



## ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE TRES DEFENSINAS EN *Triatoma (Meccus) pallidipennis* (HEMIPTERA: REDUVIIDAE) BAJO DIFERENTES CONDICIONES

Paulina Díaz-Garrido, Cristina Bastida-Jaime, Rosa Cárdenas-Guerra, Ignacio  
Martínez-Martínez y Bertha Espinoza Gutiérrez

Aceptado: 11 de octubre 2021  
Publicado: 31 de diciembre 2022



# ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE TRES DEFENSINAS EN *Triatoma (Meccus) pallidipennis* (HEMIPTERA: REDUVIIDAE) BAJO DIFERENTES CONDICIONES

Paulina Díaz-Garrido, Cristina Bastida-Jaime, Rosa Cárdenas-Guerra, Ignacio Martínez-Martínez y Bertha Espinoza Gutiérrez✉

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

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

**RESUMEN.** Las defensinas son una de las principales moléculas efectoras de la respuesta inmunológica en los insectos. Con base en análisis filogenéticos, las defensinas de los triatominos (Hemiptera: Reduviidae), integran dos grupos: tipo 1 y tipo 4. Debido a la importancia médica de este grupo de hemípteros, en este trabajo se evaluó la expresión de 3 isoformas de defensinas en *Triatoma (Meccus) pallidipennis*, uno de los principales vectores de *Trypanosoma cruzi* (agente causal de la enfermedad de Chagas) en México. Los resultados indican que las dos defensinas tipo 1 (1.1 y 1.2) analizadas son más abundantes en estado basal con respecto a la defensina tipo 4 (4.6); sin embargo, la defensina tipo 4 es inducible, pues aumenta en insectos infectados con *T. cruzi* y con diferentes bacterias.

**Palabras clave:** Defensinas, *Triatoma pallidipennis*, Péptidos antimicrobianos.

## Expression analysis of three defensin genes in *Triatoma (Meccus) pallidipennis* (Hemiptera: Reduviidae) under different conditions

**ABSTRACT.** Defensins are one of the main effector molecules of the immune response in insects. Based on phylogenetic analysis, the defensins of the triatomines (Hemiptera: Reduviidae), integrate two groups: type 1 and type 4. Due to the medical importance of this group of hemipteran, in this work we evaluated the expression of 3 isoforms of defensins in *Triatoma (Meccus) pallidipennis*, one of the main vectors of *Trypanosoma cruzi* (causative agent of Chagas' disease) in México. The results indicate that the two type 1 defensins (1.1 and 1.2) analyzed are more abundant at baseline regarding the type 4 defensin (4.6); however, the type 4 defensin is inducible, since it increases in insects infected with *T. cruzi* and with different bacteria.

**Keywords:** Defensins, *Triatoma pallidipennis*, Antimicrobial peptides.

## INTRODUCCIÓN

Los insectos tienen mecanismos eficientes para el reconocimiento de organismos externos, además de estrategias defensivas contra microorganismos potencialmente patógenos; lo que resulta en un efectivo sistema inmune innato, compuesto por células (hemocitos y células epiteliales) y diversas moléculas efectoras (Lemaitre & Hoffmann, 2007). La respuesta inmune humoral se compone de cascadas enzimáticas y de la síntesis de moléculas efectoras tales como las Especies Reactivas de Oxígeno (EROs) y de Nitrógeno (ERNs), así como por Péptidos Antimicrobianos (PAMs).

La Enfermedad de Chagas, es causada por el protozoario *Trypanosoma cruzi*, Chagas 1909 y se transmite principalmente por insectos de la subfamilia Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). En México, se reportan cerca de 31 especies de triatominos, de las cuales 28 son endémicas y una de ellas es *Triatoma (Meccus) pallidipennis*, Stål 1872, uno de los principales vectores de *T. cruzi* en el país (Vidal-Acosta *et al.*, 2000; Martínez, *et al.*, 2006; Ramsey, *et al.*, 2015). En los triatominos sudamericanos, se reportan principalmente tres familias de PAMs: lisozimas, prolixicinas y defensinas (Araújo, *et al.*, 2008; Vieira, *et al.*, 2014:2016). Las defensinas son péptidos conformados por tres regiones: péptido señal, pro-péptido y péptido maduro, este último tiene actividad antimicrobiana y se libera al espacio extracelular (Michaelson, *et al.*, 1992). Una vez liberadas, las defensinas actúan contra un amplio espectro de microorganismos, principalmente bacterias de tipo

Gram +, aunque también tienen actividad contra otro tipo de bacterias, hongos y parásitos. En algunos triatomíneos se ha reportado la expresión diferencial de isoformas de defensinas en insectos alimentados con sangre que contiene *T. cruzi* a diferentes días post infección (Waniek, *et al.*, 2011; Vieira, *et al.*, 2016).

En *T. pallidipennis* se han reportado 12 genes de defensinas, cuya traducción a proteínas presenta alta variabilidad en la región del pro-péptido, mientras que en el péptido maduro codifican únicamente para tres defensinas diferentes (Díaz-Garrido, *et al.*, 2018). En esta especie, también se reportaron 8 transcritos de defensinas (Zumaya-Estrada, *et al.*, 2018); sin embargo, no se ha estudiado la expresión de estas moléculas, ni la función que tiene esta familia de péptidos antimicrobianos en *T. pallidipennis*. El objetivo de este trabajo fue estudiar la expresión génica de tres isoformas de defensinas en insectos adultos (hembras y machos) bajo diferentes retos inmunológicos: infección con *T. cruzi* y bacterias.

## MATERIALES Y MÉTODO

**Mantenimiento del insecto.** Los insectos se mantuvieron en la colonia del Laboratorio de Estudios sobre la Tripanosomiasis Americana, del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, bajo condiciones controladas de humedad (60±5%) y temperatura (25 - 28 °C). Se utilizaron hembras (n=3) y machos (n=3) adultos de *T. pallidipennis* de 15 días de edad, para determinar la expresión basal de las defensinas.

**Infección oral con *T. cruzi*.** Se utilizaron ninfas de quinto estadio (ninfas V) de *T. pallidipennis*, un grupo de insectos se alimentó con ratones infectados con *T. cruzi* (cepa Ninoa) en su punto máximo de parasitemia y otro grupo se alimentó con ratones sin infectar. De inicio se tuvieron 20 insectos por grupo, los cuales se pesaron antes y después de la alimentación; dependiendo de la cantidad de alimento ingerido, se separaron en 2 grupos: insectos que ingirieron más del doble de su peso e insectos que ingirieron menos del doble de su peso. Para este estudio, utilizamos a los insectos que consumieron más del doble de su peso de sangre, por lo que la n por punto experimental fue de n=3. Los insectos se sacrificaron a los días 1 y 7 post infección (pi).

**Infección intrahemocélica con bacterias.** Se utilizaron 4 grupos de insectos integrados por ninfas V (n=4). Un grupo se infectó con *Listeria innocua* (ex Seeliger & Schoofs 1979) Seeliger 1983, otro con *Escherichia coli* (Escherich, 1885) y otro con *Micrococcus luteus* (Schröter, 1872), las cuales se crecieron en medio líquido Luria Bertani (LB) a 37 °C por 18 hrs y 180 rpm. Posteriormente, se re-inoculó un cultivo fresco de medio LB con el cultivo crecido previamente y se dejó incubando hasta llegar a una densidad óptica de 1.2 a 600 nm. Una vez llegada a la D.O<sub>600</sub> deseada, el cultivo se centrifugó a 9000 × g por 5 min, y el paquete celular se re-suspendió en el mismo volumen inicial con amortiguador de fosfato salino (PBS) estéril. Como control se tuvo un grupo inoculado con PBS estéril. Cada insecto se inoculó con 7 µl de cada solución con ayuda de una aguja Hamilton. Los insectos se sacrificaron a las 4 h post infección.

**Extracción de órganos y ARN.** De cada insecto se extrajo el cuerpo graso, tracto digestivo y túbulos de Malpighi. La extracción de ARN se realizó utilizando el método de TRIZOL™ (Invitrogen) siguiendo las recomendaciones del fabricante. La concentración del ARN se cuantificó con un espectrofotómetro NanoDrop 1000, la pureza de las muestras se garantizó al obtener valores entre 1.8-2.0 en la relación de absorbancia 260/280.

**Producción de ADNc.** Se preparó un volumen final de 10  $\mu$ l, por cada  $\mu$ g de ARN total se adicionó 1  $\mu$ l de DNasa I (1 U/ $\mu$ l), 1  $\mu$ l de amortiguador DNasa 10x y agua tratada con 0.1% DEPC. La mezcla se incubó a temperatura ambiente por 15 min, se añadió 1  $\mu$ l de 0.25 mM EDTA y se incubó a 65 °C durante 10 min para inactivar la DNasa I. La síntesis de ADNc se realizó en 30  $\mu$ l de reacción que consistieron en 1  $\mu$ g de ARN, 1.25 mM de cada dNTP, 4.25  $\mu$ M de oligo dT, 40 U de inhibidor de ribonucleasas y 50 U transcriptasa reversa del virus Moloney de la leucemia murina. Se utilizó el termociclador PTC-100® Programmable Thermal Controller (MJ research Inc.) bajo las siguientes condiciones: un ciclo de 10 minutos a 25 °C, 30 minutos a 42 °C y 72 °C por 10 minutos para inactivar la transcriptasa. El ADNc se almacenó a -20 °C hasta su uso.

**Análisis de la expresión relativa de defensinas.** Se diseñaron oligonucleótidos con base a las secuencias reportadas en el genbank para *def1.1* (MH000324.1), *def1.2* (MH000325.1) y *def4.6* (MH000331.1) para amplificar solo la región del péptido maduro de *def1.1* (Fw 5'-ATGACGCCGTATGGGAACAA -3', Rv 5'-CTGCAATGGCACACAGTTCC -3'), *def1.2* (Fw: 5'-TGGGAACAACCAGCTGGTGAA - 3', Rv: 5'-CTGCAATGGCACACAGTTCC -3') y *def4.6* (Fw: 5'-AGCAGAATGGACTCAGCAACA -3', Rv: 5'-CCCTTACATTGGCCACCACG -3'). Se utilizó el kit KAPA SYBR FAST One-Step qRT-PCR (Kapa Biosystems). Las reacciones de PCR se llevaron a un volumen final de 9  $\mu$ l con 100 ng de ARN como templado, 1x Kapa Sybr, 1x RT Kapa, 0.2  $\mu$ M de cada oligonucleótido y agua estéril. Se utilizó el gen de *actina* como gen constitutivo para normalizar los datos. El programa de PCR consistió en un paso inicial para la retro transcripción (RT) de 10 min a 42 °C, seguido del paso para la activación de la ADN polimerasa de 5 min a 94 °C y 30 ciclos de amplificación: desnaturalización (25 segundos a 94 °C), alineamiento (25 segundos de Tm a 66 °C) y elongación (30 segundos a 72 °C). La amplificación de los genes se realizó en el quipo Rotor Gene 6000 (Corbett Research). La expresión relativa de los genes entre insectos infectados con respecto a insectos no infectados (controles) se realizó midiendo los cambios relativos del gen de interés (defensinas) con referencia al gen constitutivo (actina), mediante la fórmula  $\Delta\Delta C_t$  (Arroyo-Olarte, *et al.*, 2018). Posteriormente, se graficó la expresión con respecto al valor del grupo control.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La expresión basal de *def1.1*, *def1.2* y *def4.6* en hembras y machos de *T. pallidipennis* se obtuvo al analizar el ciclo de umbral de amplificación ( $C_t$ ). Un valor bajo indica una mayor expresión del gen, ya que comienza a amplificar en ciclos tempranos; y por el contrario, a mayor  $C_t$  indica menor expresión del gen. En ejemplares adultos, hembras y machos, de *T. pallidipennis* se obtuvieron defensinas tipo 1 (*def1.1* y *def1.2*) y tipo 4 (*def4.6*); sin diferencias estadísticas entre sexos y con expresión de ARNm cercano al doble en las defensinas tipo 1 respecto al tipo 4 (Figura 1).

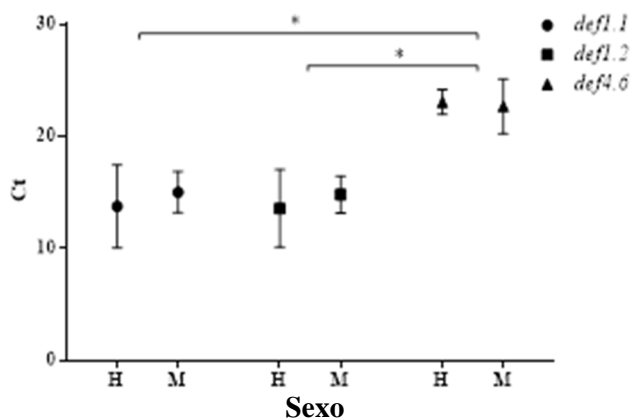


Figura 1. Análisis de los valores del ciclo de umbral ( $C_t$ ) de los genes de *def1.1*, *def1.2* y *def4.6* en el contenido abdominal de Hembras (n=6) y Machos (n=6) de *T. pallidipennis*. \* T-Student  $P < 0.05$

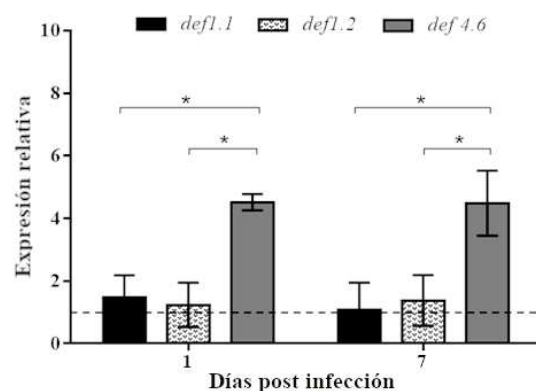
Las *def1.1* y *def1.2* comienzan a amplificarse en los Ct 13 y 15, mientras que la defensina tipo 4 tiene un Ct hasta el ciclo 23. El principal papel que desempeñan los péptidos antimicrobianos es inmunológico, aunque también participan en el control poblacional de la microbiota y durante el proceso de envejecimiento en los insectos (Hancock, *et al.*, 2006; Hanson & Lemaitre, 2018). Los resultados sugieren que estas tres defensinas son importantes para la homeostasis del insecto, por lo que será interesante hacer estos experimentos en órganos específicos y asociar funciones biológicas específicas para cada uno de estos genes.

Las ninfas V infectadas vía oral (cepa Ninoa de *T. cruzi*) no presentaron aumento en las defensinas tipo 1 con respecto al control (insectos no infectados) ni presentaron una expresión diferencial significativa entre ellas durante los periodos de evaluados (día 1 y día 7 post infección). Mientras que *def4.6* aumentó más de 4 veces con respecto al grupo control y se expresó poco más de tres veces con respecto a las dos defensinas tipo 1, en ambos días analizados (Figura 2).

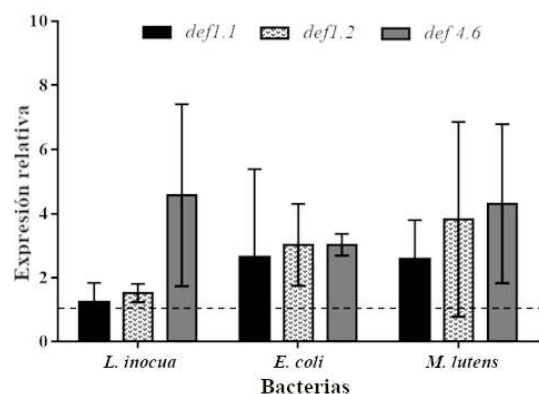
En *Rhodnius prolixus*, se ha reportado un aumento en la expresión de defensinas similares al tipo 4, cuando los insectos se encuentran en presencia de *T. cruzi* (Vieira, *et al.*, 2016). Por el contrario, en especies cercanas a *T. pallidipennis* como *T. brasiliensis*, se reportó un aumento en la expresión de defensinas tipo 1 cuando los insectos se encuentran infectados con el parásito (Waniek, *et al.*, 2011).

En triatominos, la expresión de defensinas asociada a la respuesta inmune contra *T. cruzi*, depende del fondo genético de las cepas del parásito (Vieira, *et al.*, 2016). En este trabajo se utilizó la cepa Ninoa, aislada de un paciente en el sureste del país (López-Olmos, *et al.*, 1998; Espinoza, *et al.*, 2010). Será interesante evaluar las *def1.1*, *def1.2* y *def4.6* en triatominos infectados con otras cepas del parásito, para investigar si el sistema inmune de *T. pallidipennis* ha co-evolucionado con ciertas cepas del parásito y por ello no se observó una expresión aumentada de las defensinas tipo 1.

En la prueba de expresión en condiciones de reto inmunológico (*E. coli*, *L. innocua* y *M. luteus*) se obtuvo que el gen *def4.6* aumentó su expresión con respecto a los insectos no infectados; mientras que las defensinas tipo 1 (*def1.1* y *def1.2*) aumentan sólo en las infecciones con *E. coli* y *M. luteus* (Figura 3).



**Figura 2. Expresión de *def1.1*, *def1.2* y *def4.6* en ninfas V infectadas con *T. cruzi*.** Infección con  $2 \times 10^6$  tripomastigotes sanguíneos y como grupo control se alimentaron 3 insectos con sangre de ratón sin infectar. \*Prueba estadística ANOVA de 2 vías y post prueba de Sidak  $P < 0.05$



**Figura 3. Expresión relativa de defensinas en ninfas V infectadas con diferentes bacterias.** Infección vía intrahemocélica ( $n=4$  ninfas por grupo), D.O.<sub>600</sub> de 1.2, grupo control con insectos inoculados con PBS estéril. Evaluación 4 h. post infección con RT-PCRq. Línea punteada corresponde al grupo control. Se presenta el resultado de dos experimentos independientes. Prueba estadística ANOVA de 2 vías y post prueba de Tukey.

Aunque se distingue una ligera tendencia en el aumento de *def4.6* en insectos infectados, con *L. innocua* y con *M. luteus*, no existieron diferencias estadísticas en la expresión de los genes ante la infección de las diferentes bacterias, y tampoco entre las tres isoformas de defensinas analizadas. En Dípteros como *Drosophila* y *Anopheles*, se ha descrito que la expresión y síntesis de PAMS se da en tiempos tempranos (López, et al., 2003; Lemaitre & Hoffman, 2007), por lo que se esperaba que la infección vía hemocele produciría una respuesta inmunológica exacerbada y rápida, por esa razón se decidió analizar la expresión a las 4 h post infección.

En futuras investigaciones será interesante identificar si la expresión y síntesis proteica de estas defensinas (*def1.1*, *def1.2* y *def4.6*) se da de forma localizada y particularmente, establecer cuál es el principal órgano que las sintetiza. Lo cual será determinante para confirmar si estas moléculas tienen un papel importante durante el control poblacional de *T. cruzi* en esta especie de triatmino. Además, será fundamental identificar el papel que tienen las defensinas tipo 1 a nivel fisiológico, pues en estado basal tienen una expresión significativa.

## CONCLUSIONES

En este trabajo inicial se reporta, de forma general, la expresión de mensajeros de diferentes defensinas en *T. pallidipennis*. Los resultados indican que existe una mayor expresión basal en aquellas de tipo 1, en adultos sin reto inmunológico; sin embargo, este tipo de defensinas no parece ser inducible cuando los insectos se infectan con diferentes retos. En contraste, la defensina tipo 4 se encuentra en concentraciones bajas en estado basal y aumentan más del doble cuando los insectos se infectan con *T. cruzi*.

## LITERATURA CITADA

- Araújo, C., Waniek P., Stock P., Mayer C., Jansen A. and Schaub, G. 2006. Sequence characterization and expression patterns of defensin and lysozyme encoding genes from the gut of the reduviid bug, *Triatoma brasiliensis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 36: 547–560. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2006.04.003>
- Arroyo-Olarte, R., Martínez I., Cruz-Rivera M., Mendlovic F. and Espinoza B. 2018. Complement system contributes to modulate the infectivity of susceptible TcI strains of *Trypanosoma cruzi*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 113: e170332. <https://doi.org/10.1590/0074-02760170332>
- Díaz-Garrido, P., Sepúlveda-Robles O., Martínez-Martínez I. and Espinoza B. 2018. Variability of defensin genes from a Mexican endemic Triatominae: *Triatoma (Meccus) pallidipennis* (Hemiptera: Reduviidae). *Bioscience Reports*, 38: BSR20180988. <https://doi.org/10.1042/BSR20180988>
- Espinoza, B., Rico T., Sosa S., Oaxaca E., Vizcaino-Castillo A., Caballero M. L. and Martínez I. 2010. Mexican *Trypanosoma cruzi* TC I strains with different degrees of virulence induce diverse humoral and cellular immune responses in a murine experimental infection model. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010: 890672. <https://doi.org/10.1155/2010/890672>
- Hancock, R., Brown K. and Mookherjee N. 2006. Host defense peptides from invertebrates – emerging antimicrobial strategies. *Immunobiology*, 211: 315-322. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2005.10.017>
- Hanson, M. and Lemaitre B. 2018. New insights on *Drosophila* antimicrobial peptide function in host defense and beyond. *Current Opinion in Immunology*, 62:22-30. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2019.11.008>

- Lemaitre B. and Hoffman, J. 2007. The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annual Review of Immunology*, 25: 697-743. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141615>
- López, L., Morales G., Ursic R., Wolff M. and Lowemberger C. 2003. Isolation and characterization of a novel insect defensin from *Rhodnius prolixus*, a vector of Chagas disease. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 33: 439-447. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(03\)00008-0](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(03)00008-0)
- López-Olmos, V., Pérez-Nasser M., Piñero D., Ortega E., Hernández R. and Espinoza B. 1998. Biological characterization and genetic diversity of Mexican isolates of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica*, 69: 239–254. [https://doi.org/10.1016/S0001-706X\(97\)00131-9](https://doi.org/10.1016/S0001-706X(97)00131-9)
- Martínez, F., Villalobos G., Cevallos A., Torre P., Laclette J., Alejandre-Aguilar R. and Espinoza B. 2006. Taxonomic study of the *Phyllosoma* complex and other triatomine (Insecta: Hemiptera: Reduviidae) species of epidemiological importance in the transmission of Chagas disease: Using ITS-2 and mtCytB sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 41: 279-287. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2006.05.002>
- Michaelson, D., Rayner J., Couto M. and Ganz T. 1992. Cationic defensins arise from charge-neutralized propeptides: a mechanism for avoiding leukocyte autotoxicity? *Journal of Leukocyte Biology*, 51: 634-639. <https://doi.org/10.1002/jlb.51.6.634>
- Ramsey, J. M., Peterson A. T., Carmona-Castro O., Moo-Llanes D. A., Nakazawa Y., Butrick M., Tun-Ku E., la Cruz-Félix K. and Ibarra-Cerdeña C. N. 2015. Atlas of Mexican Triatominae (Reduviidae: Hemiptera) and vector transmission of Chagas disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 110: 339-352. <https://doi.org/10.1590/0074-02760140404>
- Vidal-Acosta, V., Ibáñez-Bernal S. y Martínez-Campos C. 2000. Infección natural de chinches con *Trypanosoma cruzi* asociadas a la vivienda humana en México. *Salud Publica de México*, 2: 496- 503.
- Vieira, C., Waniek, P., Mattos D., Castro D., Mello C., Ratcliffe N., Garcia E. and Azambuja P. 2014. Humoral responses in *Rhodnius prolixus*: bacterial feeding induces differential patterns of antibacterial activity and enhances mRNA levels of antimicrobial peptides in the midgut. *Parasit Vectors*, 7: 232. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-232>
- Vieira, C., Waniek P., Castro D., Mattos D., Moreira O. and 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. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1398-4>
- Waniek, P., Jansen A. and Araújo C. 2011. *Trypanosoma cruzi* infection modulates the expression of *Triatoma brasiliensis* def1 in the midgut. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 11: 845-847. <https://doi.org/10.1089/vbz.2010.0020>
- Zumaya-Estrada, F., Martínez-Barnette J., Lavore, A., Rivera-Pomar R. and Rodríguez M. H. 2018. Comparative genomics analysis of Triatomines reveals common first line and inducible immunity-related genes and the absence of Imd canonical components among hemimetabolous arthropods. *Parasit Vectors*, 11: 48. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2561-2>