

PRESENCIA DE PÉPTIDOS EN LA HEMOLINFA DE TRIATOMA (*Meccus pallidipennis* (HEMÍPTERA: REDUVIIDAE) INFECTADO CON *Trypanosoma Cruzi*, *Trypanosoma rangeli* Y BACTERIAS)

Paulina Díaz-Garrido, Ignacio Martínez-Martínez y Bertha Espinoza Gutiérrez✉

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Departamento de Inmunología. Avenida Universidad 3000, Alcaldía Coyoacán, C. P. 04510, Ciudad de México.

✉Autor de correspondencia: besgu@iibiomedicas.unam.mx

RESUMEN. La composición de la hemolinfa consta principalmente de moléculas de agua, azúcares, aminoácidos libres y péptidos. Dentro de los péptidos, los más abundantes son los péptidos antimicrobianos (PAM's) que aparecen rápidamente en el hemocele ante la presencia de algún organismo potencialmente patógeno y los neuropéptidos que participan en procesos fisiológicos. Se han identificado PAMs y neuropéptidos en *T. pallidipennis*, sin embargo la mayoría de los trabajos se enfocan en la expresión a nivel de mensajero y no existen datos a nivel de hemolinfa, por ello el objetivo de este trabajo fue analizar el perfil peptídico de la hemolinfa de *T. pallidipennis* cuando se encuentra infectado con diferentes microorganismos.

Palabras clave: Hemolinfa, péptidos, *Triatoma pallidipennis*.

Presence of peptides in the hemolymph of *Triatoma pallidipennis* (Hemiptera: Reduviidae) after an infection with *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma rangeli* and bacteria

ABSTRACT. The composition of the hemolymph consists of a variety of molecules like water, sugars, free amino acids and peptides. The most abundant peptides of the hemolymph are de antimicrobial peptides (AMPs) which are present in the hemocele after the presence of potentially pathogenic agents. Also the neuropeptides that participate in physiological process can be found in hemolymph. AMPs and neuropeptides have been identified in *T. pallidipennis*, however most of the published works focus on the expression of genes but there is not information of their presence in hemolymph. Therefore, the aim of this work was analyze the peptide profile of hemolymph of *T. pallidipennis* infected with different microorganisms.

Key words: Hemolymph, peptides, *Triatoma pallidipennis*.

INTRODUCCIÓN

Los Péptidos Antimicrobianos (PAMs) son componentes del sistema inmunológico de los insectos, estas moléculas efectoras, tienen diferentes tipos de actividad antimicrobiana (contra hongos, virus, parásitos y bacterias) y están ampliamente distribuidas en la naturaleza (Zhang & Gallo, 2016). Los PAMs en insectos son sintetizados principalmente por el cuerpo graso y por los hemocitos circulantes de la hemolinfa (Bulet, et al., 1999). La síntesis de estas moléculas se da tras el reconocimiento de los Patrones Moleculares Asociados a Patógenos, lo cual desencadena la activación de diferentes vías de señalización y con ello la síntesis de diferentes PAMs (Tsakas & Marmaras, 2010). *Triatoma (Meccus) pallidipennis* (*T. pallidipennis*) es una especie de vector endémica de México con importancia epidemiológica por ser uno de los principales transmisores de *Trypanosoma cruzi* (agente causal de la Enfermedad de Chagas) en el país (Espinoza, et al., 2013). Muchos tripanosomátidos completan su ciclo de vida en el hemocele o en el tracto digestivo de insectos que son vectores de ellos. Los insectos vectores de *T. cruzi* contraen al parásito cuando se alimentan de sangre de mamíferos previamente infectados, el parásito solo se aloja en el tracto digestivo de los insectos y sale en las heces de este para así propagar la infección (Kollien & Schaub, 2000). Se ha reportado la sobre expresión de genes codificantes de PAMs en especies de vectores sudamericanos cuando se encuentran en presencia de *T. cruzi* (Vieira, et al., 2016), sin

embargo, la presencia del parásito en el insecto no provoca la muerte del insecto. Por otro lado, *Trypanosoma rangeli* (*T. rangeli*) es un protozoario flagelado, no patógeno del humano, pero sí de vectores de *T. cruzi* del género *Rhodnius*, *Panstrongylus* y *Dipetalogaster*. A diferencia de *T. cruzi*, este parásito viaja del tracto digestivo a la hemolinfa y de ahí a glándulas salivales, por lo que infecta diferentes tipos de células (Vallejo, et al., 2015). Actualmente existe poca información sobre el efecto que tiene *T. cruzi* en especies de triatomos mexicanas, tampoco hay reportes de *T. rangeli* en Triatomos mexicanos, por lo que el objetivo de este trabajo fue examinar la presencia de péptidos a nivel de hemolinfa de *T. pallidipennis* por medio de la infección con diferentes microorganismos por diferentes vías.

MATERIALES Y MÉTODO

Infección con *T. cruzi*. Se utilizaron 14 ninfas de V estadio de *T. pallidipennis*, 7 insectos se alimentaron con ratones infectados con *T. cruzi* (cepa Ninoa) en su punto máximo de parasitemia y 7 se alimentaron con ratones sanos. Los insectos se pesaron antes y después de la alimentación y se separaron por grupos según la cantidad de sangre ingerida. Para la extracción de hemolinfa se realizó una cinética a diferentes días post alimentación (controles) y post infección (3, 7, 17, 24 y 31) de tal forma que se siguiera el recorrido del parásito por el tracto digestivo del insecto hasta salir en las heces como tripomastigote metacíclico. La hemolinfa colectada por día se juntó en pool y se mezcló en una proporción 1:1 con buffer anticoagulante (0.098mM NaOH, 0.14M NaCl, 0.017M EDTA, 0.041M ácido cítrico pH 4.5 (Mead, et al., 1986) e inhibidores de proteasas (PMSF 200mM, Leupeptin 10mM y Pepstatin 1mM).

Infección con *T. rangeli*. Se utilizaron 14 ninfas V estadio, 7 se infectaron intrahemocíclicamente con diferentes cantidades de *T. rangeli* (100,000, 500,000 y 1×10^6 de parásitos) y 7 se inocularon con solución salina como controles. Se realizó una cinética post inoculación para la extracción de hemolinfa (1, 7 y 14).

Infección con bacterias. Se utilizaron las bacterias *Escherichia coli*, *Listeria innocua* y *Micrococcus luteus*. Las bacterias se crecieron en medio LB a 37°C, 200 rpm por 18 hrs, al día siguiente se re-inocularon en LB hasta llegar a una D.O.₆₀₀ 0.6, 1ml se tomó y se centrifugó por 1 minuto a 13,000 rpm, el sobrenadante se retiró y la pastilla se resuspendió en 50 µl de solución salina estéril. Se infectaron tres insectos por cada bacteria y tres insectos solo con solución salina para los controles, cada insecto se inoculó intrahemocíclicamente con 6 µl de bacterias y los controles con 6 µl de solución salina

Análisis del perfil peptídico. Las proteínas presentes en la hemolinfa se cuantificaron por el método de Lowry. Posteriormente, se realizaron electroforesis de proteínas en geles de acrilamida (SDS/PAGE) al 14% en buffer de Tricina para separar mejor la región de pesos moleculares menores a 100 kDa (Schägger & Von Jagow, 1987).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se analizó el perfil peptídico (por debajo de los 11 kDa) de la hemolinfa de insectos infectados por vía oral (*T. cruzi*) y por vía intrahemocélica (*T. rangeli* y bacterias).

La hemolinfa de insectos alimentados con sangre de ratones sanos e infectados con *T. cruzi* poseen 7 péptidos, de estos 2 tuvieron cambios, uno de 9 kDa y otro de 8 kDa. El de 9 kDa está presente en el grupo de insectos no infectados (C) desde el inicio de la cinética, sin embargo, en insectos infectados (I) se observa con claridad hasta el día 24 post infección (p.i.), y baja su abundancia para el día 31 tanto en insectos control, como en infectados. El péptido de 8 kDa se observa en menor concentración en insectos control y en insectos infectados, sin embargo, en

insectos control está presente desde el día 1 p.i. y en infectados se observa hasta el día 7 p.i. (Figura 1).

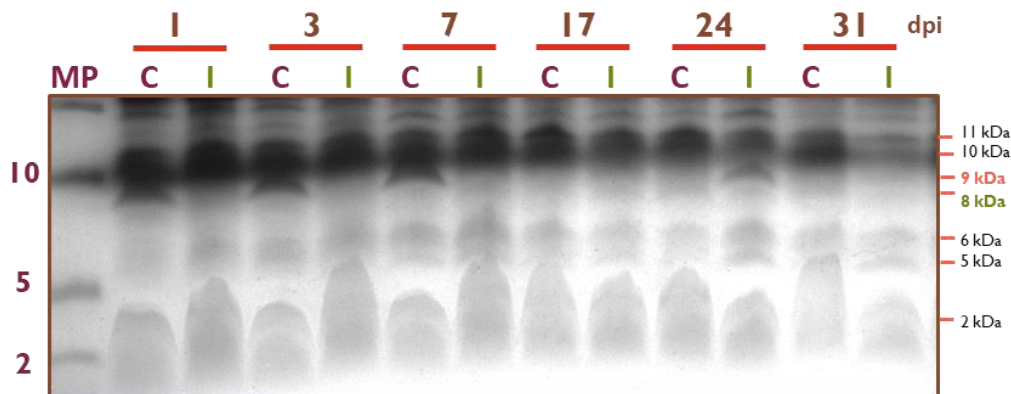


Figura 1. Infección oral de ninfas V estadio con *T. cruzi*. Se realizó una cinética post alimentación para la extracción de la hemolinfa, donde se tomaron días estratégicos (1, 3, 7, 17, 24 y 31) en el recorrido de *T. cruzi* por el tracto digestivo de los insectos. C= hemolinfa de insectos alimentados con ratones sanos, I= hemolinfa de insectos alimentados con ratones infectados con *T. cruzi* en su punto máximo de parasitemia. Gel de poliacrilamida 15% en buffer de Tricina, se cargaron 10 µg de proteína por carril.

Para la infección con *T. rangeli*, se utilizaron diferentes cantidades de parásitos (100,000, 500,000 y 1×10^6) ya que se desconoce la cantidad de parásitos letal para el insecto. En total se observan seis péptidos tanto en hemolinfa de insectos infectados como no infectados. La hemolinfa de los insectos inoculados con un millón de parásitos presentan dos péptidos muy abundantes: el de 11 kDa y el de 9 kDa. El péptido de ~9 kDa es el que tiene una expresión diferencial más evidente, ya que está ausente al día 1 p.i. en insectos inoculados con 100 y 500 mil parásitos y posteriormente se observa al día 7 p.i. en insectos inoculados con 100 mil parásitos, en la hemolinfa de los insectos inoculados con 500 mil se observa hasta el día 14 p.i. El péptido de 5 kDa no parece estar presente en insectos inoculados con 500 mil a los días 7 p.i. y 14 p.i., este péptido baja su intensidad en todos los casos al día 14 p.i. (Figura 2).

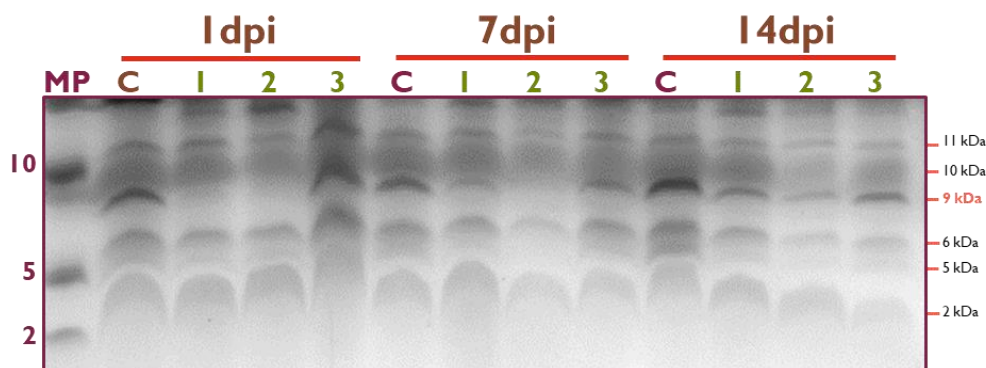


Figura 2. Infección intrahemocélica de ninfas V estadio con *T. rangeli*. Una vez realizada la infección intrahemocélica, se extrajo hemolinfa a diferentes días post infección (1, 7 y 14), de tal forma que el parásito completara su trayecto de tracto digestivo a glándulas salivales. C= insectos inoculados con solución salina, 1= hemolinfa de insectos inoculados con 100,000 parásitos, 2= hemolinfa de insectos inoculados con 500,000 parásitos y 3 = hemolinfa de insectos inoculados con 1×10^6 parásitos. Se cargaron 10 µg de proteína por carril.

La hemolinfa de insectos infectados con bacterias se analizó después de unas horas de la infección, ya que en la literatura se ha reportado que, ante la presencia de bacterias, la síntesis de

péptidos antimicrobianos se da a horas, de 2 a 6 hrs el perfil peptídico consta de 6 péptidos. Nuevamente un péptido de ~9 kDa presentó cambios en su expresión en todos los tiempos a los que se analizó la hemolinfa, los insectos inoculados con *L. inocua* lo expresan en muy bajas concentraciones a todos los tiempos, mientras que los infectados con *M. luteus* y *E. coli* lo expresan en mayor concentración. Al día uno post infección se observan dos nuevas bandas, una de ~8 kDa y otra de ~4 kDa en insectos infectados con *L. inocua* y con *M. luteus* (Figura 3).

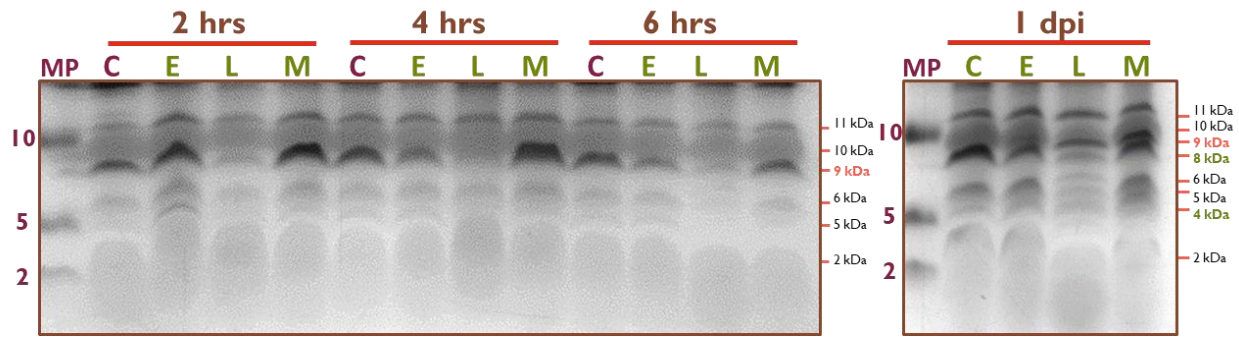


Figura 3. Infección intrahemocélica de ninfas V estadio con bacterias. **C**= insectos inoculados con solución salina, **E**= hemolinfa de insectos inoculados con *E. coli*, **L**= hemolinfa de insectos inoculados con *L. inocua* y **M**= hemolinfa de insectos inoculados con *M. luteus*. Se cargaron 10 µg de proteína por carril.

En general, el perfil peptídico (menor a 11 kDa) de *T. pallidipennis* está constituido por 8 péptidos, cuyos pesos moleculares van de 11 kDa a 2 kDa. De los 8 péptidos que se observaron, el de ~9 kDa parece tener un papel ante la presencia de organismos potencialmente patógenos, ya que fue el único que tuvo cambios tanto en expresión como en abundancia en todas las condiciones experimentales.

La hemolinfa es el fluido del sistema circulatorio que irriga la cavidad del hemocele, está constituida principalmente por agua, iones (por ejemplo: K^+ , Na^+ , Ca^+), lípidos, carbohidratos, aminoácidos libres, proteínas y péptidos (Punzo, 1900; Rocha, et al., 2016). Dentro de los péptidos presentes en la hemolinfa están los neuropéptidos, péptidos paralíticos y péptidos antimicrobianos (Skinner, et al., 1991). En nuestro análisis identificamos péptidos que no cambian, los cuales podrían tratarse de neuropéptidos, péptidos involucrados en el proceso de muda o péptidos paralíticos, estos últimos se han observado en Lepidópteros tras las inoculación de microorganismos en la hemolinfa (Ishii, et al., 2013).

CONCLUSIONES

La respuesta inmune de los vectores es un componente esencial para la relación vector-parásito, por ello el interés de estudiar una especie de Triatomino con importancia epidemiológica para México. En este trabajo, presentamos de forma preliminar el perfil peptídico de *T. pallidipennis* infectado con diferentes microorganismos, sin embargo, por el tipo de análisis no fue posible identificar la naturaleza de cada uno de los péptidos, por lo que se propone a futuro identificar los péptidos presentados aquí por espectrometría de masas y analizar su presencia a tiempos menores después de la infección en el caso de tripanosomátidos.

LITERATURA CITADA

Bulet, P., Hetru, C., Dimarcq, J-L. y Hoffman, D. 1999. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Dev Comp Immunol*, 23: 329-344.

- Ishii, K., Adachi, T., Hamamoto, H., Oonishi, T., Kamimura, M., Imamura, K. & Sekimizu, K. 2013. Insect cytokine paralytic peptide activates innate immunity via nitric oxide production in the silkworm *Bombyx mori*. *Dev Comp Immunol*, 39:147-153. Doi: 10.1016/j.dci.2012.10.014.
- Kollien, A. H. y Schaub, G.A. 2000. The development of *Trypanosoma cruzi* in triatominae. *Parasitol Today*, 16: 381-387.
- Espinoza, B., Martínez-Ibarra, J. I., Villalobos, G., De La Torre, P., Lacleste, J. P. y Martínez-Hernández, F. 2013. Genetic Variation of north American Triatomines (Insecta: Hemiptera: Reduviidae): Initial divergence between species and Populations of Chagas Disease Vector. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 88: 275–284. DOI: 10.4269/ajtmh.2012.12-0105.
- Mead, G. P., Ratcliffe, N. A. y Renwanz, L. R. 1986. The separation of insect hemocyte types of percoll gradients methodology and problems. *J Insect Physiol*, 32: 167-177. Doi: 10.1016/0022-1910(86)90137-X.
- Punzo, F. 1900. The hemolymph composition and neurochemistry of the spider wasp, *Pepsis formosa* (say) (Hymenoptera, Pompilidae). *Camp. Biochem. Physiol*, 2: 341-345. Doi: 10.1016/0300-9629(90)90702-T.
- Rocha, I. F., Maller, A., Garcia Simão, R., Kadowaki, M. K., Alves, L. F., Huergo, L. F. y Silva, L. 2016. Proteomic profile of hemolymph and detection of induced antimicrobial peptides in response to microbial challenge in *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Biochem Biophys Res Commun*, 473: 511-516. Doi: 10.1016/j.bbrc.2016.03.091.
- Skinner, W. S., Dennis, P. A., Li, J. P., Summerfelt, R. M., Carney, R. L. y Quistad, G. B. 1991. Isolation and identification of paralytic peptides from hemolymph of the Lepidopteran insects *Munduca sexta*, *Spodoptera exigua*, and *Heliothis virescens**. *J Biol Chem*, 266: 12873-12877.
- Schägger, H.G. y Von Jagow.1987. Tricine-Duodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis for separation of proteins in the range from 1-100 kDa. *Anal Biochem*, 166: 368 –379.
- Tsakas, S. y Marmaras, V. J. 2010. Insect immunity and its signaling: an overview. *Invertebrate Surviv J*, 7: 228-238.
- Vallejo, A. G., Suárez, Y., Olaya, L. J., Gutiérrez, A. S. & Carranza, J. C. 2015. *Trypanosoma rangeli*: un protozoo infectivo y no patógeno para el humano que contribuye al entendimiento de la transmisión vectorial y la infección por *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas. *Rev Acad Colomb, Cienc Exact Fis Nat*, 39: 111-122. Doi: 10.18257/raccefyn.143.
- Vieira, C. S., Waniek, P. J., Castro, D. P., Mattos, D. P., Moreira, O. C., and P Azambuja, P. 2016. Impact of *Trypanosoma cruzi* on antimicrobial peptide gene expression and activity in the fat body and midgut of *Rhodnius prolixus*. *Parasit Vectors*. 9:119. Doi: 10.1186/s13071-016-1398-4.
- Zhang, L.J. & Gallo, R. L. 2016. Antimicrobial peptides. *Curren Biology*, 11, R14-R19. Doi: 10.1016/j.cub.2015.11.017.