yu X-Q, Zhu Y-F, Ma C, Fabrick J.A, Kanost MR. Pattern recognition proteins in *Manduca sexta* plasma. Insect Biochem. Mol. Biol. 2002;32:1287–1293.

Zak DE, Aderem A. "Systems biology of innate immunity." *Immunol. Rev.* 2009; 227.1: 264-282.

Zalewska M, Kochman A, Estève J-P, Lopez F, Chaoui K, *et al*. Juvenile hormone binding protein traffic -- Interaction with ATP synthase and lipid transfer proteins. Biochim. Biophys. Acta. 2009;1788:1695–1705.

Zhang Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. BMC Bioinformatics. 2008;9:1-8.

Zhao L, Kanost MR. In search of a function for hemolin, a hemolymph protein from the immunoglobulin superfamily. J. Insect Physiol. 1996;42:73–79.

ANEXO 1

Las 59 proteínas detectadas por iTRAQ. En hemolinfa retada con 10^4 microconidias/mL a 25°C. ITRAQ: S1-S4, C1-C4 sesgo ProGroup NCBInr. Denominador 113, desde la plataforma repositorio de YEPD, Yale Expression Protein Database

#	Protein Name	# Distinct Peptides in Ratios	115:113 ratio	115:113 p-value	116:113 ratio	116:113 p-value	117:113 ratio	117:113 p-value
1	apolipophorin *	89	28.760	0	13.638	0.0324	28.904	0
2	arylphorin *	48	22.121	0	15.220	0.0002	21.889	0
3	transferrin precursor *	31	31.365	0	12.052	0.1128	33.433	0
4	hexamerin *	22	23.154	0	19.563	0	20.690	0
5	Apolipophorin-III *	20	43.993	0	57.507	0.0074	58.118	0
6	prophenoloxidase subunit 2 *	11	26.193	0	0.8090	0.0854	16.966	0.0044
7	27 kDa hemolymph protein *	12	22.328	0	0.7711	0.0279	18.156	0
8	Hemolin *	21	13.760	0.0002	0.2604	0.0018	18.345	0
9	Prophenoloxidase *	14	31.297	0	0.8777	0.7673	24.634	0
10	Apolipophorins	2	30.268	0.1076	10.448	0.9322	29.908	0.1405
11	trypsinogen precursor	3	45.299	0.0036	0.5609	0.2289	34.096	0.0076
12	Actin *	7	13.167	0.0388	0.4065	0.0164	11.827	0.3534
13	juvenile hormone binding protein *	8	29.940	0	12.217	0.3657	32.726	0
14	Lysozyme *	6	26.897	0.0008	0.4344	0.219	14.758	0.0158
15	beta-1,3-glucan recognition protein precursor	1	52.526		37.167		49.886	
16	hexamerin receptor	6	28.451	0	13.006	0.0806	21.421	0.0005
17	cationic protein 8 precursor *	5	37.626	0.0002	0.8482	0.2614	31.270	0.0002
18	larval hemolymph protein *	5	22.447	0.0137	16.487	0.0202	17.529	0.0534
19	Apolipophorin-IIIb	1	40.192		58.606		48.611	
20	antennal esterase CXE5	1	22.080		13.164		23.481	
21	apolipophorin precursor protein	2	31.073	0.0557	10.796	0.7451	33.067	0.0528
22	32 kDa ferritin subunit	4	49.406	0.238	16.622	0.7562	45.814	0.2852
23	cellular retinoic acid binding protein *	3	22.493	0.1784	15.563	0.3519	15.951	0.2884
24	imaginal disc growth factor 4	4	29.615	0.0033	11.666	0.6247	29.788	0.0022
25	serum albumin precursor	1	34.048		0.4571		91.571	
26	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1	23.119		30.144		38.804	
27	Apolipophorin-II; Apolipophorin-I	3	29.724	0.0107	12.796	0.3813	27.463	0.0625
28	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1	24.460		0.2596		18.402	
29	proline-rich protein	2	14.218	0.558	0.4424	0.6937	0.9606	0.9465
30	26kDa ferritin subunit	3	33.140	0.0379	10.651	0.8401	31.325	0.0107
31	Cecropin-D-like peptide *	1	238.851		95.931		83.781	
32	hexamerin 2	1	29.790		17.782		26.511	

33	moderately methionine rich storage protein	2	27.999	0.0732	0.9761	0.8737	20.078	0.1077
34	filamin-C isoform 2	2	35.305	0.194	11.613	0.3723	39.223	0.136
35	zinc finger protein 227-like	1	21.977		12.049		19.801	
36	masquerade-like serine proteinase	3	22.731	0.0118	10.083	0.973	19.589	0.0326
37	Anionic antimicrobial peptide 2 *	1	27.906		25.084		20.052	
38	moderately methionine rich storage protein	2	25.236	0.2038	0.9465	0.9387	20.191	0.499
39	Pyruvate kinase isozyme M1	1	13.032		0.3196		12.406	
40	hypothetical protein PHYSODRAFT_359907	1	24.131		10.354		25.558	
41	serpin 1	1	18.585		0.8506		24.064	
42	endopeptidase subunit C8	2	28.262	0.2522	0.6643	0.4501	22.623	0.0913
43	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial-like	1	-10.000		-10.000		-10.000	
44	isocitrate dehydrogenase	1	25.011		27.864		29.861	
45	conserved protein, unknown function	1	30.887		10.290		21.819	
46	hypothetical protein a	1	30.166		13.241		30.848	
47	hypothetical protein b	1	27.093		29.179		19.571	
48	60 kDa heat shock protein, mitochondrial isoform 2	1	12.165		0.4297		25.433	
49	hypothetical protein c	1	372.090		250.819		409.944	
50	Capsule synthesis positive regulator acpB	1	21.195		11.808		25.939	
51	Kunitz-type protease inhibitor precursor	1	39.741		10.152		31.493	
52	seminal fluid protein	1	29.525		14.531		16.142	
53	peptidoglycan recognition protein SA	2	45.781	0.1978	0.6720	0.168	35.192	0.1357
54	hypothetical protein d	1	31.401		0.7254		25.613	
55	DNA-directed RNA polymerase subunit beta'	1	30.152		12.744		31.823	
56	FAD/NAD-P-binding domain-containing protein	1	39.953		23.830		46.648	
57	hypothetical protein e	1	45.872		13.911		19.485	
58	hemolymph storage protein 1	1	24.031		15.102		17.806	
59	diapause associated protein 2	2	21.869	0.1114	21.481	0.1468	15.460	0.1422

ANEXO 2

Las 17 proteínas detectadas por iTRAQ. Selección de las 17 principales proteínas estudiadas.

#	# en última tabla S4	Proteína	# Distintos Peptidos en tasas	115:113 tasa	115:113 P value	116:113 tasa	116:113 P value	117:113 tasa	117:113 P value
1	6	apolipophorin	89	28.760	0	13.638	0.0324	28.904	0
2	1	arylphorin	48	22.121	0	15.220	0.0002	21.889	0
3	10	transferrin precursor	31	31.365	0	12.052	0.1128	33.433	0
4	4	hexamerin	22	23.154	0	19.563	0	20.690	0
5	8	Apolipophorin-III	20	43.993	0	57.507	0.0074	58.118	0
6	12	prophenoloxidase subunit 2	11	26.193	0	0.8090	0.0854	16.966	0.0044
7	2	27 kDa hemolymph protein	12	22.328	0	0.7711	0.0279	18.156	0
8	9	Hemolin	21	13.760	0.0002	0.2604	0.0018	18.345	0
9	15	Prophenoloxidase	14	31.297	0	0.8777	0.7673	24.634	0
10	14	Actin	7	13.167	0.0388	0.4065	0.0164	11.827	0.3534
11	7	juvenile hormone binding protein	8	29.940	0	12.217	0.3657	32.726	0
12	11	Lysozyme	6	26.897	0.0008	0.4344	0.219	14.758	0.0158
13	5	cationic protein 8 precursor	5	37.626	0.0002	0.8482	0.2614	31.270	0.0002
14	3	larval hemolymph protein	5	22.447	0.0137	16.487	0.0202	17.529	0.0534
15	13	cellular retinoic acid binding protein	3	22.493	0.1784	15.563	0.3519	15.951	0.2884
16	17	Cecropin-D-like peptide	1	238.851		95.931		83.781	
17	16	Anionic antimicrobial peptide 2	1	27.906		25.084		20.052	

CONTENIDO

PERFILES DE EXPRESIÓN TRANSCRIPCIONAL 191
RESUMEN 191
1. INTRODUCCIÓN 192
1.1 Expresión genética 192
1.2 Expresión génica del sistema inmune de insectos 192
1.3 Expresión génica y transcriptoma del sistema inmune 193
1.4 El transcriptoma de inmunidad de *G. mellonella* 194
1.5 Estudio de la expresión génica de *G. mellonella* usando PCR en tiempo real 195
2. METODOLOGÍA 196
2.1 Ensayo Biológico 196
2.1.1 Material biológico. 196
2.1.2 Infección de las larvas con conidias del hongo. 196
2.2 Extracción de ARN 196
2.2.1 Recolección y procesamiento de la hemolinfa. 196
2.2.1.1 Condiciones especiales de asepsia. 196
2.2.2 Obtención del ARN total de hemolinfa retada y de control sin reto inmunológico 196
2.2.2.1 Separación. 196
2.2.2.2 Precipitación. 197
2.2.2.3 Lavado del ARN. 197
2.2.2.4 Resuspensión del ARN. 197
2.2.2.5 Análisis espectrofotométrico. 197
2.3 Eliminación de ADN 197
2.4 Síntesis de ADNc 198
2.4.1 Primera cadena de ADNc. 198
2.4.2 Segunda cadena de ADN. 198
2.5 Diseño de secuencias de oligonucleotidos 199
2.6 PCR cuantitativo (qPCR) 200
2.7 Evaluación de la expresión comparada con iTRAQ 200
3. RESULTADOS 201
3.1 Criterio de selección 201
3.2 Estandarización 203

3.3 Amplificación _____ 205
3.4 Cuantificación _____ 207
3.5 Validación de la expresión del proteoma de *G. mellonella* por iTRAQ y por RT-PCR ___ 210
4. DISCUSIÓN 211
6. CONCLUSIONES 213
7. BIBLIOGRAFÍA 213
ANEXO 216

PERFILES DE EXPRESIÓN TRANSCRIPCIONAL

Extracción de ARN mensajero y expresión genética del sistema inmune de algunos genes evaluados por iTRAQ de la hemolinfa completa de Galleria mellonella retadas con microconidias de Fusarium oxysporum

RESUMEN

A fin de validar los datos proteómicos del análisis de iTRAQ (capítulo 5), fue necesario utilizar una técnica que corroborara tales resultados y que además los correlacionara, como se exige de manera convencional. La técnica escogida fue PCR en tiempo real (RT-PCR) que permite la cuantificación de la expresión génica mediante el análisis de ARNm convertido a cDNA, la cual es conocida más específicamente como qPCR. Para este análisis se escogieron de manera aleatoria dos tratamientos complementarios de iTRAQ los cuales fueron los canales 117 y 118 (117: hemolinfa de *Galleria mellonella* retada con *Fusarium oxysporum,* 10^6 microconidias/mL a 37ºC y 118: hemolinfa sin reto a la misma temperatura). Entre los tratamientos se escogieron aleatoriamente 3 proteínas, las proteínas de *G. mellonella*: la subunidad de ferritina de 26kDa y el precursor 8 de la proteína catiónica, y la proteína serpina 1 de *G. mellonella* inferida por iTRAQ de *Danaus plexippus*. Así mismo se utilizan genes no identificados por iTRAQ de *G. mellonella* y genes externos usados como *housekeeping* e incluso un gen externo. Los resultados de las 3 proteínas escogidas por qPCR muestran el mismo perfil de expresión por iTRAQ, al analizar estadísticamente estos genes no se observan diferencias estadísticas importantes entre iTRAQ y qPCR, demostrando que ambas técnicas se correlacionan.

Palabras claves: ARNm, DNAc, RT-PCR, qPCR, perfil de expresión

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Expresión genética

La expresión génica es el proceso celular por el cual la información de la transcripción de un gen se utiliza en la síntesis de un producto génico funcional. Estos productos son a menudo las proteínas, o también genes que codifican solo para ARN sin ser jamás una proteína, tales como genes pequeños, ARN nucleares (ARNsn), ARN ribosómico (ARNr), ARN de transferencia (ARNt), o cualquier otro producto de un ARN funcional como el ARN de interferencia (ARNi), los largos ARN no codificantes (ARNlnc) y los pequeños ARN no codificantes (ARNnc) (Magistri *et al.*, 2012; Clarck *et al.*, 2011; Llott & Ponting, 2013). El proceso de la expresión génica es empleado por los eucariotas (incluyendo organismos multicelulares como los insectos y hongos), los procariotas (bacterias y arqueas), y muy posiblemente inducida por virus, para generar la maquinaria macromolecular para la vida. Varios pasos en el proceso de la expresión génica son modulados, incluyendo la transcripción, el corte y empalme de ARN (*splicing*), la traducción, y la modificación post-traduccional de una proteína. La regulación génica permite el control celular sobre la estructura y su función, y es la base para la diferenciación celular, la morfogénesis y la versatilidad y adaptabilidad de cualquier organismo, como los procesos metamórficos de un insecto. La regulación génica también puede servir como un sustrato para el cambio evolutivo, ya que el control del momento y el lugar, y la cantidad de la expresión génica puede tener un profundo efecto sobre las funciones (acciones) del gen en una célula o en un organismo multicelular. Actualmente también sabemos que procesos epigenéticos como las metilaciones juegan un papel muy parecido y trascendental en la regulación de los genes, impidiendo o permitiendo la expresión de ellos (Glastad *et al.*, 2011; Feliciello *et al.*, 2013).

La expresión génica es el proceso fundamental en el que el genotipo da lugar al fenotipo. El código genético almacenado en el ADN se "interpreta" por la expresión de genes, y las propiedades de la expresión dan lugar a fenotipo del organismo. Tales fenotipos se expresan normalmente por la síntesis de proteínas que controlan la forma del organismo como el sistema endocrino, paracrino y autocrino, o que actúan como enzimas que catalizan las vías metabólicas específicas que caracterizan el organismo. En nuestro caso no solo debe catalizarse el metabolismo y la excreción, sino al mismo tiempo la repuesta al ataque del organismo por un patógeno que propicia la respuesta inmune (Frank & Pace, 1998).

1.2 Expresión génica del sistema inmune de insectos

Aún queda mucho por dilucidar en el sistema inmune de los insectos, sin embargo la expresión de algunas proteínas ya ha sido estudiada cuando son inducidas por el ataque de bacterias y hongos. Ellas son: la lisozima, la hemolina, la apolipoforina, cecropina, entre otras. La lisozima es una de las enzimas más importante de los organismos como controlador del sistema inmune, de todos los invertebrados y de otros reinos. En los insectos se ha estudiado mucho la expresión de ésta enzima dado su poder proteolítico. Por lo tanto, la lisozima es una proteína muy importante como enzima bacteriolítica en el sistema inmune de los insectos ya que hidroliza uniones β (1→4) entre N-acetylglucosamina y ácido N-acetilmuramico en los péptido glucanos de las paredes de los

procariotas. La expresión enzimatica de esta enzima *Ha*Lyz, ha sido bien estudiada en *Helicoverpa armigera* (Zhang *et al*., 2009*).*

Otra forma de estudio de la expresión genética o génica de los genes es la modulación del sistema inmune por inducción-supresión utilizando ARN de interferencia (*iRNA* o ARNi) para estudiar en insectos la expresión de moléculas de respuesta al ataque de patógenos. Los lípidos son moleculas naturales de defensa dentro de la hemolinfa de los insectos; los fosfolípidos pueden ser materia prima para elaboración de la defensa. La fosfolipasa A(2)PLA(2) cataliza la hidrólisis de fosfolípidos en la posición sn-2 lo que permite la producción de ácido araquidónico, el cual oxigena varios eicosanoides que intervienen en la respuesta inmune de los insectos (Park & Kim, 2012). La actividad PLA(2) se midió tanto en tejidos inmunes asociadas con el cuerpo graso y con los hemocitos en el gusano soldado *Spodoptera exigua*, con la estimulación del hongo entomopatógeno, *Beauveria bassiana*. PLA(2) se activó de manera significativa tanto en hemocitos como en cuerpo graso. La infección con el hongo también indujo la expresión de los genes de péptidos antimicrobianos (AMP), tales como dos atacinas, cecropina, gallerimicina, gloverina, hemolin, y transferrina de *S. exigua*. El empleo de ARN de interferencia para las vías de señalización de Toll y Imd, utilizando para ello ARN de doble cadena (ARNdc o *dsRNA*) específicos para SeToll o SeRelish suprimió la expresión de genes AMP específicos. Los ARNdc específicos de SeToll suprimieron las dos atacinas, cecropina, galeromicina, gloverina, hemolina y transferrina I, mientras que ARN de doble cadena específica para SeRelish suprimió sólo cecropina. Curiosamente, ARNdc específica a SeToll también inhibió significativamente la activación de PLA(2) en respuesta a la infección por hongos, pero ARNdc específica a SeRelish no lo hizo (Park & Kim, 2012).

1.3 Expresión génica y transcriptoma del sistema inmune

La búsqueda de la expresión de genes por métodos convencionales como clonación, sondas o PCR, es un proceso largo y dispendioso y permite identificar solo algunos genes. Hoy existen métodos de secuenciamiento profundo o (pirosecuenciación) que aceleran el proceso de búsqueda del los ARN, entre ellos el mensajero, permitiendo así la identificación a gran escala de genes que se expresan en condiciones específicas como los del sistema inmune innato, retado o no. El transcriptoma es el conjunto completo de las transcripciones en una célula, y su cantidad, para una determinada etapa de desarrollo o estado fisiológico. Entender el transcriptoma es esencial para la interpretación de los elementos funcionales del genoma y que revela los componentes moleculares de células y tejidos, y también para comprender el desarrollo y la enfermedad. Los objetivos claves de la transcriptómica son catalogar todas las especies de la transcripción, incluyendo mARNs, ARNs no codificantes y minis ARNs; para determinar la estructura de la transcripción de genes, en términos de sus sitios de inicio, 5 'y 3' extremos, patrones de empalme y otras modificaciones post-transcripcionales, y cuantificar los cambios en los niveles de expresión de cada transcripción durante el desarrollo y bajo diferentes condiciones. Diversas tecnologías se han desarrollado para deducir y cuantificar el transcriptoma, incluyendo enfoques basados en hibridación o en secuencia. Los enfoques basados en la hibridación son de alto rendimiento y relativamente de bajo costo, a excepción de las matrices mosaico de alta resolución para genomas grandes. Sin embargo, estos métodos tienen varias

limitaciones, que incluyen, la confianza en el conocimiento existente sobre secuencias del genoma, y un limitado rango dinámico de detección debido al fondo y a la saturación de las señales. Además, comparar los niveles de expresión a través de diferentes experimentos a menudo es difícil y requiere complicados métodos de normalización. En contraste con los métodos de microarreglos (*microarrays*), los enfoques basados en la secuencia, determinan directamente la secuencia ADNc o *cDNA*. Inicialmente, la secuenciación de Sanger de librerías de cDNA o EST se utilizó, pero tenía rendimiento relativamente bajo, era costoso y generalmente no era cuantitativo (Wang *et al*., 2009; Vogel *et al*., 2011).

Se han desarrollado métodos basados en etiquetas para superar estas limitaciones. Estos métodos de secuenciación basadas en etiquetas son de alto rendimiento y pueden proporcionar información precisa, con niveles "digitales" de expresión génica. Sin embargo, la mayoría se basan en la costosa tecnología de secuenciación de Sanger y una porción significativa de las etiquetas cortas no pueden ser únicamente asignadas al genoma de referencia. Además, sólo una porción de la transcripción se analiza y generalmente las isoformas son indistinguibles unas de otras. Estas desventajas limitan el uso de la tecnología de secuenciación tradicional para anotar la estructura de los transcriptomas. Recientemente, el desarrollo de nuevos métodos de alto rendimiento o de nueva geneneración (*Next-Generation Sequence, NGS*) de secuenciación de ADN han proporcionado un nuevo método para la cartografía, así como para cuantificar transcriptomas. Este método, denominado RNASeq (secuenciación de ARN), tiene claras ventajas sobre los enfoques existentes y se espera que revolucione la manera en que los transcriptomas eucariotas son analizados.Ya ha sido aplicado a *Saccharomyces cerevisiae, Schizosaccharomyces pombe, Arabidopsis thaliana*, y células de ratón y humano (Wang *et al*., 2009; Vogel *et al*., 2011).

1.4 El transcriptoma de inmunidad de *G. mellonella*

La introducción de las nuevas tecnologías de secuenciación de alto rendimiento proporciona una idea de la arquitectura genética de un número creciente de organismos no modelo incluido los insectos. La pirosecuenciación (*NextGen Seq* o NGS) se ha convertido en una herramienta importante en los estudios de transcriptómica y permite la identificación específica de los genes que son (diferencialmente) expresados en los tejidos o células distintas, durante el desarrollo, o tras la activación de la respuesta inmune. Esta tecnología se ha utilizado, por ejemplo, para caracterizar tanto el intestino medio-específico como la inmunidad relacionada con el transcriptoma de *Manduca sexta*, que se ha convertido en un modelo en lepidópteros en bioquímica y fisiología (Zou *et al*., 2008; Pauchet *et al.,* 2010; Vogel *et al.*, 2011)

Vogel *et al.* (2011) estudiaron primero el transcriptoma relacionado con la inmunidad de *G. mellonella*, combinando el análisis con pirosecuanciación NGS. En primer lugar, *G. mellonella* es un modelo adecuado para identificar las características antiguas de la inmunidad innata en lepidópteros, ya que pertenece a la familia Pyralidae, la cual se ha colocado en una posición filogenética basal dentro de los lepidópteros. En segundo lugar, *G. mellonella* representa un potente sistema modelo, fiable y probado para estudios de inmunidad innata. Actualmente se utiliza como un sistema huésped para reconstruir

rápidamente adaptaciones recíprocas durante la co-evolución huésped-parasito y como un modelo alternativo de huésped para probar patógenos humanos, dado que es éticamente más aceptable que el uso de huéspedes mamíferos tales como ratones, ratas y conejos (Fuch & Mylonakis, 2006; Vogel *et al.*, 2011).

Las larvas de *G. mellonella* prosperan ampliamente en todo el mundo para ser utilizadas como mini-huéspedes alternativos, ya que combinan las ventajas compartidas con otros modelos huéspedes de invertebrados con beneficios que son únicos a este lepidópteros. Las ventajas del nematodo *Caenorhabditis elegans* y la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, son sus completos con bien anotados genomas y microarreglos, con librerías de ARN de interferencia y con cepas mutantes disponibles que permiten el análisis de las interacciones huésped-patógeno a nivel molecular (Kavanagh & Reeves, 2004; Vogel *et al.*, 2011).

1.5 Estudio de la expresión génica de *G. mellonella* usando PCR en tiempo real

Varios investigadores han utilizado la técnica de PCR en tiempo real (RT-PCR) para el estudio del *G. mellonella* y la respuesta a patógenos como *F. oxysporum* u otros hongos, como los de Prados-Rosales *et al*., 2012 y Fuchs *et al*., 2011 entre otros. Esta técnica ofrece enormes ventajas frente a *Norther blot* o clonación ya que permite cuantificar la producción de ARN en tiempo real.

Se han estudiado varios genes que muestran el potencial de la RT-PCR cuantitativa o qRT-PCR (qPCR), el cual permite estimar a nivel cuantitativo la expresión de los genes estudiados. Para ello es necesario recuperar el ARNm y convertirlo a ADN copia (ADNc). A pesar del tiempo que ya tiene la técnica y el uso de *G. mellonella* como herramienta, esta técnica ha sido poco usada o mejor aprovechada para el estudio molecular y genético de este organismo. Sin embargo varios estudios resaltan su uso. Por ejemplo en la infección de *G. mellonella* con *F. oxysporum* la RT-PCR fue bastante útil para estudiar el gen PR-1-like del hongo dentro de la hemolinfa (Prados-Rosales *et al.*, 2012). Igualmente otros hongos han sido estudiados en *G. mellonella* como *Pneumocistis carini* (Fuchs *et al.*, 2011). Otros estudios de *G. mellonella* infectada con hongos han empleado la RT-PCR, pero no directamente para estudiar la expresión de la virulencia o la respuesta inmune.

2. METODOLOGÍA

2.1 Ensayo Biológico

2.1.1 Material biológico.

Se utilizó la cepa de *F. oxysporum* (*Foxy-GIEM*) cultivada en PDA (Oxoid, Ltd., Basingstoke, Inglaterra) durante 14 días (Brown *et al.,* 2008; Wojda & Jakubowicz, 2007). Se emplearon larvas de *G. mellonella* en la etapa final de desarrollo larval, con peso corporal entre 230-330 mg, alimentadas con dieta artificial (capitulo 1 numeral 2.4)

2.1.2 Infección de las larvas con conidias del hongo.

Se eligieron al azar grupos de cinco larvas de *G. mellonella*, las larvas fueron inyectadas con suspensiones de microconidias de *F. oxysporum* ($1x10^6$ microconidias/mL) y almacenadas en la oscuridad. Todos los experimentos incluyeron dos grupos de control, el primer grupo como control de inocuidad del proceso de trauma físico de la inyección de larvas inoculadas en el hemocele con 20 µL de Tween-80 (0.1% v/v) a través del último *proleg* izquierdo, y un segundo grupo control que no recibió ninguna inyección. Antes de la inyección, se desinfectó la zona con un hisopo con alcohol. Tras la inyección, las larvas se incubaron en cajas de Petri a 37ºC en la oscuridad durante 48 horas (Fuchs *et al.,* 2010; Coleman *et al.,* 2011).

2.2 Extracción de ARN

2.2.1 Recolección y procesamiento de la hemolinfa.

2.2.1.1 Condiciones especiales de asepsia.

Colocar bajo luz UV por 30 minutos, todos los racks de puntas, pipetas y material en general. Limpiar con RNAsa Away el mesón, gradillas y pipetas. Usar guantes limpios. Utilizar sólo tubos libres de RNAsas y DNAasas.

Después de pasadas 48 horas y previo a la recolección tanto de hemolinfa de larvas retadas como de larvas de control, los insectos fueron enfriados por 15 min a 4ºC y se desinfectó la superficie abdominal con una solución de etanol del 70% (v/v) Las muestras de hemolinfa se obtuvieron mediante perforación del abdomen larval con una aguja estéril. La hemolinfa que fluyó fuera se transfirió inmediatamente a un tubo Eppendorf libre de RNAsas, previamente enfriado hasta completar 500 microlitros y se homogeneizó (Cytryska *et al.*, 2007; Wojda & Jakubowicz, 2007).

2.2.2 Obtención del ARN total de hemolinfa retada y de control sin reto inmunológico

2.2.2.1 Separación.

- Se adicionó 1 mL de TRIZOL®, (al 10 %), se mezcló y se mantuvo en hielo por 5 minutos.

- Se adicionaron 2 µL de Cloroformo por cada mL de TRIZOL, asegurándose de tapar correctamente los tubos. Se aplicó vortex vigorosamente por 15 segundos (hasta ver una solución lechosa), se mantuvieron los tubos en hielo por 3-5 minutos.
- Se centrifugó a 14.000 r.p.m. por 15 min a 4°C. La mezcla separó en dos fases, el ARN se encuentra en la fase superior (fase orgánica transparente). La fase superior se transfirió cuidadosamente a un tubo nuevo de 1.5 mL.

2.2.2.2 Precipitación.

Se precipitó el ARN de la fase acuosa mezclando con isopropanol frío. Se usaron 500 µL de isopropanol por cada mL de TRIZOL, se homogenizó la muestra cuidadosamente por inversión repetidamente de los tubos, se colocó en hielo durante 10 min y se centrifugó a 14.000 r.p.m. por 10 min a 4°C. Se removió el sobrenadante, el ARN precipitado es ligeramente visible formando un pequeño "pellet" en el fondo del tubo.

2.2.2.3 Lavado del ARN.

El sobrenadante se removió completamente y se lavó el "pellet" con etanol al 75% preparado con agua DEPC, adicionando 1 mL de etanol por cada mL de TRIZOL. Se mezcló la muestra por vortex y se centrifugó a 10.000 r.p.m. por 5 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante. Se repitió el procedimiento una vez más y posteriormente se retiró al máximo el etanol.

2.2.2.4 Resuspensión del ARN.

Se dejó secar el tubo de "pellet" de ARN durante 10 min. a temperatura ambiente dejando el tubo completamente seco para evitar bajar la solubilidad. Se adicionaron 40 µL de agua libre de RNasas y se resuspendió por pipeteo.

2.2.2.5 Análisis espectrofotométrico.

A fin de calcular la concentración de ARN, se colocó 1 µL de la solución de ARN extraído, sobre el espectrofotómetro Nanodrop ND 2000 (Thermo Scientific) a 260_A. Se midió tanto la muestra control (sin tratamiento) como aquella tratada.

2.3 Eliminación de ADN

A fin de eliminar remanentes de ADN del ARN total, se realizó una digestión con la enzima DNAsa. A la solución de ARN se le adicionaron 10 µL de tampón de Dnase I (Epicentre), con los demás reactivos según la tabla 1, a continuación. La reacción se incubó durante 45 min a 37ºC. Posteriormente la DNAsa fue retirada con fenol-cloroformo y centrifugación, la precipitación final se realizó con isopropanol sobre un volumen final de resuspensión de 50 µL en agua libre de nucleasas.

Tabla 1. Mezcla para la eliminación de ADN cromosómico

Reactivo o componente	Cantidad en µL
Muestra ARN	10
Tampón de reacción 2X	10
Enzima DNAsa I U/µL	10
Agua libre de nucleadas	170
Volumen final	200

Posterior al proceso de digestión, se procedió a detener la reacción con EDTA 1mM. A partir de ahí, el ARN total queda listo para amplificar ADNc a partir de ARNm.

2.4 Síntesis de ADNc

Para la síntesis del ADNc se utilizó el kit de High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Las reacciones fueron preparadas para cada muestra de RNA utilizando los genes mencionado en la tabla 4, con la proteína ribosomal S7e, ciclofilina, serpina 1, inhibidor de protesa fúngica, lipocalina y la sub-unidad de ferritina 26kDa.

Cada reacción de ADNc fue realizada con 100U de la enzima Multiscribe Reverse transcriptasa y 3.5µM Oligo$(dT)_{23}$ (Sigma). La síntesis fue incubada a 48ºC durante 3.5 h utilizando aproximadamente 1 µg de ADN libre de ARN como molde.

2.4.1 Primera cadena de ADNc.

En la tabla 2 se listan los componentes de la síntesis de la primera cadena, con el orden indicado por el fabricante. La síntesis se realizó en un termociclador MJResearch.

Tabla 2. Lista de compuesto para la síntesis de la primera cadena de ADNc

Compuesto o reactivo	Tipo o concentración	Cantidad en µL
Oligonucleotidos Oligo$(dT)_{23}$	100 pM	1
ARN total	ARNm con polyA	1 a 7 según concentración
Agua libre de nucleasas		7
Tampon de reacción 5X		4
RNAsa H de E. coli	20 U/µL	1
Mezcla de dNTPs	10 mM	2
Multiscribe Reverse transcriptasa	200 U/ µL	1
	Volumen final	20

2.4.2 Segunda cadena de ADN.

La segunda cadena de ADN se realiza tomando los 20 µL de la reacción anterior, llevándola a un volumen de 100 µL e incubándola por 2 horas a 15 °C, ver tabla 3. Al final se detiene la reacción con 5 µL de EDTA 0.5 mM. Luego, esta síntesis pasará a una reacción de PCR (tabla 3).

Tabla 3. Mezcla para la síntesis de la segunda cadena de ADN

Compuesto o reactivo	Tipo o concentración	Cantidad en µL
Reacción anterior		20
Tampón de reacción	10X	8
RNAsa H de E. coli	20 U/ µL	1
ADN polimerasa	30 U/ µL	12.5
Agua libre de nucleasa		58.5
	Volumen final	100

2.5 Diseño de secuencias de oligonucleotidos

Para el diseño de los oligonuclotidos se utilizó las secuencias blanco de *G. mellonella* obtenidas de la base de datos ESTs de GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/).

Cada secuencia fue sometida en el servidor Primer3Plus (http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/). La mejor pareja de oligonucleótidos fue seleccionada de acuerdo a los resultados autocomplementariedad y complementariedad en pares de oligos (tabla 4).

Como gen externo u *out gene,* se utilizó glucosa 6-fosfato deshidrogenasa humana (G6PDH) con su respectivo ADN, con oligos muy conocidos a nivel comercial, los cuales no se anexan.

Tabla 4. Lista de primers diseñados y utilizados.

Gen	Sequencia 5' to 3'	Tm[a]	Tamaño	Blanco[b]
Ribosomal protein S7e	CCCAAGCCTAGCCACAAGAC	65.9	129 pb	DQ137845.1
	GATACGCTTGCCGACGATTTC	67.6		
Cyclophilin	AGCACGAAAATCTGCGATCACA	68.9	133 pb	EHJ66328.1
	TTGGTTGGACGGTAGACACG	65.9		
Serpin 1	CAGCTGCAGCCAATGAAATAATG	67.3	136 pb	AAA29334.1
	GCGGGTTGCACATAGACTCC	66.8		
Fungal Protease Inhibitor	CTATCGCCAGAACCATGCAG	65.6	133 pb	ADI87454.1
	CAATGGCTCACGACAAATGGC	69.7		
Lipocalin	GGAAGCATTACATGGCGATACA	65.6	115 pb	EHJ63999.1
	GCAGCTGGTCTCCGAGAAG	65.4		
26kDa Ferritin subunit	AGTATCCGCACCGTCATCTCG	68.4	114 pb	AF142340.1
	GTCGCGTTGTCCCTTGTATTG	66.4		

2.6 PCR cuantitativo (qPCR)

Para determinar finalmente la expresión de los genes mencionados, se realizaron PCRs cuantitativos. La preparación de la reacción se muestras en tabla 5. Se usaron dos genes diferentes como controles endógenos de la prueba, se emplearon la proteína ribosomal S7C y ciclofilin. La muestra de referencia fue el ARNm extraído de hemolinfa de larvas de *G. mellonella* que no habían sido retadas con microconidias. Para comparar expresión de ARNm, se empleó la muestra de hemolinfa tratada con microconidias de *F. oxysporum* ($1x10^6$ microconidias/mL), como se explica en el numeral 2.1.2. La qPCR fue elaborada en un termociclador StepOne Real Time PCR instrument (Applied Biosystems), con el sistema de PCR SYBR-Green Master Mix de la misma empresa. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: denaturación 95ºC durante 10 min, *annealing* de alta astringencia a 64ºC durante 60 seg, seguido por denaturación de 10 seg a 95ºC y un *extending* a 72ºC durante 1 min, como lo indica Applied Biosystem. Estas condiciones fueron repetidas durante cuarenta ciclos. En la tabla 5 aparecen la lista de compuestos de la reacción. En el programa de Applied Biosystem la eficiencia (E) de amplificación se calcula con la siguiente fórmula [1]:

$$E = (10–1) \times 100 \qquad [1]$$

La cuantificación relativa (*Relative quantitation*, RQ) de la expresión de los genes seleccionados fue calculada con el programa StepOne Software v2.0 (Applied Biosystems) y el método $\Delta\Delta C_T$. Los valores de logaritmos en base 2 (Log_2) de las "veces o dobleces de cambio" (*fold-change*) se obtuvieron con el objetivo de comparar la expresión de los resultados de iTRAQ y qPCR.

Tabla 5. Componentes de la reacción en cadena de la polimerasa para realizar la PCR.

Compuesto o reactivo	Tipo o concentración	Cantidad en µL
Agua libre de nucleasas		15
Oligo directo	500 nM	2.5
Oligo reverso	500 nm	2.5
ADNc	25 ng	5
SYBR-Green Master Mix	2X	25
	Volumen final	50

2.7 Evaluación de la expresión comparada con iTRAQ

El cálculo de la cuantificación de la expresión se realizó por la fórmula [2], teniendo en cuenta que se realiza relacionando cada gen blanco (*G. mellonella*) versus genes de referencia o endógenos (*housekeeping gene*).

$$\text{Expresión relativa} = \frac{E_{blanco}\ \Delta CP_{blanco}(\text{control} - \text{muestra})}{E_{referencia}\ \Delta CP_{referencia}\ (\text{control} - \text{muestra})} \qquad [2]$$

Donde E es eficiencia y ΔCP corresponde a los punto de cruce (*crossing point*). Para el cálculo de la tasa (*ratio*) de expresión se utilizó la-fórmula [3]:

$$\text{Tasa} = \frac{(E_{\text{blanco}})^{\Delta CP\text{blanco(control – muestra)}}}{(E_{\text{eferencia}})^{\Delta CP\text{referencia(control – muestra)}}} \qquad [3]$$

En la tabla 6 se observan los tratamiento realizados por iTRAQ, que aunque fueron realizados en momentos diferentes a la extracción de ARN, corresponden al mismo tipo de tratamiento. Posteriormente, para la selección de genes de interés y comparación de la expresión proteica (resultados de iTRAQ) con la producción de transcritos (llámese inducción o represión de genes hasta transcritos, ARNm) se re-analizaron los resultados obtenidos por iTRAQ de los tratamientos mostrados en la tabla 6. Se seleccionaron entonces las proteínas de *G. mellonella*: la subunidad de ferritina de 26kDa, el precursor 8 de la proteína catiónica, y de la especie *D. plexippus*, la serpina 1 y dbEST73428491.

Tabla 6. Tratamientos de iTRAQ

#	Código GIEM	Tratamiento	Yale	Canal	Código de barra	Características
F 6	GF6HT	Muestra 32,75	HK104u	117		Hemolinfa retada con *F. oxysporum* 10^6 microcon/mL a 37ºC
J10	CPHT	Control 32,18	WH107c	118		Control de inyección con Tween-80 (0.1% v/v) a 37ºC

3. RESULTADOS

3.1 Criterio de selección

Se re-analizaron los resultados obtenidos por iTRAQ, de los tratamientos mostrados en tabla 6. Se seleccionaron entonces, las proteínas de *G. mellonella*: la subunidad de ferritina de 26kDa, el precursor 8 de la proteína catiónica, de la especie *D. plexippus;* serpina 1 y un EST (Secuencia de expresión etiquetada, *Expression Sequences Tag*) con registro NCBI dbEST73428491 de *G. mellonella*. Observando la relación de las tasas 118:117 con 117:118 existen diferencias importantes frente a los tratamientos de *G. mellonella* con el *F. oxysporum* y sin él. Por lo tanto, los transcritos de estas proteínas son buenos candidatos para monitorearles la producción de su ARNm y establecer una correlación entre expresión transcripcional y expresión traduccional-postraduccional. La tabla 7 muestra el análisis previo a la escogencia de los tres genes finales usados.

Tabla 7. Resultados de iTRAQ

Proteínas a analizar	Tasa 118:117 A	Tasa 117:118 B	A/B	B/A
Precursor de proteína catìonica 8 [Galleria mellonella]	0.8901	1.1234	0.79232686	1.26210538
26kDa ferritin subunit [Galleria mellonella]	1.3443	0.7439	1.80709773	0.55337350
serpin 1 [Danaus plexippus] indistinguishable	0.6872	1.4552	0.47223749	2.11757858

Observando la gráfica de estos datos en la figura 1, se puede apreciar que serpina 1 está aumentada en la tasa 117:118, respecto a sus tasa en 118:117, sucede lo contrario para la proteína ferritina 26 kDa. En el caso de la proteína catiónica 8, no se observa un cambio importante entre las dos tasas, demostrando que esta proteína no se ve seriamente afectada con la inyección del hongo. Para observar una diferencia más clara entre las tasas, se realizó un sesgo dividiendo ambos datos por los otros, es decir el valor de la tasa 118:117 denominado A, y el valor de la tasa 117:118 denominado B (ver tabla 7 y figura 1). Esta relación corrobora los datos de las tasas con mayor sesgo, permitiendo ver las diferencias, ya que valores iguales en ambas tasas darán 1 en ambos casos, demostrando ningún cambio entre tratadas y no tratadas con microconidias y/o temperatura. En el caso del precursor de la proteína cationica 8, los valores respectivos A/B y B/A, son relativamente cercanos ya que dan respectivamente 0,8 y 1,2.

En la figura 1, se observan los mismos valores de la tabla 7. Todas las proteínas no aparecen obviamente allí, dado que dos de ellas son controles endógenos: ciclofilina y la proteína ribosomal S7. En el caso de dbEST73428491, corresponde a un transcrito que no fue identificado por iTRAQ pero que sirve como control de un gen externo al estudio de iTRAQ, utilizado para verificar la calidad del ARNm.

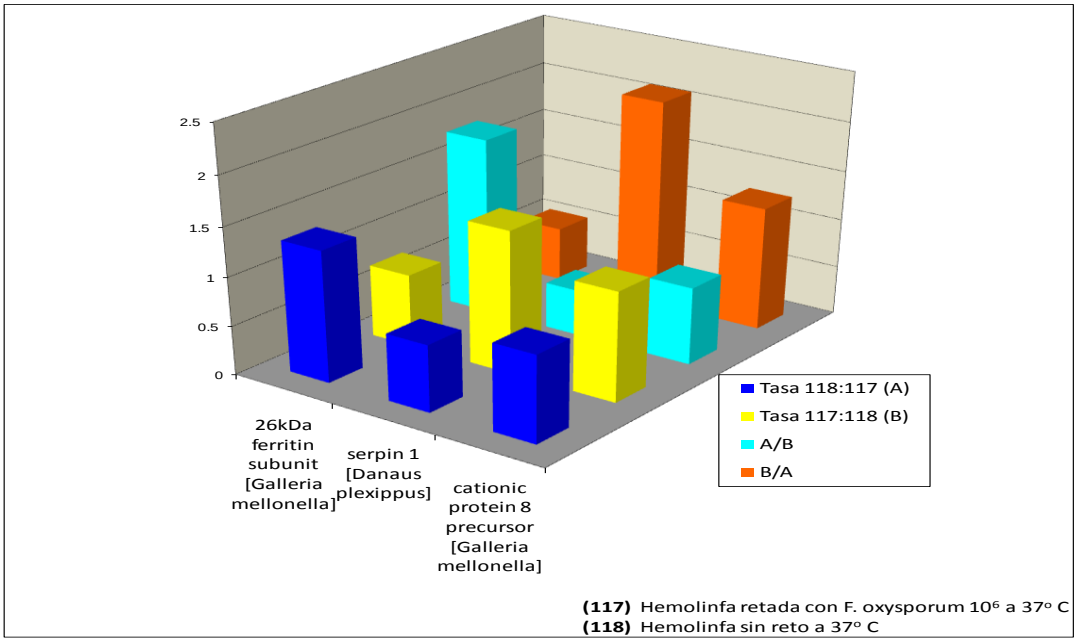


Figura 1. Representación de los valores de la tabla 7 de las proteínas seleccionadas, donde se observan la expresión diferencial de proteínas por iTRAQ, en donde se observa la relación comparativa de la tasa de expresión de las larvas tratadas (marcada 117) con larvas no tratadas (marcada 118). Las barras azules representan del canal o la relación tasa 118:117 y las barras amarillas representan del canal o la relación tasa 117:118. De estas proteínas se seleccionaron dos proteínas identificadas por Blast con los péptidos de *G. mellonell:* subunidad de ferritina de 26kDa y el precursor de la proteína catiónica 8. De *Danaus plexippus:* serpina 1.

3.2 Estandarización

Para el proceso de la qPCR es clave estandarizar la prueba ya que los oligonucleótidos deben amplificar los genes con ADN cromosómico de *G. mellonella y* posteriormente los ADNc (cDNA) producidos de muchos de los genes transcritos de la larva. Igualmente los oligonucleótidos deben verificarse a fin de constatar la especificidad y la homogeneidad en la prueba con los genes endógenos. En la figura 2 se observa la amplificación de la subunidad de ferritina, en la cual sus oligos amplifican de manera homogénea. El mismo caso sucede con serpina 1 como se observa en la figura 3. Los otros dos genes, la subunidad de ferritina de 26kDa, el precursor 8 de la proteína catiónica, también presentaron el mismo comportamiento. Un excelente *melting point* muy parecido, como se aprecia en las graficas izquierdas de las figuras 1 y 2 y un curso de amplificación contaste, como se ve en las gráficas derechas de las mismas figuras.

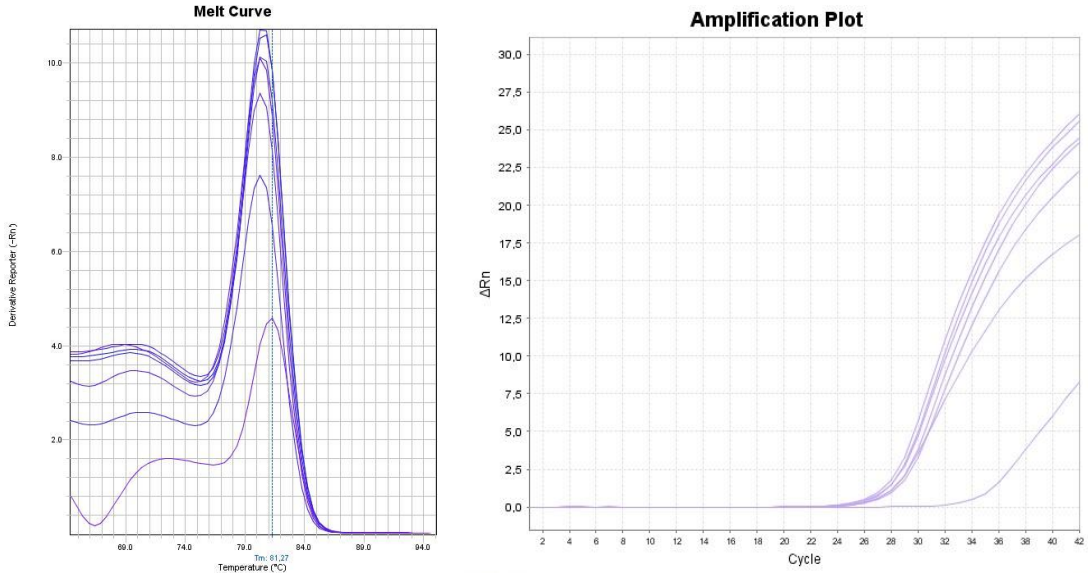


Figura 2. **Estandarización de la qPCR de oligos específicos para la subunidad de 26kDa de ferritina**. En la gráfica de la izquierda se observa la curva de fusión de sus respectivos oligonucleótidos (*melting point of primers*). En la gráfica de la derecha se observa el ciclo de inicio y final de los amplicones. El enriquecimiento de amplificados se realizó con SYBR-GREEN.

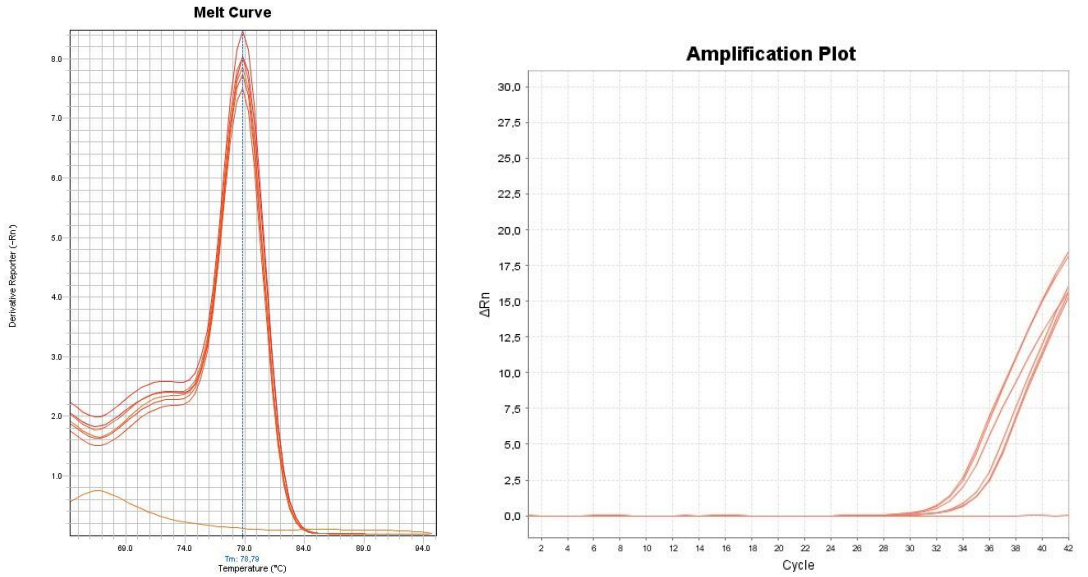


Figura 3. Estandarización de la qPCR de oligos específicos para serpina 1. En la gráfica de la izquierda se observa la curva de fusión de sus respectivos oligonucleótidos (*melting point of primers*). En la gráfica de la derecha se observa el ciclo de inicio y final de los amplicones El enriquecimiento de amplificados se realizó con SYBR-GREEN

Los amplificados en su mayoría comienzan la síntesis entre los ciclos 12 y 30, ver figura 4 y la síntesis alcanza un ΔRn alrededor de 10 en la escala logarítmica. En la figura 4 se observan los 3 genes de de estudio de *G. mellonella* y los 4 genes externos, uno de los

cuales debe amplificar específicamente para *G. mellonella*. La estandarización no solo demuestra la especificidad de los genes, sino que además corrobora la presencia del gen serpina 1 en *G. mellonella* encontrado por iTRAQ, dado que los oligos fueron obtenidos de la secuencia de serpin 1 de *D. plexippus*, así como los péptidos de la proteína.

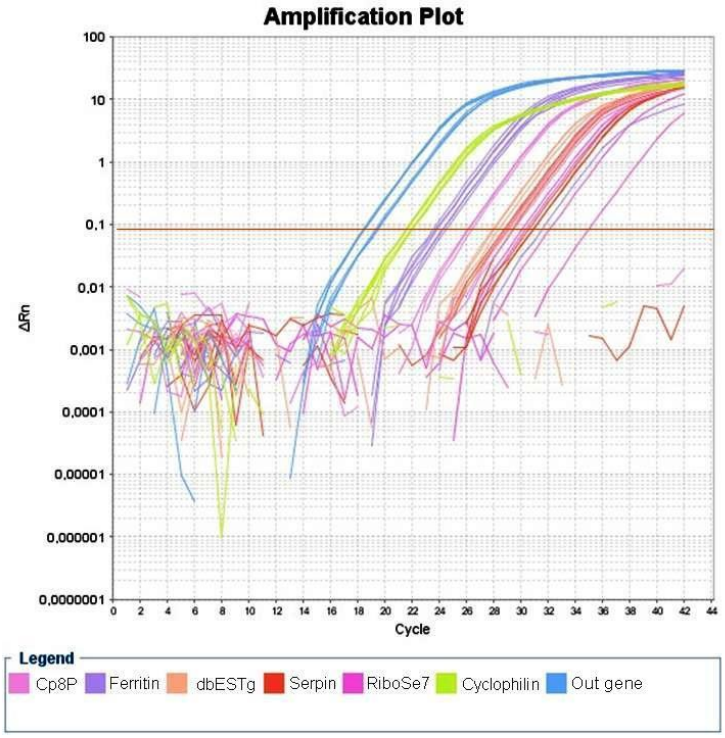


Figura 4. Gráfica de inicio y terminación de ciclos de amplificación de los 7 genes utilizados en el estudio, con los oligos de, serpina 1, precursor de proteína cationica 8 y la subunidad de 26 kDa de ferritina. Igualmente la amplificación de otros genes con el mismo cDNA de ciclofilina y riboproteinas S7e, así como el dbEST. La línea roja horizontal corresponde al umbral mínimo de inicio de cuantificación (ΔRn mínimo).

3.3 Amplificación

Posterior a la estandarización se procedió realizar los PCR con SYBR-GREEN los que permitieron la cuantificación de la expresión génica de los genes mencionados. La figura 5 muestra los resultados de las curvas de amplificación tanto de los genes de *G. mellonella* con el tratamiento del hongo y sin él, así como los genes endógenos (*housekeeping*), que sobre la figura 5 se denominan Cyclophilin y RiboS7, correspondientes a ciclofilina y riboproteina S7. En general, los perfiles tienen un aspecto normal, aunque solo unas pocas amplificaciones hechas por triplicado sobrepasan los inicios de amplificaciones posteriores a 30 ciclos, lo que se puede ver en los valores de CT de los genes de estudio en la tabla 8.

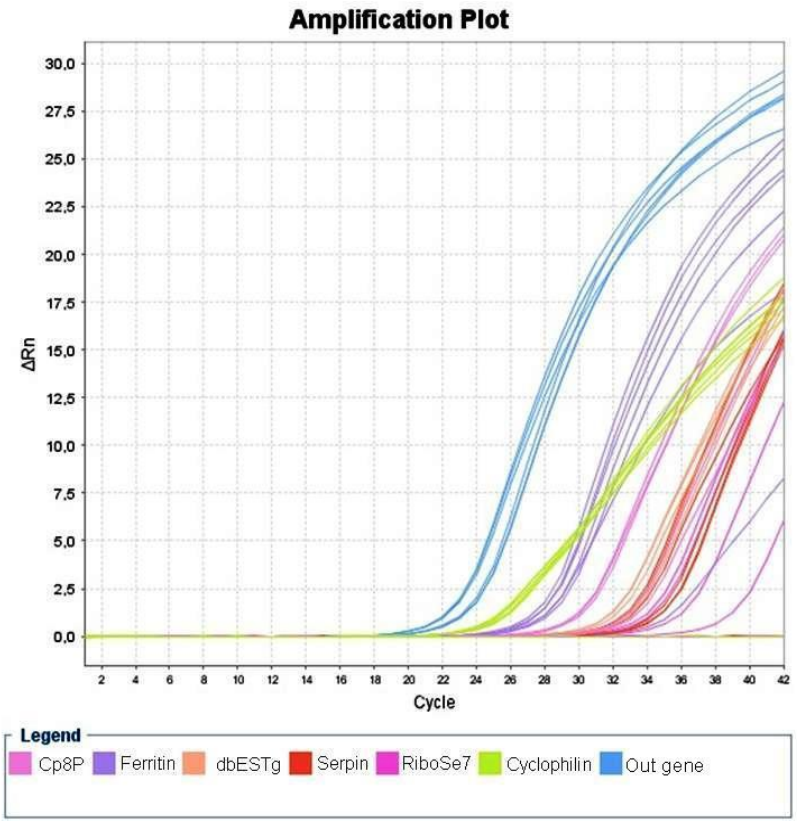


Figura 5. Amplificación de ADNc de *G. mellonella* sin tratar, con los oligos de serpina 1, precursor de proteína cationica 8 y la subunidad de 26 kDa de ferritina. Igualmente la amplificación de otros genes con el mismo cDNA de ciclofilina y riboproteínas S7e, así como el dbEST

Tabla 8. Valores de los CT (ciclos umbral, *cycle trhesold*), CT media (CT mean) y CT desviación estándar (CT SD) para cada gen estudiado. En letra negra se observan valores CT esperados para la prueba, mientras que en azul se observan algunos valores CT inesperados o indeterminados.

CTs	Cp8p	dbEST	Serpin1	Ferritin
CT G. mellon.	30.8957977	33.5633812	35.9385567	28.0694656
	31.0961418	33.7661209	35.5356903	28.1370430
	30.9027977	32.8704567	35.9017258	28.9509373
	29.3438168	33.6231461	35.9974098	28.9001331
	29.3244534	33.5654793	32.9829826	27.8467121
CTMean	30.96491241	33.47771683	35.84334564	28.51439476
CT SD	0.11370188	0.34933225	0.20885478	0.47599711
CT ***G. mellon.*** **+** ***F. oxy***	33.7812805	32.0463066	33.9007111	29.0301495
	32.0122948	31.9090900	33.8056107	29.1732044
	33.8296432	32.5918694	34.2499237	28.5619373
	34.3203239	32.5759659	32.1647797	28.8338699
	35.2267609	32.9048729	35.9385567	28.5789204
CT Mean	33.20773951	32.28080797	33.56310145	28.8356163
CT SD	1.03556788	0.35451492	0.50464285	0.27046484

3.4 Cuantificación

Para poder cuantificar es importante utilizar genes de referencia (endógenos) o *housekeeping*. En este caso se utilizaron genes universales para insectos, los cuales no deberán ser afectados por los tratamientos. La tabla 9 muestra los valores de los CT de los genes endógenos. Estos valores muestran una homogeneidad importante, lo que demuestra que no fueron afectados en los tratamientos, siendo excelentes candidatos para cuantificar la expresión de los genes de estudio. Tanto la riboproteína S7 como la ciclofilin presentan valores bastante homogéneos, al observar los valores de CT media y CT error (SD). Sin embargo, ciclofilina muestra un mejor comportamiento que la riboproteína S7, ver CT SD, tabla 9.

Tabla 9. Valores de los CT (ciclos umbral, *cycle trhesold*), CT media (CT mean) y CT desviación estándar (CT SD) para los genes endógenos

CTs	RiboS7	Cyclophilin
CT G. mellon.	24.8984394	25.9117603
	24.9394932	25.8256588
	24.7183418	25.9513187
	25.6922817	26.0426693
	25.7761402	26.0555763
CTMean	25.20493927	25.9573967
CT SD	0.49116037	0.09537446
CT G. mellon. + F. oxy.	24.8577499	25.6328716
	24.8395176	25.6733456
	23.8487206	25.5581074
	23.9183292	25.3872814
	23.8011017	25.4131603
CT Mean	24.2530838	25.53295326
CT SD	0.54529437	0.1283521

Para el cálculo de la expresión es necesario obtener la cuantificación relativa RQ (*relative quantification*), tanto mínimos como máximos para cada gen estudiado, calculados así:

$$RQ\ Min = 2(-\Delta CT - SD) / 2(-\Delta CTreferencia)$$
$$RQ\ Max = 2\ (-\Delta Ct + SD) / 2(-\Delta CTreferencia)$$

Inicialmente se observan valores diferenciales entre *G. mellonella* sola y *G. mellonella* más *F. oxysporum*, observándose que los genes que se ven más afectados para este último caso, son serpina 1 y el precursor proteína catiónica 8. Para el caso de la subunidad ferritina 26 kDa el cambio no es tan importante. Para el caso del gen (no anotado aún) correspondiente a dbEST3428491, no representa un cambio importante entre la muestra tratada y no tratada. La prueba fue realizada con la rigurosidad suficiente, como discutiremos a continuación. La figura 6 muestra los valores RQ para los 3 genes (proteínas) identificadas por iTRAQ y el gen o EST no identificado por iTRAQ.

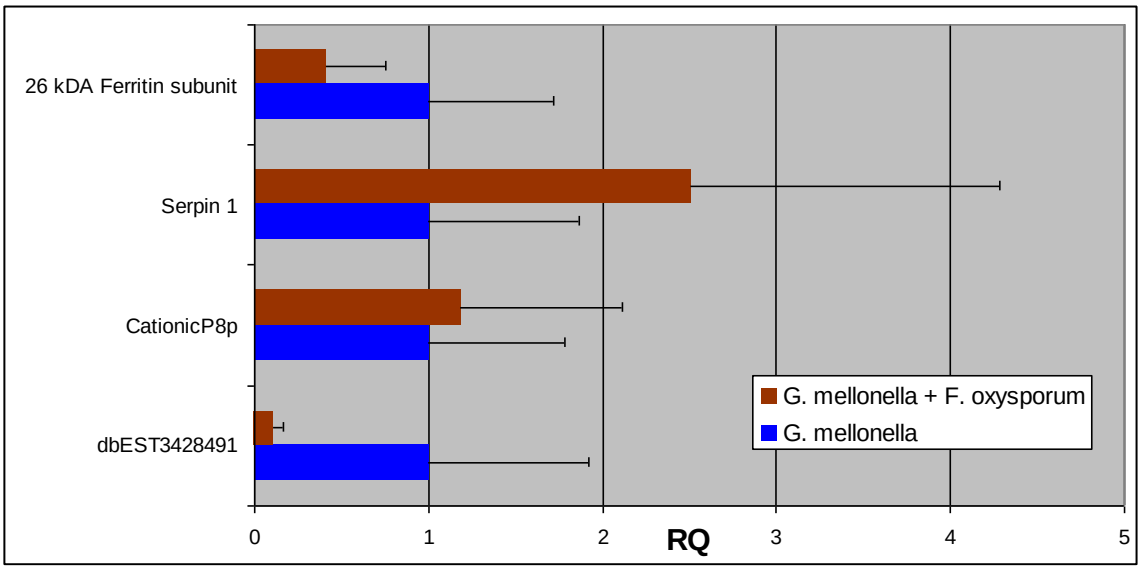


Figura 6. Las barras representan la expresión media en términos de cuantificación relativa (RQ) de las amplificaciones por qPCR. Las barras de error (desviación estandar, SD) corresponden a valores de RQ máximo (RQmax) y de RQ mínimo (RQmin) calculado a partir de la SD de los CT de las réplicas.

Los genes estudiados por qPCR de *G. mellonella* se vieron afectados por el tratamiento con *F. oxysporum*, como previamente se habían observado por iTRAQ. La figura 7 muestra los genes transcritos y proteínas comparados por las dos técnicas (*fold-changes*), en la cual no existe la misma proporcionalidad. En este caso se comparan los valores obtenidos para genes y proteínas de *G. mellonella* retadas con *F. oxysporum*. A pesar que existe una tendencia de expresión, para algunos genes se observa una mayor expresión o represión.

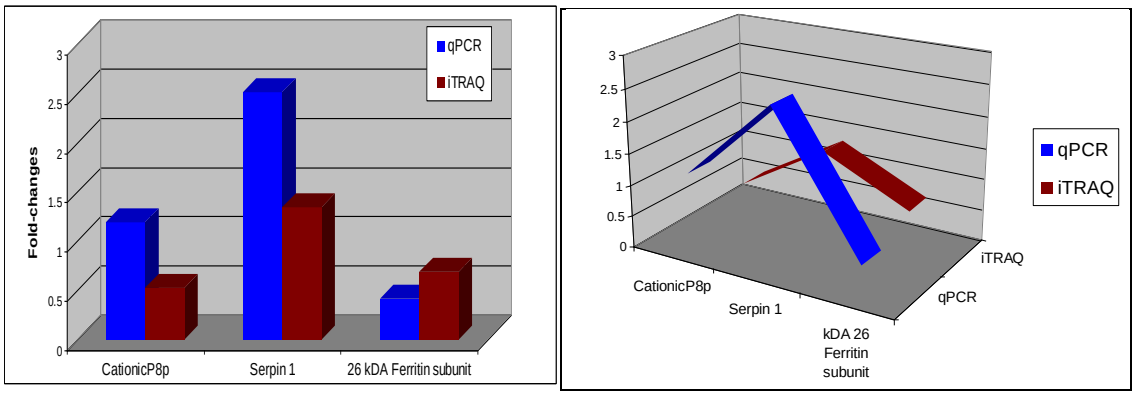


Figura 7. Comparación de *Fold-changes* entre qPCR y iTRAQ de los tres genes y proteínas estudiados por qPCR y iTRAQ. Las dos figuras están elaboradas con los mismos datos.

Al hacer una comparación de las veces de cambio o *fold-changes* en logaritmo base 2, se observan cambios aún más importantes dado que de esta manera, expresión y represión se pueden ver con mayor detalle, ver figura 8. Para el caso de proteína catiónica 8 se puede ver un contraste enorme entre represión del gen o baja regulación (*down regulation*) y

producción de la proteína. Mientras que para las proteínas serpina 1 y la subunidad de ferritina 26KDa, existe una correlación entre los tratamientos por qPCR y iTRAQ. En el caso de gen de la etiqueta dbEST3428491, no se puede establecer una correlación con iTRAQ, ver figura 8.

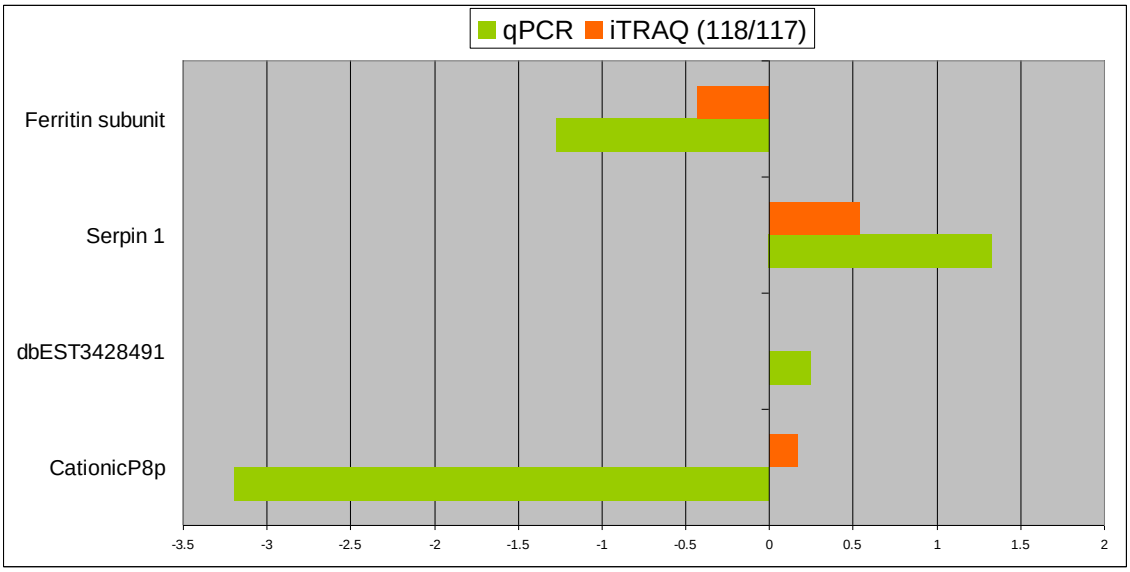


Figura 8. Validación de los datos de expresión obtenidos por iTRAQ comparados con qPCR. Los valores logarítmicos de las veces de cambio (*fold-change*) de cada gen probado por qPCR y comparado gráficamente contra los valores de los análisis obtenidos de: la subunidad de ferritina de 26kDa, cationic protein 8 precursor (el precursor de la proteína cationica 8), serpina 1 y dbEST73428491a.

3.5 Validación de la expresión del proteoma de *G. mellonella* por iTRAQ y por RT-PCR

Al validar los resultados de la expresión en iTRAQ mediante RT-PCR (qPCR), se encontraron las correlaciones estadísticas entre las proteínas analizadas por ambas técnicas. Efectivamente, los genes seleccionados: serpina 1, precursor de proteína cationica 8 y la subunidad 26 kDa de ferritina, mostraron el mismo patrón de expresión entre las concentraciones de microconidias y temperaturas analizadas. Los valores de *p* para las tres proteínas fueron superiores a 0,05 lo que indica que no existen diferencias estadísticamente significativas en los resultados obtenidos con las dos técnicas, ver los datos en las tablas S3A, S3B, S3C, S3D, S3E, S3F y figuras S1, S2 (anexo 1). Las figuras 6, 7, 8 y 9 hacen parte del análisis estadístico completo de esas mencionadas tablas y figuras, en las cuales todos los análisis se igualaron a la misma escala utilizando pruebas F y t, y finamente haciendo la prueba de bondad de ajuste por Chi-cuadrado, se constató que las diferencias estadísticas de ambas pruebas (qPCR e iTRAQ) no presentan diferencias significativas. Para el caso de la figura 8, es importante recordar que las diferencias tan grandes entre qPCR e iTRAQ están dadas por Log_2 las cuales pueden estar sobreestimadas o mejor re-escaladas, pero permiten mostrar la tendencia. Igualmente es clave recordar que la cantidad de moléculas de ARNm no siempre darán exactamente la misma cantidad de proteínas. Por

lo tanto el análisis clásico de expresión con una sola técnica requiere siempre de ajustes, para los cuales los análisis estadísticos muestran que tales valores, no exhiben diferencias estadísticamente significativas a pesar de las diferencias que se observan en las dos graficas de la figura 9 (ver capitulo 5, figuras S1 y S2).

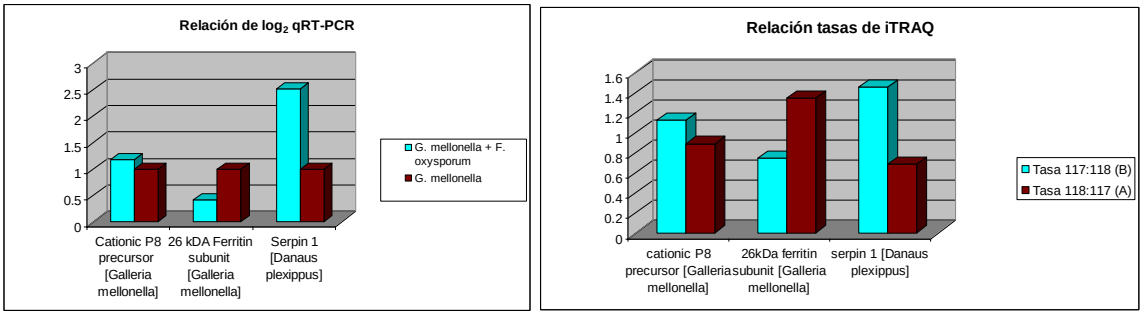


Figura 9. Relación de Log_2 qRT-PCR y relación de tasas de iTRAQ. Ambas gráficas con los mismos datos muestran los valores finales de Log2 de qPCR y las relaciones de las tasas de iTRAQ de los mismos tratamientos. Ver otros ajustes estadísticos a estos datos en figuras S1 y S2 del capítulo 5.

4. DISCUSIÓN

Muchos genes del sistema inmune de insectos, se han identificado y continúan siendo estudiados, otros tantos acaban de descubrirse con los proyectos genoma, especialmente con los genomas de *D. melanogaster* y *Anopheles gambiae*, pero queda mucho por aclarar.

Se conocen ya varios genes asociados a la defensa del ataque bacteriano (Altincicek *et al.*, 2007; Seitz *et al.;* 2003; Jander *et al.,* 2000), pero resta por conocer más acerca del ataque de hongos (Vilcinskas, 2011). El modelo polilla-hongo es bastante promisorio, dado que los dípteros presentan ya algunas diferencias importantes con lepidópteros, siendo evolutivamente cercanos (Schmid-Hempel, 2005**)**. Su sistema inmune comparte un sinnúmero de proteínas como por ejemplo, apolipoforinas, hemolinas, entre otras. Incluso hay sinumero de genes cuando se comparan estos dipteros entre ellos por ejemplo, abejas que no comparten varios genes de las cuatro vías muy bien conocidas del sistema inmune de insectos: Toll, Imd, JNK and JAK/STAT (Erler *et al*., 2011). Es importante entonces, esclarecer las mismas vías del sistema inmune de esta lepidóptera, respecto al ataque de hongos aprovechando que *G. mellonella* soporta cargas importantes de microconidias de *F. oxysporum* (ver capitulo 3), el *fitness* de esta capacidad solo es explicable por la composición genética del sistema inmune en este insecto.

Se conoce bien que el gen serpina regula la cascada de melanización en insectos; en *Drosophila* este mecanismo ha sido bien estudiado, ya hace más de 10 años (De Gregorio *et al*., 2002), sin embargo el gen serpina aún no ha sido descrito en *G. mellonella*. Serpina es una proteína que inhibe la actividad de la serina proteasa, lo que permite desencadenar el proceso de melanización en insectos, frente al ataque de patógenos. Este proceso es universal en invertebrados. La proteína serpina de *G. mellonella* fue identificada en este

trabajo (ver capitulo 5). En este capítulo se pretende verificar los datos encontrados por iTRAQ; de 3 genes y proteínas escogidos en este trabajo: la subunidad de ferritina 26kDa, el precursor de la proteína cationica 8 y la serpina 1, solo este último no se había descrito ni estudiado su regulación en *G. mellonella*.

En esta investigación, *G. mellonella* recibió una dosis elevada de microconidias de *F. oxysporum* (10^6 microconidias/mL) a 37ºC. En el capitulo 3 se demuestró que a 37ºC, *G. mellonella* es estimulada positivamente, activando su sistema inmune mejorando la supervivencia de las larvas, más que con otra temperatura. Según nuestros datos de iTRAQ, habíamos encontrado que la proteína serpina 1 fue estimulada frente al ataque del hongo como ya había sido evidenciado por otros autores (Park & Kim, 2012). Al realizar nuestros qPCR se encuentra que el gen serpina 1 se expresan de manera ligeramente diferente lo cual no es significativo, ver tablas S1A, S1B, S1C, S1D, S1E, S1F y figuras S1, S2.

Revisando las condiciones de tratamiento y los qPCR, encontramos que las condiciones de qPCR fueron bastante rigurosas. Los dos genes endógenos utilizados, no muestran expresión diferencial. Se ha referenciado bastante bien que una mala escogencia de genes *housekeeping*, puede llevar a errores incorregibles de cuantificación. Una de las primeras condiciones para cuantificar expresión génica es controlar este paso crítico (Jansen *et al.*, 2004). Un aspecto importante, es que tales genes endógenos amplifican correctamente el ADN de *G. mellonella*. Igualmente, se ha encontrado que es crítica la preparación de ADNc, pero en este caso no encontramos que los genes se hayan afectado, dado que se observa una expresión diferencial importante. Otro aspecto en que se insiste bastante, es la validación de oligonucleótidos para qPCR. En el momento de estandarizar la prueba se encuentra que los perfiles de los genes son bastante homogéneos, pero al observar los valores CT SD, ver tabla 8, se ven cambios importantes, evidenciando diferencias entre el momento de realizar los qPCR, entre los tratados con *F. oxysporum*, especialmente el gen Cp8p. Se podría especular al respecto, pero los amplificados del ARN no retado no presentan una SD tan alta. Una última evidencia aparece viendo de manera separada, ambas muestras, entonces la diferencia podría estar ligada a una de las extracciones de ARNm o a la síntesis de ADNc.

Remontando el problema técnico asociado, a sub-estimaciones y sobre-estimaciónes entre ARNm y proteínas, una correlación proporcional entre qPCR e iTRAQ fue encontrada. Es importante aclarar que para el montaje de iTRAQ se utilizaron más de 1000 larvas para obtener cada uno de los controles, y de las muestras de hemolinfa retada con *F. oxysporum*, mientras que para qPCR se utilizaron 5 larvas por cada tratamiento. Son dos problemas técnicos que no son simples de superar dado que siempre se producirán más moléculas de ARNm que no siempre serán traducidas. Lo que sabemos hoy día, del funcionamiento molecular y celular, es que tales procesos no son una simple ecuación de la actividad de un gen y de la producción de una proteína. Por esa misma razón, no es fácil relacionar cuantitativamente un transcriptoma con un proteoma sin la participación de un genoma, como es el caso de *G. mellonella* que carece de este último. Una de las razones por las cuales se utilizó TRIZOL, es que permite extraer ARN de manera generosa; pero obtener ARN de más de 5 larvas resultaría técnicamente problemático. Este último aspecto, es un

asunto nada despreciable, dado que nuestro iTRAQ tiene un diseño experimental altamente robusto. Sin embargo el qPCR muestra también resultados positivos importantes dado que presenta los mismos perfiles de expresión.

Los análisis transcriptómicos realizados por Vogel *et al*. (2011), son difíciles de correlacionar con nuestro trabajo de proteomica, dado que los modelos moleculares son muy diferentes y por tanto las proteínas encontradas y analizadas no presentan las mismas coincidencias en cuanto a los niveles de expresión. Para concluir, llama la atención que diferentes autores han reportado diferencias importantes para serpina (serpina inhibidor de proteasa), dado que puede tener *splicing* alternativo (Kanost, 1999), ya que es un gen extendido en animalia y no es exclusivo de insecta, pero que es un gen y proteína clave para el sistema inmune de artropoda.

6. CONCLUSIONES

No muchos genes han sido estudiados simultáneamente en *G. mellonella* utilizando qRT-PCR o dicho de manera resumida qPCR. Si bien, la técnica es indirecta y compleja, si se compara con la nueva técnica de generación de transcriptomas, donde se ahorra el paso de cDNA, la qPCR es una técnica bastante válida para el análisis de cualquier gen y en nuestro caso, para el estudio de estos tres genes, como lo pudimos constatar en este trabajo que se hizo uso de la qPCR para la validación de la proteómica por iTRAQ.

La validación estadística de la expresión de proteínas por qPCR nos permitió inferir que los datos de expresión obtenidos por iTRAQ fueron consistentes. Es probable que todas las proteínas expresadas en condiciones de estrés no presenten la misma correlación de concentración entre ARNm y proteína en todos los tratamientos (infección con microconidias y alta temperatura), pero al menos las tres proteínas consideradas si presentan correlación con iTRAQ y con qPCR que las expresión de genes y proteínas no sólo se debe al efecto de la respuesta inmunológica, sino que además algunas proteínas fueron estimuladas por la temperatura o la metamorfosis hacia adulto. En nuestro caso, la infección y el aumento de la temperatura fueron las principales causas de sobre-expresión de muchas de las proteínas estudiadas, con lo soportado previamente con metadatos bibliográficos (capitulo 5). Sin embargo, es necesario profundizar en el estudio del sistema modelo *G. mellonella-F. oxysporum* para mejorar la comprensión del sistema inmune innato de los lepidópteros frente al ataque fúngico.

7. BIBLIOGRAFÍA

Altincicek B, Linder M, Linder D, Preissner KT, Vilcinskas A. Microbial Metalloproteinases Mediate Sensing of Invading Pathogens and Activate Innate Immune Responses in the Lepidopteran Model Host *Galleria mellonella*. Inf. Immun. 2007;75(1):175–183.

Brown SE, Howard A, Kasprzak AB, Gordon KH, Peter D. The discovery and analysis of a diverged family of novel antifungal moricin-like peptides in the wax moth *Galleria mellonella*. Insect Biochem. Mol. Biol. 2008;38:201–212.

Coleman JJ, Muhammed M, Kasperkovitz PV, Vyas JM, Mylonakis E. *Fusarium* pathogenesis investigated using *Galleria mellonella* as a heterologous host. Fungal Biol. 2011;115(12):1279–1289.

Cytryska M, Mak P, Zdybicka-Barabas Z, Suder P, Jakubowicz T. Purification and characterization of eight peptides from *Galleria mellonella* immune hemolymph. Peptides. 2007;28:533-546.

De Gregorio E, Han SJ, Lee WJ, Baek MJ, Osaki T, Kawabata S, *et al*. An immune-responsive Serpin regulates the melanization cascade in *Drosophila*. Dev. Cell. 2002;3(4):581-592.

Erler S, Popp M, Lattorff HMG. Dynamics of Immune System Gene Expression upon Bacterial Challenge and Wounding in a Social Insect (*Bombus terrestris*). PLoS ONE. 2011;6(3):e18126.

Glastad KM, Hunt BG, Yi SV, Goodisman MAD. DNA methylation in insects: on the brink of the epigenomic era. Insect Mol. Biol. 2011;20(5):553-565.

Feliciello I, Parazajder J, Akrap I, Ugarković Đ. First evidence of DNA methylation in insect *Tribolium castaneum*: Environmental regulation of DNA methylation within heterochromatin. Epigenetics. 2013;8(5):534-541.

Frank DN, Pace NR. "Ribonuclease P: unity and diversity in a tRNA processing ribozyme". Annu. Rev. Biochem. 1998;67:153–180.

Fuchs BB, Bishop LR, Kovacs JA, Mylonakis E. *Galleria mellonella* are resistant to Pneumocystis murina infection. Mycopathologia. 2011;171(4):273-277.

Fuchs BB, O'Brien E, El Khoury JB, Mylonakis E. Methods for using *Galleria mellonella* as a model host to study fungal pathogenesis. Virulence. 2010;1(6):475–482.

Fuchs BB, Mylonakis E. Using non-mammalian hosts to study fungal virulence and host defense. Curr. Opin. Microbiol. 2006;9(4):346–51.

Jander G, Rahme LG, Ausubel FM. Positive correlation between virulence of *Pseudomonas aeruginosa* mutants in mice and insects. J. Bacteriol. 2000;182(13):3843–3845.

Kanost MR. Serine proteinase inhibitors in arthropod immunity. Dev. Comp. Immunol. 2009;23:291-301.

Kavanagh K, Reeves EP. Exploiting the potential of insects for in vivo pathogenicity testing of microbial pathogens. FEMS Microbiol. Rev. 2004;28(1):101–112.

Llott NE, Ponting CP. Predicting long non-coding RNAs using RNA sequencing. Methods. 2013;63(1):50-59.

Magistri M, Faghihi MA, St Laurent G.3rd, Wahlestedt C. Regulation of chromatin structure by long noncoding RNAs: focus on natural antisense transcripts. Trends Genet. 2012;28(8):389-396.

Park JA, Kim Y. Eicosanoid biosynthesis is activated via Toll, but not Imd signal pathway in response to fungal infection. J. Invertebr. Pathol. 2012;110(3):382-388.

Pauchet Y, Wilkinson P, Vogel H, Nelson DR, Reynolds SE, Heckel DG, *et al*. Pyrosequencing the Manduca sexta larval midgut transcriptome: messages for digestion, detoxification and defence. Insect Mol. Biol. 2010;19:61-75.

Prados-Rosales RC, Roldán-Rodríguez R, Serena C, López-Berges MS, Guarro J, Omartínez-del-Pozo, *et al*. A PR-1-like protein of *Fusarium oxysporum* functions in virulence on mammalian hosts. J. Biol. Chem. 2012;287(26):21970-21979.

Schmid-Hempel P. Evolutionary ecology of insect immune defenses. Annu. Rev. Entomol. 2005;50:529-551.

Seitz V, Clermont A, Wedde M, Hummel M, Vilcinskas A, Schlatterer K, *et al*. Identification of immunorelevant genes from greater wax moth (*Galleria mellonella*) by a subtractive hybridization approach. Dev. Comp. Immunol. 2003;27:207–215.

Vilcinskas A. Insects emerge as valuable model hosts to explore virulence. Virulence. 2011;2(5):376–378.

Vogel H, Altincicek B, Glöckner G, Vilcinskas A. A comprehensive transcriptome and immune- gene repertoire of the lepidopteran model host *Galleria mellonella*. BMC Genomics. 2011;12:308.

Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. Nat. Rev. Genet. 2009;10(1):57–63.

Wojda I, Jakubowicz T. Humoral immune response upon mild heat-shock conditions in *Galleria mellonella* larvae. J. Insect Physiol. 2007;53:1134–1144.

Zhang Y, Huang J, Zhou B, **Zhang C, Liu W, Miao X, *et al*.** Up-regulation of lysozyme gene expression during metamorphosis and immune challenge of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera.* Arch. Insect Biochem. Physiol. 2009;70(1):18–29.

Zou Z, Najar F, Wang Y, Roe B, Jiang H. Pyrosequence analysis of expressed sequence tags for *Manduca sexta* hemolymph proteins involved in immune responses. Insect Biochem. Mol. Biol. 2008;38:677-682.

ANEXO 1

Tabla y gráficos S1. Validación de resultados obtenidos por iTRAQ con q-PCR. Los conjuntos de tablas S6 (A, B, C, D, E y F) y resultados (D y E).

Tabla S1A. Par de canales seleccionados al azar. Los datos siguientes (tablas y gráficos) representan el análisis estadístico para evaluar la relación entre iTRAQ y q-PCR.

Canal iTRAQ	Tratamiento
117	Hemolinfa retada con *F. oxysporum*, 10^6 microconidia/mL a 37ºC
118	Hemolinfa inyectada unicamente con Tween-80 (0.1% v/v) a 37ºC

Tabla S1B. iTRAQ relación de tasas de proteína

Proteína	Tasa 117:118 (A)	Tasa 118:117 (B)
cationic protein 8 precursor [Galleria mellonella]	1,1234	0,8901
26kDa ferritin subunit [Galleria mellonella]	0,7439	1,3443
serpin 1 [Danaus plexippus]	1,4552	0,6872

Tabla S1C. Q-PCR a partir de mRNA

Gen	117 tratamiento (C)	118 tratamiento (D)
CationicP8p *Galleria mellonella*	1,1851	1
26 kDA Ferritin subunit *Galleria mellonella*	0,4137	1
Serpin 1 *Danaus plexippus*	2,5112	1

Tabla S1D. Comparación iTRAQ-Q-PCR

Proteína o gen	A/B	C/D	Diferencia	tasa
cationic protein 8 precursor *Galleria mellonella*	1,2621	1,1851	0,0770	1,06
26kDa ferritin subunit *Galleria mellonella*	0,5534	0,4137	0,1397	1,34
serpin 1 *Danaus plexippus*	2,1176	2,5112	0,3936	0,84

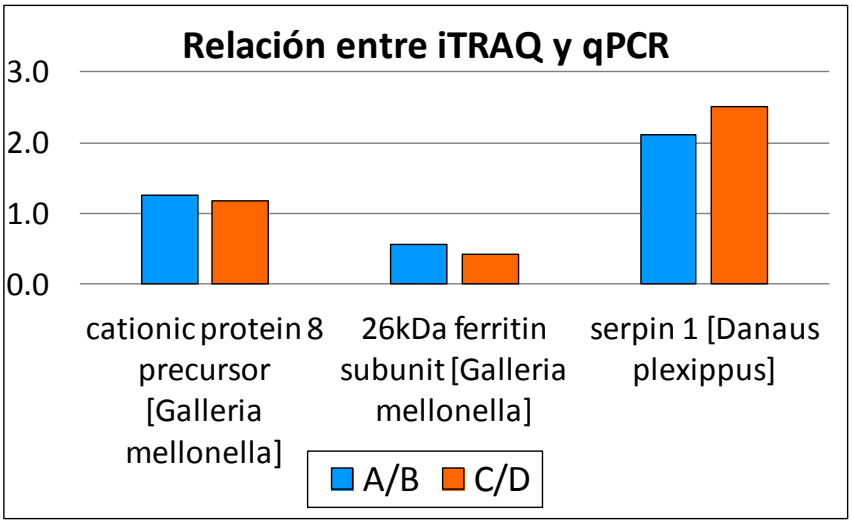


Figura S1. Datos de la tabla S1D

Tabla S1E. Comparación de Q-PCR-iTRAQ

Proteína o gen	**B/A**	**D/C**	**Diferencia**	**tasa**
cationic protein 8 precursor *Galleria mellonella*	0,792	0,844	0,0515	0,94
26kDa ferritin subunit *Galleria mellonella*	1,807	2,417	0,6101	0,75
serpin 1 *Danaus plexippus*	0,472	0,398	0,0740	1,19

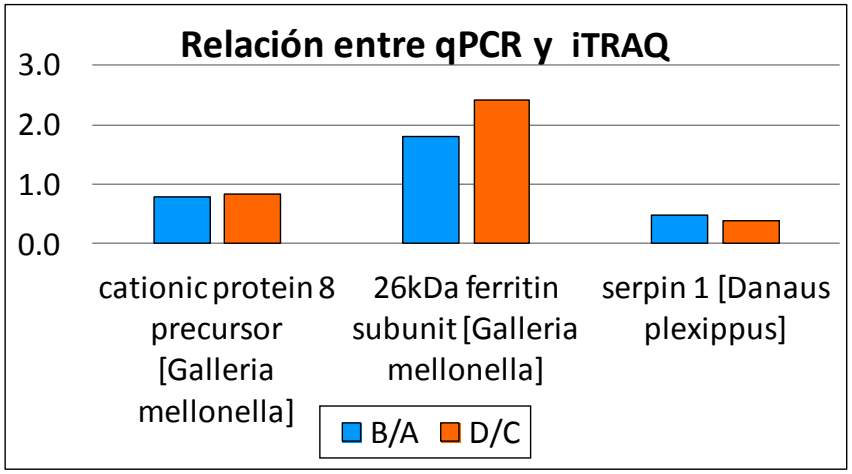


Figura S2. Dats de la tabla S1E

Tabla S1F. Chi-cuadrado para iTRAQ-Q-PCR

Proteína o gen	**Chi-Cuadrado**	**df**	**Valor-p**
cationic protein 8 precursor *Galleria mellonella*	0.002	1	0.9646
26kDa ferritin subunit *Galleria mellonella*	0.0408	1	0.8399
serpin 1 *Danaus plexippus*	0.0136	1	0.9072

HIPOTESIS DEL MODELO CELULAR Y MOLECULAR DE LAS PROTEÍNAS DE *G. mellonella*

En el escenario del reto inmunológico *a priori* al que fue sometida *G. mellonella* con las microconidias de *F. oxysporum* en condiciones de 10^4-10^6 por mL a 37°C, es posible hipotetizar acerca de la respuesta inmune innata de la larva al ataque del hongo. En el seguimiento por iTRAQ de 17 proteínas identificadas en todos los 8 ensayos, iTRAQ 8-plex (iTRAQ-8 *channels*), se pudieron observar cambios importantes entre las muestras retadas a 10^4 y 10^6 microconidias/mL cambiando la temperatura de 25 a 37°C. La lista de estas 17 proteínas se encuentra en el capítulo 5, tabla 2, además se incluyen 2 proteínas más, Serina-proteasa de *G. mellonella* y HSP90 de *F. oxysporum*

La red funcional graficada en la figura 1, fue lograda con los datos obtenidos por iTRAQ y empleando el programa Cytoscape, éste programa permite construir redes de proteínas asociándolas por función (figura 2). En este caso se tomaron los datos de función: transporte, respuesta inmune, oxidación-reducción, almacenamiento y procesos catabólicos. En la red observamos los mismos tratamientos previamente mostrados, al igual que se muestran los proceso biológicos, uniendo por nodos las proteínas asociadas.

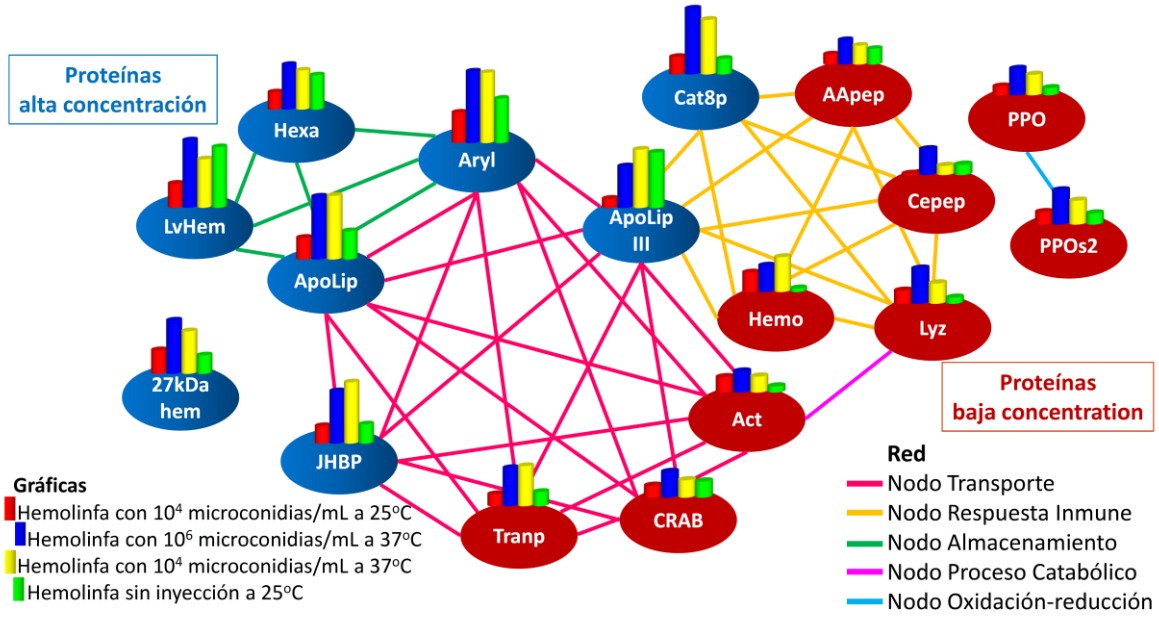
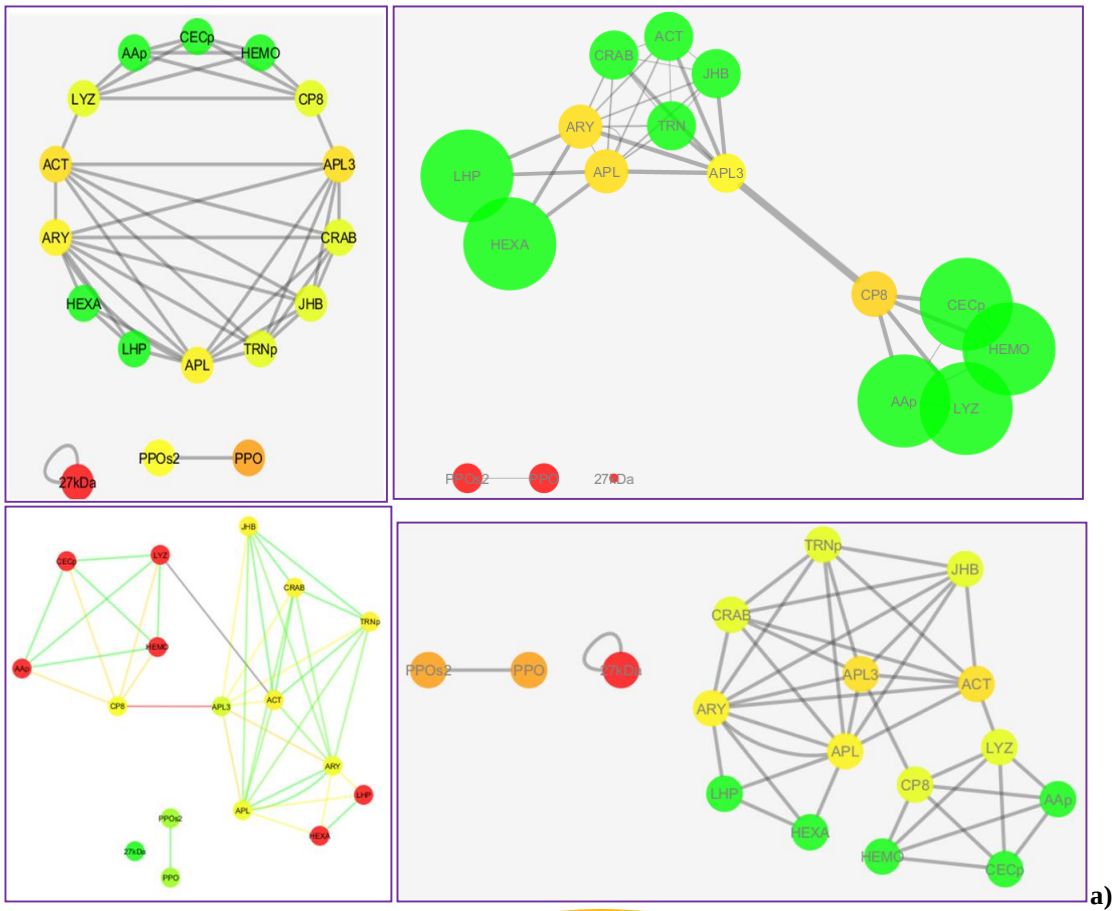
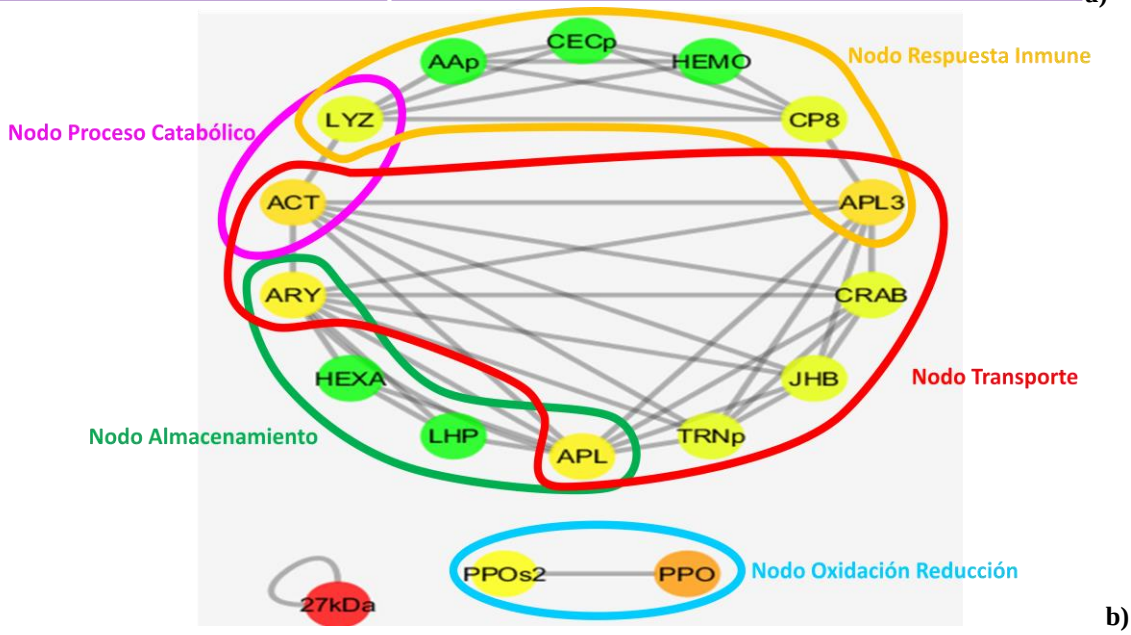


Figura 1. Red funcional realizada con las 17 proteínas caracterizadas de *G. mellonella* a 37°C, 10^4-10^6 microconidia/mL.



a)



b)

Figura 2. a) Resultados del análisis de las 17 proteínas caracterizadas de *G. mellonella*, con el programa de Cytospcape; **b)** Proteínas agrupadas formando nodos para las funciones: transporte, respuesta inmune, oxidación-reducción, almacenamiento y procesos catabólicos.

Al inyectar mecánicamente con jeringa las microconidias de *F. oxysporum*, (figura 3) se desencadena una cascada de proteínas que están presentes en el hemocele de *G. mellonella*, para defenderse de las toxinas de *F. oxysporum*, como son las fumonicinas y tricocetenas entre otras, así como de las proteasas que porta la microconidia, está también la proteína HSP90 que estabiliza proteínas del hongo. Entonces se desencadena la respuesta de defensa de la larva, para ello las toxinas son oxidadas con la participación de la fenoloxidasa (PO) la cual es activada por la profenoloxidasa (PPO), las proteasas son inhibidas por la lisozima (Lyz) al tiempo que las proteínas del hongo son atacadas por proteasas de la larva como es el caso de la Serin-proteasa (SerP), que ataca aminoácidos de serina con histidina dejando libre aminoácidos aromáticos, como en el caso de la histidina. Estos aminoácidos aromáticos son tomados por otras proteínas que los usarán para nuevos procesos que se desencadenarán -incluida la metamorfosis- tal como la proteína arylforina (Aryl) que los usará para comenzar la formación de pupa, y otras proteínas como la hexamerina (Hex), que tomará los otros tipos de aminoácidos que serán llevados a las células para la síntesis de proteínas en las células de la larva. Al ser debilitadas las microconidias por este primer ataque, otras proteínas vienen a participar para debilitar las microconidias y fagocitarlas o atraparlas en nódulos.

Los péptidos antimicrobianos como el aniónico (AApep) y Cecropina-D-*like* (Cepep), se fijan a las microconidias para ayudar en su reconocimiento y debilitamiento. Posteriormente, proteínas como la Catiónica 8 (Cat8p) y hemolina (hem) son las encargadas de conducir las microconidias para que sean fagocitadas. Por otro lado, se comienzan a desencadenar dos procesos que podrían garantizar supervivencia: uno, la larva empupa, proceso mediado por proteínas como la Aryl y Hex, y dos, la melanización mediada por procesos de la proteína PPO y PO. Finalmente en el proceso de supervivencia después de haber sido debilitadas enormemente las microconidias, éstas son encapsuladas en gránulos formados por células fagocitarias y por lípidos (LPs) que se componen de ésteres del ácido eicosanoide entre otros. Esto lípidos son transportados por proteínas como la apolipoforina (APL), proceso que es estimulado por la apolipoforina III (APLIII), pero igualmente APL transporta proteínas como la proteína de unión a la hormona juvenil (JHBP), la cual previene que la hormona juvenil sea hidrolizada por efecto del ataque.

Por otra parte, las proteínas que se encuentran en las células de defensa como son actina (Actin) y la proteína celular de unión al ácido retinoico (CRABP) intervienen considerablemente en la actividad celular, la primera en la motilidad y la segunda, llevando ácido retinoico hasta el ADN. En toda esta actividad de defensa inmunitaria del insecto, son muy importantes los procesos de oxigenación para contrarrestar la excesiva actividad de oxidación. En ese proceso se mantiene activa y se produce en buena cantidad, la proteína de hemolinfa larval (LvHe) que atrapa gran cantidad de oxígeno, pero igualmente proteínas como la transferrina (Trans) que se encargan de atrapar el hierro para impedir que hongo lo utilice, el cual es muy importante para el proceso de virulencia del patógeno. La proteína 27 kDa hemolinfa (27kDa) fue descrita hace 10 años en NCBI y UNNIPROT, pero todavía no se ha definido su función en *G. mellonella*, dicha proteína fue analizada por bioinformática para tratar de identificar sus dominios funcionales, siendo clasificada como una proteína

con actividad treonina-fosforilasa. Previamente, ningún estudio de *G. mellonella* había descrito estas 17 proteínas en una misma investigación de reto inmunitario con hongos.

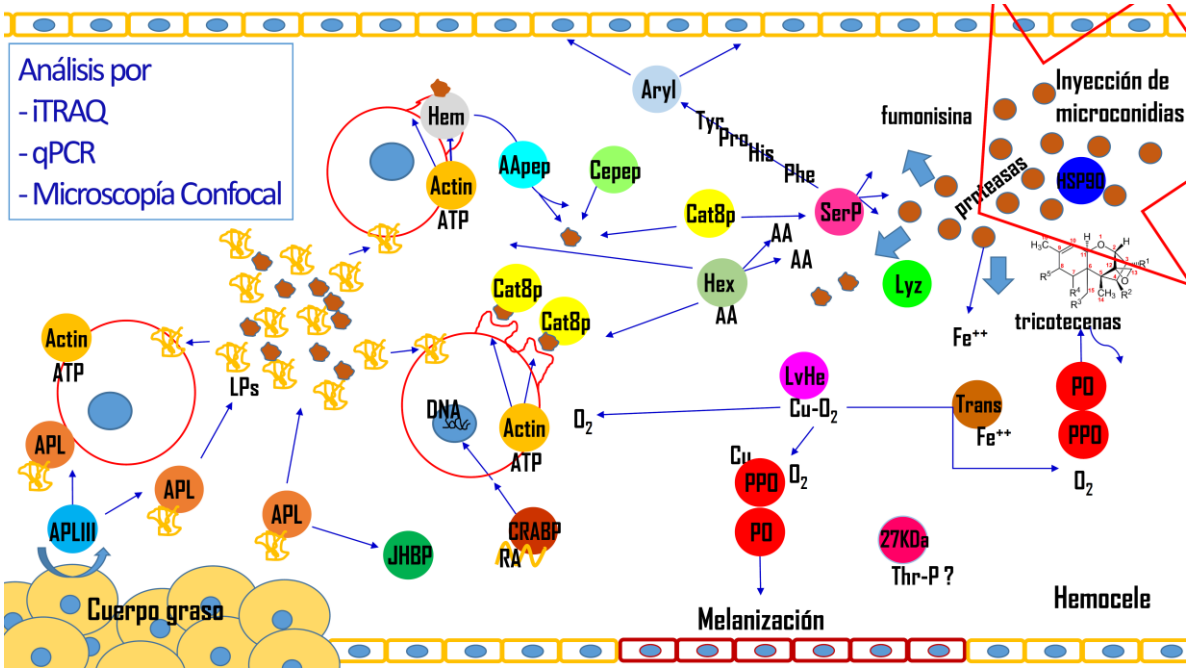


Figura 3. Modelo de interacción celular y molecular (interactoma). Hipótesis propuesta con las 17 proteínas investigadas en el modelo huésped-patógeno.

CONCLUSIONES GENERALES

Se estandarizó el proceso de cría y manejo de la colonia de *Galleria mellonella* para garantizar la producción constante de larvas de óptima calidad que cumplen con los estándares de tamaño, peso y color, ideales para llevara a cabo ensayos de patogenicidad de microorganismos.

Se determinó que el sistema de cría es estadísticamente reproducible, con muy poca variabilidad en el proceso experimental.

Se estableció una metodología adecuado para la manipulación e inyección de las larvas, que permite la inoculación cuantitativa de microorganismos.

Se logró estandarizar la metodología para el cultivo y mantenimiento de la cepa de *Fusarium oxysporum,* que permitió la obtención de diferentes concentraciones de microconidias viables para ser empleadas en los ensayos de infección de larvas de *G. mellonella.*

Se determinó el efecto de la temperatura en el crecimiento radial de *F. oxysporum*, encontrándose una relación inversa con la temperatura, presentándose menor crecimiento radial a 37 que a 30°C, sin embargo, se estableció que el porcentaje de microconidias que germinaron (viabilidad) a ambas temperaturas fue equivalente.

Se identificaron las concentración letal y sub-letal de micrconidias de *F. oxysporum* inoculadas en *G. mellonella*, y se estableció la dosis donde se presentó mayor supervivencia de las larvas a la infección fúngica

Las larvas de *G. mellonella* sobrevivieron a dosis elevadas de microconidias del patógeno *F. oxysporum*, especialmente cuando las larvas son sometidas a incubación de 37°C durante las 48 horas que siguen a la infección fúngica.

Se determinó la actividad anti-fúngica de la hemolinfa de larvas sometidas a diferentes retos inmunológicos, encontrándose que las larvas pre-inoculadas con la bacteria láctica, *L. plantarum* 24 horas antes de someterlas al reto con el hongo, resistieron mejor el ataque fúngico y su supervivencia fue más elevada que las larvas que no fueron pre-inoculadas con la bacteria láctica.

Se observó el efecto que a nivel celular produjo la infección de las larvas de *G. mellonella* con microconidias de *F. oxysporum,* mediante microscopía láser confocal

Se lograron identificar péptidos y proteínas expresados en respuesta al reto fúngico, mediante el empleo de la tecnología de etiquetas isobáricas para cuantificación relativa y absoluta (iTRAQ).

El enfoque proteómico cuantitativo empleando iTRAQ fue fiable para detectar y cuantificar los niveles de expresión de proteínas y péptidos del sistema inmune del insecto, que muestra expresiones diferenciales con diferentes temperaturas y concentraciones de microconidias.

Este estudio proteómico permitió un seguimiento del mejoramiento de la respuesta inmune de *G. mellonella* al desafío con *F. oxysporum* a 37°C. En particular, se encontró que con 10^4 microconidias / mL a 37°C se sobre-expresaron muchas más proteínas que con otros tratamientos.

Se estudiaron genes de *G. mellonella* producidos en defensa a la invasión fúngica, por medio de qPCR y pérfiles de expresión transcripcional.

Se llevó a cabo la validación estadística de la expresión de proteínas por qPCR, lo que nos permitió inferir que los datos de expresión por iTRAQ fueron consistentes.

La técnica iTRAQ permitió identificar proteínas del patógeno fúngico, aunque no en la misma proporción que del huésped. Como hipótesis se puede inferir que es necesario un mejor tratamiento de la proteínas, pues gran cantidad de proteínas de *F. oxysporum* quedan atrapadas entre los glicolípidos antimicrobianos de la hemolinfa. Quizás el mismo efecto pudo suceder con los péptidos de *L. plantaum.*

La técnica iTRAQ permitió identificar 59 proteínas de *G. mellonella* y 4 de *F. oxysporum*, y se logró estudiar en varias de ellas su expresión bajo condiciones de estrés, su actividad en el sistema inmune e inferir incluso su estructura. En total 29 proteínas de *G. mellonella* y 1 de *F. oxysporum* pudieron ser caracterizadas en este modelo huésped-patógeno.

Se estableció un modelo celular y molecular de la relación huésped-patógeno de los genes involucrados, mediante el empleo de herramientas bioinformáticas.

CONTRIBUCIÓN

Esta investigación contribuye a posicionar a *G. mellonella* como un organismo modelo completo para estudios de patogenicidad fúngica. La importancia del estudio el sistema modelo: *Fusarium oxysporum-Galleria mellonella* se apoya, primero, en el grave problema que representa este hongo tanto para la salud humana, como para plantas y animales, y segundo, en las ventajas que representa la herramienta *G. mellonella,* al poder infectarla fácilmente con el hongo. En esta investigación se ha empleado por primera vez la tecnología iTRAQ para el estudio del proteoma de este sistema modelo (hongo-insecto), contribuyendo a dilucidar el mecanismo de defensa del insecto y el mecanismo de ataque del patógeno, a fin de encontrar a futuro, estrategias de control del hongo, pues en el caso de las infecciones fúngicas en general, estas siguen siendo una causa significativa de morbilidad y mortalidad entre los pacientes inmunológicamente comprometidos, además, *F.*

oxysporum representa uno de los mayores problemas a nivel de agronómico en todo el mundo.

PERSPECTIVAS

Las larvas de *G. mellonella* son capaces de sobrevivir a dosis elevadas de microconidias del patógeno *F. oxysporum*, especialmente cuando las larvas son sometidas a incubación de 37°C durante las 48 horas que siguen a la infección fúngica, resultado relevante, pues abre perspectivas a nuevas investigaciones que utilicen este modelo invertebrado para estudios de patogenicidad fúngica, si se tiene en cuenta el interés generalizado de estudiar rasgos de virulencia asociados a la temperatura de mamíferos.

Es necesario continuar con estudios de caracterización genética y proteómica, que sumados a la utilización de nuevas tecnologías de biología computacional, ayudarán a llenar los vacíos existentes en el conocimiento de *G. mellonella*, que permitan en un futuro cercano posicionarla como un modelo invertebrado de primera línea en la investigación de la patogenicidad fúngica.