



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**ESTUDIO GENÉTICO Y BIOLÓGICO DE DEFENSINAS EN *Triatoma*
*(Meccus) pallidipennis***

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:
EVA PAULINA DÍAZ GARRIDO

DIRECTOR DE TESIS

DRA. BERTHA JOSEFINA ESPINOZA GUTIÉRREZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

COMITÉ TUTOR

DR. HUMBERTO LANZ MENDOZA
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA
DR. JULIO CÉSAR CARRERO SÁNCHEZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

CIUDAD DE MÉXICO, OCTUBRE DE 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis de Doctorado se realizó bajo la dirección de la Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez, en el laboratorio sobre la Tripanosomiasis Americana, del Departamento de Inmunología en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo conformado por:

Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Dr. Humberto Lanz Mendoza Instituto de Salud Pública.

Dr. Julio César Carrero Sánchez Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Se agradece al M. en C. Ignacio Martínez por su apoyo técnico en el manejo y mantenimiento de ratones infectados con *Trypanosoma cruzi*, así como en el cultivo *in vitro* de tripanosomátidos (*T. cruzi*, *Trypanosoma rangeli*, *Leishmania mexicana* y *Leishmania major*) usados en este trabajo.

Se agradece la valiosa colaboración de la Dra. Rosa Cárdenas-Guerra por su asesoría y apoyo en el proyecto, particularmente en las técnicas de producción y purificación del péptido recombinante.

Se reconoce la colaboración del Dr. Sebastián Poggio por su enseñanza y asesoría dada en las técnicas de biología molecular, particularmente en la clonación y expresión de rDef1.3.

Se reconoce la colaboración del Dr. Omar Sepúlveda-Robles en los experimentos realizados para la caracterización de los genes que codifican para defensinas en *T. pallidipennis*.

Se agradece a la Biól. Cristina Bastida por su valioso apoyo en la elaboración de los RT-PCR cuantitativos para el análisis de la expresión de defensinas.

A la Dra. Karla Rodríguez-Hernández por su apoyo en los ensayos de citometría de flujo.

Al M. en C. Lucio Rivera por su asesoría en los análisis estadísticos.

El jurado del examen estuvo constituido por:

Presidente: Dr. Juan Pedro Lacleste San Román

Secretario: Dra. Bertha Josefina Espinoza Gutiérrez

Vocal: Dr. Santiago Martínez Calvillo

Vocal: Dr. Gerardo Alfonso Corzo Burquette

Vocal: Dra. Ana María Cevallos Gaos

En memoria de Pablo Diache

1952-2019

“Hasta la victoria siempre”

ÍNDICE

Resumen.	1
Abstract.	2
I. Introducción.	3
I.1 Generalidades de la enfermedad de Chagas.	3
I.2 Generalidades del agente causal de la enfermedad.	4
I.3 Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i>	5
I.4 Generalidades de los insectos triatominos.	7
I.5 Ciclo de vida de insectos Triatominos.	9
I.6 Interacción <i>T. cruzi</i> – Triatomo.	10
I.7 Sistema inmunológico en insectos.	12
I.7.1 Péptidos Antimicrobianos (PAMs) de insectos.	14
I.7.1.1 Defensinas.	17
II. Antecedentes.	19
III. Justificación.	20
IV. Hipótesis.	21
V. Objetivos.	21
VI. Materiales y Métodos.	22
VI.1. Mantenimiento de <i>T. pallidipennis</i>	22
VI.2. Cultivo de <i>T. cruzi</i> y tripanosomátidos.	22
VI.3. Infecciones de <i>T. pallidipennis</i>	22
VI.4. Disección de insectos para extraer órganos de <i>T. pallidipennis</i>	23
VI.5. Extracción de ácidos nucleicos y obtención de ADN complementario (DNAC) de órganos de <i>T. pallidipennis</i>	24
VI.6. Caracterización de genes que codifican para defensinas en <i>T. pallidipennis</i>	25
VI.7. Expresión de genes de defensinas en <i>T. pallidipennis</i>	27
VI.8. Generación de la defensina recombinante tipo 1 (rDef1.3)	28
VI.9. Evaluación de la actividad de rDef1.3 sobre bacterias y tripanosomátidos.	32
VI.10. Análisis Estadístico.	34
VII. Resultados.	35
VII.1. Caracterización de genes que codifican para defensinas en <i>T. pallidipennis</i>	35
VII.2. Análisis de la expresión de defensinas en <i>T. pallidipennis</i>	41
VII.3. Generación de una recombinante de defensina tipo 1.	44
VII.4. Evaluación de la actividad de rDef1.3 sobre bacterias y <i>T. cruzi</i>	50
VII.5. Evaluación de la actividad de rDef1.3 contra otros tripanosomátidos.	54
VIII. Discusión.	58
IX. Conclusiones.	68
X. Perspectivas.	69
XI. Referencias.	70
XII. Apéndices.	82
XIII. Producción científica.	88

RESUMEN

Las defensinas son una familia de péptidos antimicrobianos que forman parte de la respuesta inmunológica de los insectos. En la subfamilia Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) se han identificado genes que codifican para estas moléculas, sin embargo, la mayoría de la información existente corresponde a especies sudamericanas que no se encuentran en México. Este es uno de los primeros trabajos enfocado al estudio de péptidos antimicrobianos presentes en *Triatoma pallidipennis*, especie endémica de México y reportada como uno de los principales vectores del parásito protozoario *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la Enfermedad de Chagas, en el país. Debido a que aún no existen ni vacunas ni fármacos completamente efectivos contra el parásito, la Enfermedad de Chagas sigue siendo un grave problema de salud pública en nuestro país. El objetivo del presente trabajo fue hacer un estudio de las defensinas presentes en *T. pallidipennis*, para lo cual se caracterizaron genes codificantes para defensinas, se analizó la expresión del ARN mensajero de algunos genes de defensinas bajo diferentes condiciones y se evaluó la actividad biológica de una defensina recombinante.

A partir del ADN extraído de *T. pallidipennis*, se identificaron 12 genes que codifican para defensinas y la principal diferencia entre las secuencias de los genes se observó en los intrones. El análisis de las secuencias codificadoras de defensinas se realizó por medio de análisis bioinformáticos para determinar las regiones características de los precursores de defensinas: péptido señal, propéptido y péptido maduro. El péptido señal fue la región más conservada entre las secuencias y el propéptido fue la región más variable, a nivel de péptido maduro solo se identificaron tres diferentes, los cuales al hacer análisis filogenéticos y alineamientos con otras secuencias de triatominos sudamericanos, se determinó que dos son defensinas tipo 1 (TpDef1.1 y TpDef1.2) y una tipo 4 (TpDef4). Una vez identificados los genes codificantes para defensinas, se analizó la expresión de tres ARN mensajeros (*def1.1*, *def1.2* y *def4.6*) bajo diferentes condiciones biológicas. Nuestros resultados muestran que las dos defensinas tipo 1 tienen una expresión basal alta comparada con la defensina tipo 4, mientras que ésta muestra un aumento en su expresión cuando el insecto se encuentra bajo diferentes retos inmunológicos. Estos resultados sugieren que *def4.6* tiene un papel en la respuesta inmune de *T. pallidipennis*, mientras que *def1.1* y *def1.2* probablemente participan en otros procesos como el desarrollo o metabolismo del insecto.

Finalmente, se generó la proteína recombinante de una defensina tipo 1 (rDef1.3) y se probaron diferentes concentraciones *in vitro* sobre los tripanosomátidos *T. cruzi*, *T. rangeli* (patógeno de insectos triatominos) y dos especies de *Leishmania* (agentes causales de la Leishmaniasis cutánea): *Leishmania major* y *Leishmania mexicana*; así como contra las bacterias *Escherichia coli* y *Micrococcus luteus*, sin embargo no se observó actividad bactericida. *L. major* fue el parásito que mostró mayor daño a nivel morfológico, pues los ensayos de viabilidad mostraron que más del 50 % de los parásitos estaban muertos o con membrana dañada, mientras que *T. cruzi* fue el menos dañado, ambos parásitos no lograron recuperarse después del tratamiento con la rDef1.3. Estos resultados sugieren que la defensina recombinante tiene mayor efecto sobre los tripanosomátidos que *T. pallidipennis* no transmite.

ABSTRACT

Defensins are a family of antimicrobial peptides that are part of the insects immune response. Genes encoding these molecules have been identified in the vectors of the subfamily Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), however, most of the existing information corresponds to South American species that are not found in Mexico. This work focused on the study of antimicrobial peptides present in *Triatoma pallidipennis*, an endemic species from Mexico and one of the main vectors of *Trypanosoma cruzi*, the protozoa parasite causative agent of Chagas disease, in the country. Because there are still no fully effective vaccines or drugs against *T. cruzi*, Chagas disease continues to be a serious public health problem in our country. In this work, genes coding for defensins were characterized, the expression of the messenger RNA of some defensins genes was analyzed under different conditions, and the biological activity of a recombinant defensin was evaluated.

From genomic DNA, 12 genes that code for defensins were identified, the main difference between genes was observed in the introns. When making the protein translation, the characteristic regions of a defensin precursor were determined: signal peptide, pro-peptide and mature peptide. The signal peptide was the most conserved region in the sequences and interestingly, the pro-peptide was the most variable region. Only three different mature peptides were identified and by phylogenetic analysis and alignments with other South American triatomine sequences, the three mature peptides were characterized as two type 1 defensins (TpDef1.1, TpDef1.2) and one type 4 (TpDef4).

Once the genes coding for defensins were identified, the expression of three messengers RNA (*def1.1*, *def1.2* and *def4.6*) was analyzed under different conditions. Our results show that the two type 1 defensin have a high basal expression compared to the type 4 defensin, while this shows an increase in its expression when the insect was under different immunological challenges. These results suggest that *def4.6* has a direct activity in the immune response of *T. pallidipennis*, while *def1.1* and *def1.2* probably participate in other functions as the development or the metabolism of the insect.

Finally, a recombinant type 1 defensin (rDef1.3) was generated and was challenged against the trypanosomatids *T. cruzi*, *T. rangeli* (triatomine insect pathogen) and two species that cause cutaneous Leishmaniasis, *Leishmania major* and *Leishmania mexicana*, as well as against the bacteria *Escherichia coli* and *Micrococcus luteus*, however no bactericidal activity was observed. *L. major* was the parasite most affected by the recombinant defensin, since when evaluating the viability more than 50 % of the parasites were dead or with a compromised membrane. *T. cruzi* presented the least damage at morphological and viability level, also both parasites did not show recovery after treatment. These results suggest that rDef1.3 has a greater antimicrobial effect against trypanosomatids that are not naturally transmitted by *T. pallidipennis*.

I. INTRODUCCIÓN

Las Enfermedades Transmitidas por Artrópodos (ETAs) han sido durante miles de años una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en los seres humanos, estas enfermedades son causadas por virus, bacterias o parásitos, los cuales son transmitidos de vertebrados hospederos infectados a otros por medio de artrópodos hematófagos (mosquitos, garrapatas, chinches, piojos, moscas) (Martina, et al., 2017). Los insectos son los principales vectores de algunas de las enfermedades infecciosas más devastadoras a nivel mundial. Los mosquitos son los vectores con mayor importancia médica para los humanos, enfermedades tales como la malaria y el dengue (ambas transmitidas por mosquitos) tienen como vectores a insectos pertenecientes al género *Anopheles* y *Aedes* respectivamente. Asimismo, la Tripanosomiasis Americana (Enfermedad de Chagas), transmitida por insectos pertenecientes a la subfamilia Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) o la Leishmaniasis transmitida por dípteros de las familias Psychodidae y Phlebotomus, son enfermedades muy importantes. Hoy en día, todas ellas generan un gran impacto económico y representan un grave problema de salud a nivel mundial (Colwell, et al., 2011; Elston, et al., 2004; Vinaouger, et al., 2017).

I.1 Generalidades de la enfermedad de Chagas

La Enfermedad de Chagas (ECh) o Tripanosomiasis Americana es una zoonosis parasitaria transmitida por insectos vectores que tiene por agente causal al protozoario *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Esta enfermedad fue descrita por primera vez en 1909 por el brasileño Carlos Chagas (WHO, 2018) y se presenta mayormente en el continente americano (Rassi, et al., 2010). La Organización Mundial de la Salud (OMS) agrupa a esta enfermedad dentro de las 20 enfermedades tropicales desatendidas y se estima que a nivel mundial alrededor de 6 - 7 millones de personas se encuentran infectadas con *T. cruzi*, principalmente en Latinoamérica y 20 % de la población latinoamericana se considera en riesgo de adquirir la infección sobre todo en las zonas endémicas de 21 países (WHO, 2018).

Esta enfermedad es la segunda enfermedad transmitida por vectores más propagada en América Latina y se ubica a nivel mundial como la cuarta enfermedad parasitaria de mayor importancia según el Banco Mundial/PNUD/OMS (World Bank, 1993; WHO, 2018).

En México es la enfermedad parasitaria más importante, basado en prevalencia, morbilidad y mortalidad. Aunque se desconoce una cantidad exacta del número de personas infectadas, se estima que entre 1.5 y 2 millones de personas se encuentran infectadas con *T. cruzi* y de acuerdo con bancos de sangre se ha reportado que de 1 - 1.5 % de la sangre proveniente de donadores se encuentra contaminada (Hotez, et al, 2012; Ramsey

et al., 2015). Más recientemente, el meta análisis realizado por Arnal y colaboradores en 2019, sugiere que la seroprevalencia de *T. cruzi* es mayor, llegando al 3.38 % correspondiente a 4.06 millones de casos en el país.

Del total de personas infectadas a nivel mundial, se estima que el 85 – 96 % adquirieron al parásito por vía vectorial (Dias, 2002), la cifra restante contrajo al parásito por diferentes vías de transmisión como: transfusión sanguínea, donación de órganos, vía congénita, accidentes de laboratorio o por medio de la ingesta de alimentos contaminados (Muñoz, et al., 1992; Torrico, et al., 2004; Rassi, et al., 2010; Pereira, et al., 2009). La migración representa un factor determinante para la propagación de la infección por medio de donación de órganos y transfusión sanguínea.

Durante la enfermedad, se presentan dos fases: la aguda y la crónica. La fase aguda se caracteriza por la presencia del parásito en circulación sanguínea y por una sintomatología variable, pudiendo presentarse fiebre, vómito, anorexia, diarrea y hepatomegalia. Aproximadamente un 50 % de las personas que han sido picadas por los insectos vectores, presentan lesiones cutáneas tales como inflamación local presente justo donde el insecto introdujo su probóscide (Chagoma) o hinchazón de los párpados de un ojo (signo de Romaña), cuando la inoculación del parásito se dio vía mucosa conjuntival (Rassi, et al., 2010).

La fase crónica, comienza de 2 a 3 meses después de haber iniciado la infección y se divide a su vez en dos etapas: Fase crónica asintomática y crónica sintomática. La fase asintomática es el momento de la infección en donde los pacientes tienen serología positiva para *T. cruzi*, pero carecen de síntomas clínicos, ya que el número de parásitos en circulación es reducido y no se puede detectar con facilidad al parásito. Mientras que, durante la fase crónica sintomática, el parásito permanece oculto principalmente en corazón y músculos del tracto digestivo, esta fase se caracteriza por una disfunción de los tejidos de los órganos afectados, debido a una hipertrofia de las capas musculares, así como fibrosis, que trae como consecuencia un engrosamiento de la pared de los órganos (Rassi, et al., 2010). Más de un 30 % de los pacientes sufren desórdenes cardíacos y aproximadamente un 10 % desórdenes digestivos (generalmente agrandamiento del esófago o colón), neurológicos o una combinación de ambos.

I.2 Generalidades del agente causal de la enfermedad

T. cruzi es un protozoo flagelado perteneciente al orden de los Kinetoplastidos, familia Trypanosomatidae. Una de las principales características del orden de los Kinetoplastidos es la presencia de DNA extranuclear localizado en una región conocida como cinetoplasto. *T. cruzi* posee solo una mitocondria, con un genoma condensado en una estructura semejante a una gran red formada topológicamente por minicírculos y maxicírculos, dando como resultado al DNA del cinetoplasto (Schamber- Reis, et al., 2012). Este parásito posee un ciclo de vida complejo, con al menos tres estadios morfológicos diferentes entre el insecto vector y el hospedero mamífero: amastigote, epimastigote y tripomastigote (Fig. 1). La diferencia morfológica del

parásito en sus diferentes estadios de desarrollo refiere a la posición del cinetoplasto con respecto al núcleo y a la presencia o ausencia del flagelo (De Souza, et al., 2000).

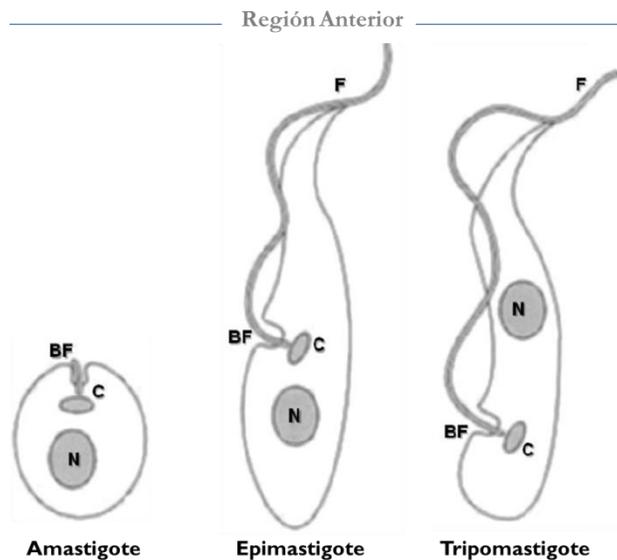


Figura 1. Diferentes formas morfológicas de *Trypanosoma cruzi* (amastigote, epimastigote y tripomastigote) y localización característica de algunas estructuras en el parásito: N (núcleo), C (cinetoplasto), F (flagelo) y BF (bolsa flagelar). Imagen modificada de la Tesis de Doctorado de Pérez-Morales, 2013.

Los amastigotes son la forma replicativa en el hospedero vertebrado, aquí el cinetoplasto se encuentra muy cerca del núcleo, en la región media de la célula, es la forma intracelular, prácticamente es inmóvil ya que carece de flagelo y membrana ondulante, tiene alta capacidad de replicación por división binaria dentro del citoplasma de células de diferentes tejidos como: corazón, músculo, hígado y bazo. El epimastigote por su parte, tiene capacidad replicativa pero no infectiva, el núcleo se encuentra en el centro de la célula y el cinetoplasto se localiza en la parte anterior al núcleo, es el estadio que se encuentra en el intestino del vector. Por último, los tripomastigotes tienen un cinetoplasto voluminoso posterior al núcleo, este estadio se puede localizar en la sangre de hospederos mamíferos (tripomastigotes sanguíneos) y en las heces de los insectos triatomínicos (tripomastigote metacíclico) siendo este el estadio infectivo para el mamífero (Almeida-de-Faria, et al., 1999; Carrada-Bravo, 2004; de Souza et al., 2010).

T. cruzi es un parásito con población heterogénea; debido a su diversidad biológica, genética y bioquímica durante mucho tiempo se hicieron esfuerzos para caracterizar la estructura poblacional con el objetivo de agrupar los diferentes subgrupos de este parásito. Por medio de genotificación de multilocus actualmente se ha agrupado en seis principales unidades discretas de tipificación (DTUs, Discrete Typing Units) denominadas TcI a TcVI, las cuales se definen como conjuntos de poblaciones genéticamente más relacionadas entre sí que a cualquier otra población y que son identificables por marcadores genéticos, moleculares o inmunológicos (Zingales et al., 2009).

I.3 Ciclo de vida de *T. cruzi*

La distribución geográfica de triatominos y hospederos vertebrados asociados con insectos hematófagos y su preferencia por ingerir fuentes de sangre específicas ha dado como resultado que *T. cruzi* tenga dos ciclos de transmisión: el ciclo selvático el cual involucra diferentes triatominos y animales silvestres como por ejemplo didélfidos, murciélagos y armadillos; y por otro lado, el ciclo doméstico/peridoméstico donde animales domésticos (perros, gatos, vacas, etc.) y humanos están involucrados (Manoel-Caetano & Silva, 2007).

El ciclo de vida de *T. cruzi* comienza cuando el insecto vector infectado defeca en la cercanía de su picadura y el parásito entra al hospedero mamífero (Fig. 2). Las heces contienen los estadios infectivos (tripomastigotes metacíclicos), los cuales son internalizados al rascarse o a través de las membranas mucosas, para luego infectar células cercanas. Una vez adentro de las células, el tripomastigote metacíclico se diferenciará a amastigote y se replicará en el citoplasma de las células. Después de varias rondas de replicación, se diferenciará en tripomastigotes sanguíneos, los cuales tendrán acceso al torrente sanguíneo y eventualmente infectaran nuevas células, para así perpetuar la infección. Posteriormente, al llegar un insecto de la subfamilia Triatominae a alimentarse de sangre que contenga tripomastigotes sanguíneos, éstos serán ingeridos por el vector, después de algunos días en el estómago del insecto (parte anterior del intestino medio), la mayoría de los tripomastigotes sanguíneos se transformarán a epimastigotes. Principalmente en la parte posterior del intestino medio, los epimastigotes se dividirán por división binaria y se adherirán a la membrana perimicrovellosa, la cual es secretada por las células del epitelio intestinal de la región posterior (De Souza, et al., 2010). Finalmente, en la región que corresponde al recto, una cantidad de epimastigotes se adherirán a la cutícula rectal y se transformarán en tripomastigotes metacíclicos (estadio infectivo para el mamífero hospedero), los cuales serán excretados en las heces (Rassi, et al., 2012).

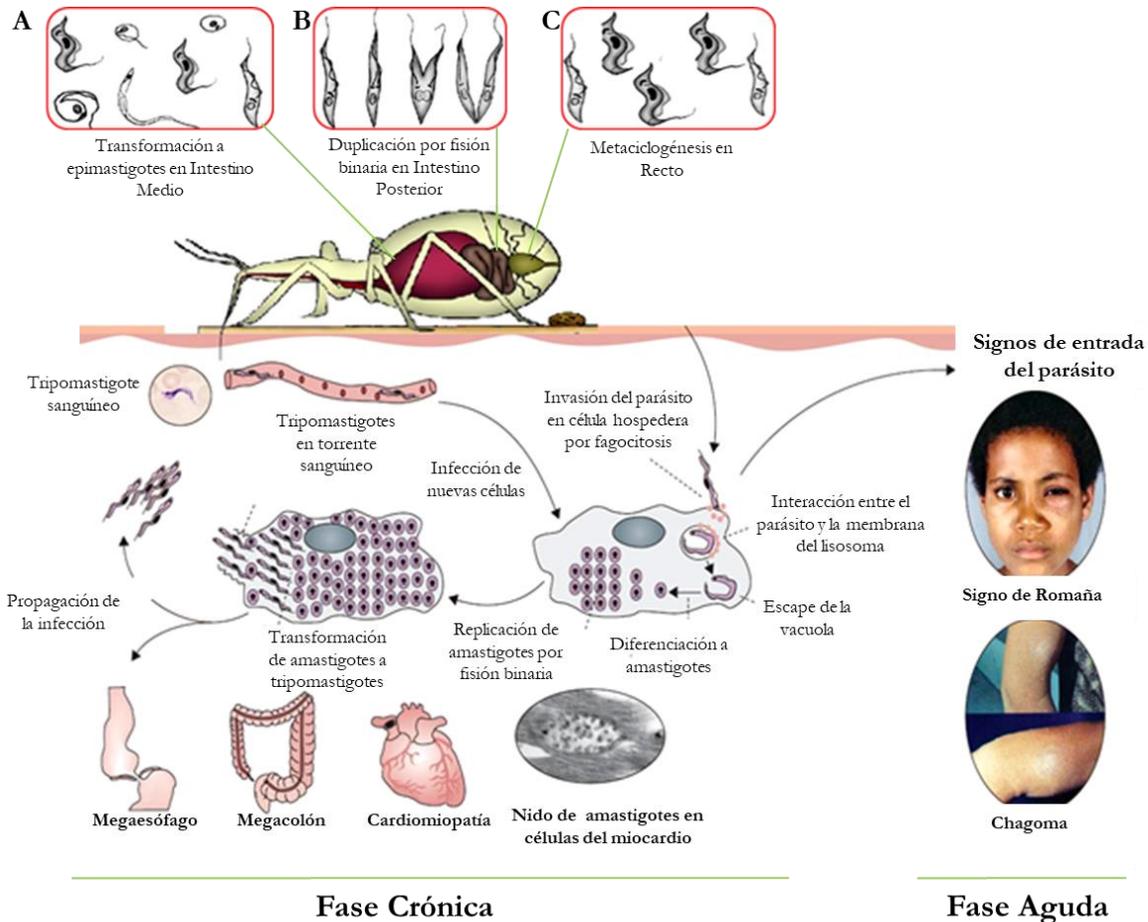


Figura 2. El ciclo de vida de *T. cruzi* se desarrolla en un hospedero vertebrado y un vector artrópodo. El ciclo comienza cuando el insecto triatomino no infectado se alimenta de un mamífero infectado con *T. cruzi*, ingiriendo tripomastigotes presentes en el torrente sanguíneo, éstos pasarán al trato digestivo del insecto (A) donde en el intestino medio se transformarán a epimastigotes (B). Posteriormente, los epimastigotes comenzarán a duplicarse por fisión binaria en el intestino posterior y finalmente llegarán al recto, donde sufrirán metaciclogénesis y saldrán en las heces, siendo éste el estadio infeccioso de *T. cruzi* (C). Los tripomastigotes metacíclicos son el estadio que pueden infectar cualquier tipo de célula nucleada del vertebrado y convertirse en amastigotes, estadio replicativo que terminará por lisar la célula. Algunos amastigotes infectarán células contiguas y otros se transformarán a tripomastigotes sanguíneos. El principal órgano que se daña es el corazón, causando arritmias ventriculares, trombosis y/o aneurisma apical; aunque también se pueden dañar otros órganos como: tracto digestivo Megaesófago, megacolón y bazo. Modificada de García, et al., 2007; Rassi, et al., 2010 y Rassi, et al., 2012.

I.4 Generalidades de los insectos triatominos

Los triatominos, llamados “chinchas verdaderas” son los vectores de *T. cruzi* y pertenecen al orden Hemiptera, el cual se caracteriza por poseer un aparato bucal de tipo succionador, familia Reduviidae y subfamilia Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), la única hematófaga en ese grupo (Dujardín, et al., 2002). Formalmente se han clasificado 140 especies dentro de 5 tribus y 15 géneros (Tabla 1), todas potenciales vectores de *T. cruzi*,

aunque con diferente grado de importancia epidemiológica tomando en cuenta su capacidad vectorial, distribución geográfica, tendencias antropofílicas y hábitos para establecerse en los domicilios (Schofield & Galvão, 2009).

Tabla 1. Clasificación de triatominos.

Tribu	Género	Número de especies
Alberproseniini	<i>Alberprosenia</i>	2
Balboderini	<i>Belminus</i>	8
	<i>Balbodera</i>	1
	<i>Microtriatoma</i>	2
	<i>Parabelminus</i>	2
Cavernicolini	<i>Cavernicola</i>	2
Rhodniini	<i>Psammolestes</i>	3
	<i>Rhodnius</i>	16
Triatomini	<i>Dipetalogaster</i>	1
	<i>Eratyrus</i>	2
	<i>Hermanlenticia</i>	1
	<i>Linsbcosteus</i>	6
	<i>Panstrongylus</i>	13
	<i>Paratriatoma</i>	1
	<i>Triatoma</i>	80

Modificado de Schofield & Galvão, 2009.

La clasificación de los triatominos está basada principalmente en sus características morfológicas. Las especies del género *Triatoma* se agrupan en 9 complejos, uno de ellos es el complejo *Phyllosoma* (Fig. 3), el cual es el más distribuido en México (Martínez, et al., 2006). Las especies del complejo *Phyllosoma* han sido revalidadas como género *Meccus*, ya que dentro de sus características externas poseen testículos diferentes tanto en tamaño como en forma a los de otros miembros de la subfamilia Triatominae, así como diferencias genéticas (Carcavallo, et al., 2000). Las especies de este complejo responsables de la mayoría de las transmisiones de *T. cruzi* en México son: *Triatoma (Meccus) pallidipennis*, *Triatoma (Meccus) longipennis*, *Triatoma (Meccus) bassolsae*, *Triatoma (Meccus) phyllosoma*, *Triatoma (Meccus) mazgottii* y *Triatoma (Meccus) picturata* (Martínez, et al., 2006; Martínez-Ibarra et al., 2014).

En México se han reportado alrededor de 31 especies de subfamilia Triatominae, las cuales han sido distribuidas en 7 géneros: *Dipetalogaster*, *Eratyrus*, *Paratriatoma*, *Panstrongylus*, *Belminus*, *Triatoma* y *Rhodnius*. Es importante mencionar que 28 de estas especies son endémicas y 23 han sido reportadas por estar infectadas de manera natural con *T. cruzi* (Vidal-Acosta et al., 2000; Martínez, et al., 2006). Entre las especies endémicas del país, como ya se mencionó, se encuentran las pertenecientes al complejo *Phyllosoma*, el cual está distribuido desde el centro hasta el sur del país. Debido al alto porcentaje de infección natural con el parásito, este complejo es de importancia epidemiológica para el país (Martínez-Hernández, et.al., 2010).

T. pallidipennis es una especie endémica de México, se ha reportado en 13 estados de la República Mexicana (Martínez-Ibarra, et al., 2008) y se le atribuye índices de infección natural con *T. cruzi* de 90 % en algunos estados, como Morelos (Cortes-Jimenez, et al., 1996).



Figura 3. Distribución del complejo Phyllosoma en México. En rojo se marca la presencia de *T. pallidipennis*. Modificada de Martínez-Ibarra, et al., 2008.

I.5 Ciclo de vida de los insectos Triatominos

Los triatominos presentan un desarrollo hemimetábolo, conocido como metamorfosis incompleta o simple; en este tipo de desarrollo, después de la eclosión del huevo, los insectos pasan por 5 estadios ninfales antes de llegar al estado adulto o imago (Fig. 4). Las ninfas difieren de los adultos por el tamaño y por poseer un desarrollo incompleto tanto de alas como de aparato reproductor. El desarrollo completo del insecto puede durar de 6 meses a un año, dependiendo de la especie, de los factores abióticos y del suministro de alimento que tengan. Las hembras pueden poner de 100 a 600 huevos a lo largo de sus vidas en la mayoría de las especies. Estos insectos son hematófagos en todos los estadios del ciclo de vida. En cada uno de los estadios, los insectos requieren una ingesta de alimento de alrededor de 6 - 12 veces su propio peso corporal (aunque en ocasiones es menor), la alimentación activa receptores de hormonas (ecdisona) que dan como resultado el desarrollo de una nueva cutícula (ecdisis) para dar origen a la muda del siguiente estadio ninfal o adulto (Noireau, et al., 2009; Schaub, 2009).



Figura 4. Ciclo de vida de *Triatoma pallidipennis*. Consta de 5 estadios ninfales después de la eclosión del huevo, para finalmente llegar al estado adulto. Las hembras se logran diferenciar de los machos, por tener el extremo final del tórax en forma de “v”. Tomado de la Tesis de Doctorado de Martínez-Hernández, 2008.

I.6 Interacción *T. cruzi*– Triatomino

La asociación entre *T. cruzi* y los triatominos es probablemente el resultado de un proceso coevolutivo, el cual está mediado por factores intrínsecos del vector y del parásito (Texeira, et al., 2009). Una vez que los insectos ingieren sangre infectada con *T. cruzi*, éste se establecerá, multiplicará y diferenciará a lo largo del tracto digestivo, por lo que el alojamiento del parásito queda limitado por las barreras físicas propias del insecto, como lo es el tejido epitelial del intestino.

Dentro de los factores intrínsecos del vector, los componentes y enzimas digestivas del tracto digestivo influyen tanto en la infección, como en el establecimiento y la replicación del parásito (García, et al., 2010). Un sitio de contacto entre el parásito y el vector se da en la membrana perimicrovilar presente en el intestino, la cual está compuesta por lipoproteínas, glicoconjugados y moléculas de unión a carbohidratos; esta membrana funciona como un sitio de adhesión para los epimastigotes (Fig. 5), proceso esencial para el establecimiento del parásito dentro del insecto (Gutiérrez-Cabrera, et al., 2014). Otros factores que influyen en la interacción vector-parásito son la activación de la respuesta inmune humoral y la microbiota del tracto digestivo, las lectinas, los factores neuroendocrinos y cambios de temperatura, entre otros (Schaub, 1989; García & Azambuja, 1991; Schaub, 1994; Kollien, et al., 1998; García, et al., 1999; Vallejo, et al., 2009). Dado que la mortalidad de *T. cruzi* en el intestino del insecto puede ser mayor al 80 % y llegar al 100 % en el hemocele, es claro que la respuesta inmune tiene un papel importante en la regulación de la población del parásito, sin embargo, los mecanismos exactos del porqué el insecto no es capaz de eliminar completamente la infección, aún se desconocen (Ferreira, et al., 2016; Fuentes-Vicente, et al., 2016).

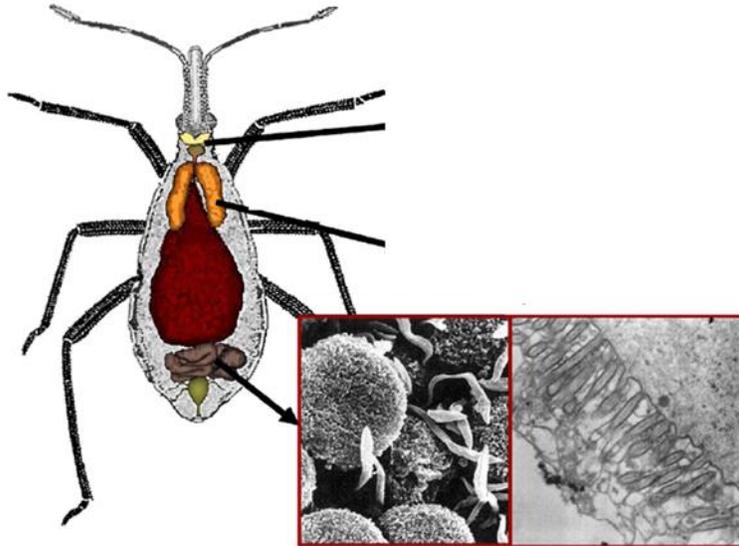


Figura 5. Esquema de la localización de la membrana perimicrovilar en el intestino posterior del insecto. Se muestran imágenes de microscopía de escaneo y microscopía electrónica de transmisión de la adhesión de los epimastigotes a la membrana perimicrovilar. Tomado de García, et al., 2007.

Como ya se mencionó en la sección “Generalidades del agente causal de la enfermedad”, *T. cruzi* posee una gran variabilidad genética por lo que actualmente se agrupa en unidades discretas de tipificación (DTUs, Discrete Typing Units) denominadas TcI al TcVI (Zingales et al., 2009). Los DTUs presentan diferente distribución geográfica y se comportan de forma variable dentro de los hospederos vertebrados e invertebrados (Vallejo, et al., 2009). Las variaciones morfológicas, fisiológicas y ecológicas de *T. cruzi*, incluidas su grado de infectividad y su grado de virulencia, podrían explicar las diversas manifestaciones clínicas de la Enfermedad de Chagas en las diferentes regiones geográficas (García & Azambuja, 1991). La estructura genética del parásito está vinculada a la capacidad que tienen las diferentes cepas para poder desarrollarse en una especie de triatomino determinada (Azambuja, et al., 2004; Azambuja, et al., 2005; Vallejo, et al., 2009).

I.7 Sistema inmunológico en insectos

Los insectos son el grupo de organismos más exitoso en términos de diversidad de especies, este éxito evolutivo refleja su capacidad de adaptación ante constantes cambios y ante la presencia de un amplio espectro de organismos potencialmente patógenos (Vilcinskas, 2013).

Los insectos han desarrollado mecanismos para el reconocimiento de patógenos, así como una serie de estrategias para defenderse de microorganismos potencialmente patógenos. El sistema inmunológico de insectos ha sido mayormente estudiado en insectos con desarrollo holometábolo (desarrollo completo), el principal modelo de estudio utilizado es *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*), del cual se han descrito los principales componentes y mecanismos de la respuesta inmune en insectos (Lemaitre & Hoffman, 2007),

quedando la información sobre el sistema inmunológico en insectos triatominos limitada y los pocos estudios realizados están enfocados principalmente a especies sudamericanas.

A diferencia de los mamíferos, los insectos carecen de inmunoglobulinas y de una respuesta inmunológica adaptativa, sin embargo, su sistema innato está muy desarrollado (Gillespie & Kanost 1997). La defensa inicial que tienen los insectos para contener a los patógenos son la cutícula y los epitelios, ambos actúan como barreras físicas, previniendo la entrada y dispersión de agentes externos hacia la cavidad interna de los insectos denominada hemocele (Lavine & Strand, 2002). Una vez que los microorganismos invasores logran romper estas barreras, se activa la respuesta inmunológica, la cual está compuesta de elementos celulares y humorales.

La respuesta celular está dada principalmente por células del sistema circulatorio (hemocitos), los cuales participan en la destrucción de agentes patógenos por medio de diferentes mecanismos de acción: fagocitosis, encapsulación y nodulación (Gillespie & Kanost 1997; Tsakas & Marmaras, 2010). Además, las células del epitelio intestinal y del cuerpo graso (órgano homólogo al hígado de vertebrados) participan en la secreción de moléculas solubles efectoras que componen la defensa de tipo humoral, dentro de las cuales se encuentran moléculas citotóxicas (EROs, especies reactivas de oxígeno; ERNs, especies reactivas de nitrógeno), cascadas proteolíticas que dan como resultado la melanización y coagulación de la hemolinfa (Lu, et al., 2014). También la activación de diferentes vías de señalización (Toll, Imd, JAK/STAT) mediante el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs por sus siglas en inglés: *pathogen associated molecular patterns*), como por ejemplo peptidoglicanos y lipopolisacáridos bacterianos y glucanos β -1-3 de hongos, los cuales son reconocidos por los receptores de reconocimiento de patrones (PRR, del inglés: *Pattern Recognition Receptor*) localizados en la superficie de las células del epitelio y de los hemocitos (Lemaitre & Hoffman, 2007). Existen otros mecanismos de reconocimiento microbiano en insectos, los que están mediados por lectinas tipo C (CTLs, *C-type lectin*) (Dodd & Drickamer, 2001) y por proteínas con enlaces tioéster (TEPs, *Thioester-containing proteins*) (Blandin & Levashina, 2004). Dependiendo del tipo de PAMP reconocido es que se dará la activación de alguna de las vías intrínsecas, la señalización culmina con la síntesis de diferentes tipos de péptidos antimicrobianos (PAM) a la hemolinfa (Fig. 6), los cuales actúan directamente sobre las paredes celulares de los patógenos (bacterias, hongos, parásitos) (Imler & Bulet, 2005).

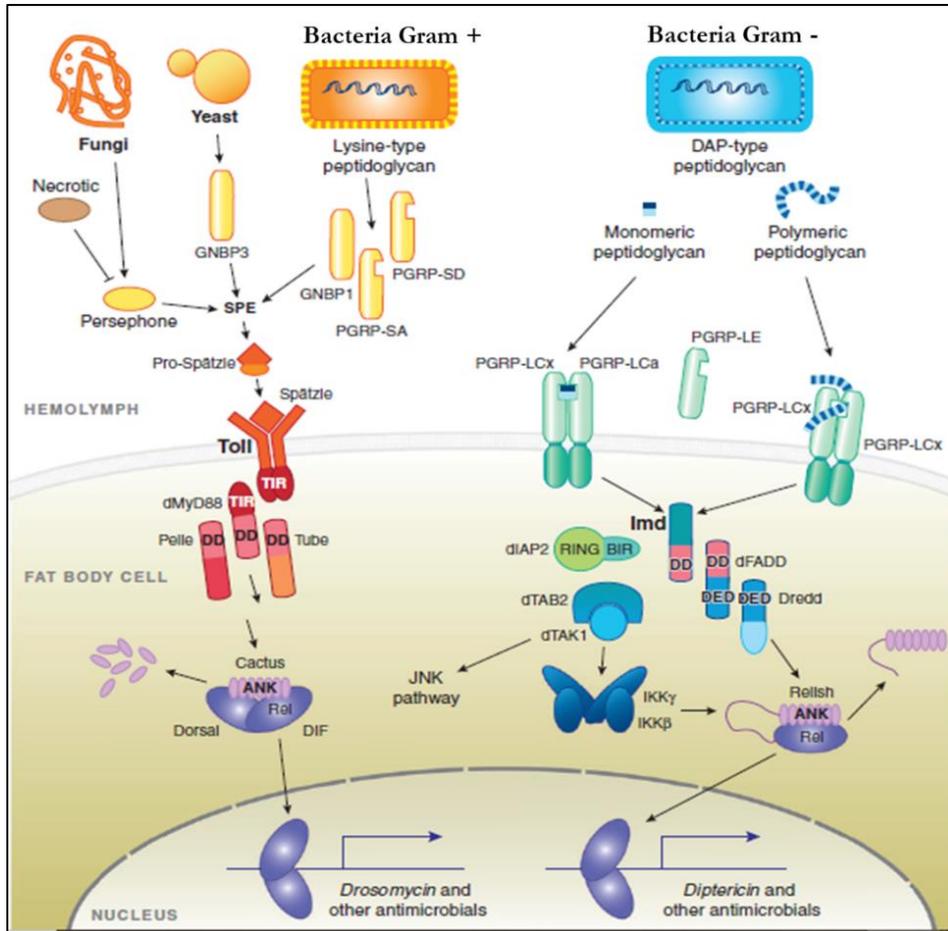


Figura 6. Modelo de la activación de las vías Toll e Imd. La vía Toll es activada por hongos y bacterias Gram +, la vía Imd se activa principalmente por bacterias Gram-. **Vía Toll:** El receptor Toll se activa al unirse con una forma escindida de Spätzle, procesada por cascadas proteolíticas activada por moléculas de reconocimiento secretadas (PGRP-SA, PGRP-SD, GNBPs), Spätzle maduro se une como un dímero a Toll, induciendo así su dimerización en la membrana plasmática, esto provoca el reclutamiento de tres proteínas intracelulares: MyD88, Tube y Pelle, esta última también es una quinasa; por un mecanismo aun no descrito, Cactus es fosforilado y luego degradado por el proteosoma, en consecuencia los factores de transcripción de Dif y Dorsal son liberados para llegar al núcleo. **Vía Imd:** Tras la unión directa con inductores bacterianos (DAPS [ácido diaminopimérico] monomérico o polimérico) PGRP-LC recluta al adaptador Imd, luego Imd interacciona con dFADD que se une a la caspasa Dredd, se ha propuesto que esta caspasa se une a Relish, después de la escisión de Relish, el dominio Rel se transloca al núcleo, mientras que el dominio inhibitor permanece estable en el citoplasma, Relish es fosforilado por el complejo de señalización IKK, que se cree que es activado por TAK1 y su adaptador TAB2 de manera dependiente de Imd y posiblemente dFADD. Expresión diferencial de drosomicina (Toll objetivo) y diptericina (Imd objetivo) genes en respuesta a la inyección de *E. coli* (bacterias Gram-) o *M. luteus* (Gram +). Tomado de Lemaitre & Hoffman, 2007.

I.7.1 Péptidos Antimicrobianos (PAMs) de insectos

El primer PAM extraído y purificado de insectos fue la cecropina proveniente del díptero *Hyalophora cecropia* (*H. cecropia*) (Hultmark, et al., 1979), desde entonces se han descrito más de 200 PAMs en diferentes especies de insectos (Lee, et al., 2013).

Los PAMs están compuestos por menos de 100 residuos de aminoácidos, en su mayoría básicos (Lisinas, Argininas e Histidinas), por lo tanto, un gran porcentaje de estas moléculas reportadas en insectos son de naturaleza catiónica y presentan un alto grado de hidrofobicidad, ambas características les permiten interactuar con las membranas celulares de bacterias, hongos, parásitos y virus (Hancock & Diamond, 2000; Wu, et al., 2018).

En insectos con metamorfosis completa (holometábolos), los PAMs se sintetizan principalmente por células del cuerpo gordo y en insectos con desarrollo incompleto (hemimetábolos) se sintetizan mayormente por los hemocitos; en ambos casos, estas moléculas son secretadas a la hemolinfa (Bulet & Stöcklin, 2005) y su expresión está regulada mayormente por las vías Toll e Imd (Hetru, et al., 2003). Es importante destacar que en insectos sanos hay una expresión basal de estas moléculas, sin embargo, existe una sobreexpresión ante la presencia de una infección (Uvell & Engström, 2007).

La mayoría de los PAMs son sintetizados como proteínas precursoras inactivas (pro-péptidos), las cuales tras un proceso de maduración y con ayuda de una peptidasa, se convertirán en péptidos maduros con actividad antimicrobiana y serán secretados al espacio extracelular (Bulet & Stöcklin, 2005; Yi, et al., 2014). Dependiendo de la composición de aminoácidos y de la estructura terciaria, los PAMs se clasifican dentro de tres grupos (Tabla 2):

- Péptidos catiónicos lineales α -hélice sin residuos de cisteínas.
- Péptidos con gran cantidad de residuos de prolinas y/o glicinas.
- Péptidos cuya estructura está establecida por puentes disulfuro.

En insectos, el mecanismo de acción preciso de estas moléculas está descrito solo para un número limitado de PAMs, sin embargo, la permeabilización de la membrana es un tema recurrente (Tonk & Vilcinskas, 2017). Los mecanismos de acción típicos descritos para estas moléculas, involucran la lisis celular de bacterias por medio de la despolarización de las membranas y de la formación de poros transmembranales y de canales iónicos (Lee, et al., 2013; Józefiak & Engberg, 2017).

Tabla 2. Clasificación de PAMs.

Grupo	PAM	Actividad	Origen
Péptidos catiónicos lineales α -hélice sin residuos de cisteína	cecropinas, sarcotoxins, stomoxyns	Gram + y - Hongos filamentosos	Dípteros Lepidopteros
Péptidos con gran cantidad de residuos de prolinas y/o glicinas	Apidaecin, Drosocin, Lebocin, Metchnikowin Formaecin, Pyrrhocoricin, Metalnikowin	Gram + y - Hongos	Dípteros Lepidopteros Hymenopteros
Péptidos cuya estructura está establecida por puentes disulfuro	Defensinas Tanatinas Lisozimas Drosomicinas	Gram + Gram -	Dípteros Lepidopteros Coleópteros Hymenopteros Odonatos Triatominos

Información tomada de Bulet & Stöcklin, 2005 y Yi, et al., 2014.

Los PAMs inicialmente interactúan con la superficie de las células por medio de interacciones electrostáticas. Las superficies externas de las membranas citoplasmáticas de células eucariontes, carecen de carga neta debido a que están compuestas básicamente de lípidos no cargados, mientras que las membranas de las células bacterianas contienen fosfolípidos ácidos tales como el fosfatidilglicerol y la cardiolipina, confiriéndoles una carga negativa (Tonk & Vilcinskas, 2017). La eficiencia antimicrobiana de estas moléculas depende de la composición de lípidos, así como del potencial eléctrico negativo de las membranas blanco (Bahar & Ren, 2013). En la literatura se han descrito 4 modelos principales (Fig. 7) que explican los posibles mecanismos de acción de los PAMs contra bacterias (Broden, 2005; Bahar and Ren, 2013):

- **Modelo tipo carpeta/detergente:** Los péptidos no se insertan en la membrana, sino que permanecen asociados con la región externa y forman una especie de alfombra capaz de debilitar la membrana, causando su colapso en una configuración de micelio y eventualmente se produce la muerte celular por pérdida del citoplasma.
- **Modelo de agregados:** Similar a la función de los detergentes, los péptidos se unen a la membrana a una concentración alta, posteriormente se reorientan permitiendo la formación de estructuras parecidas a las micelas que se extienden en la bicapa en un complejo péptido-lipídico. Estos agregados aleatorios transmembrana de lípido-péptido y agua, forman un canal por el cual se liberan iones, causando la muerte celular por pérdida del contenido citoplasmático, o pueden desintegrarse espontáneamente, lo que lleva a la translocación de los péptidos hacia el citoplasma donde pueden afectar blancos de acción internos.

- **Modelo tipo barril:** Los péptidos se unen a la región hidrofóbica de las membranas, creando un poro hidrofílico. La formación de este tipo de poros es irregular en tamaño y duración, lo que da como resultado la pérdida del equilibrio osmótico y del potencial de membrana. Este mecanismo de acción está dado por péptidos altamente hidrofóbicos
- **Modelo toroidal:** Los péptidos se insertan en la membrana en dirección paralela a los fosfolípidos y a los fosfatos, propiciando que las bicapas lipídicas se doblen continuamente a través del poro formado para que el núcleo del poro esté alineado por los péptidos y los fosfatos de los fosfolípidos, dando como resultado una lisis celular.

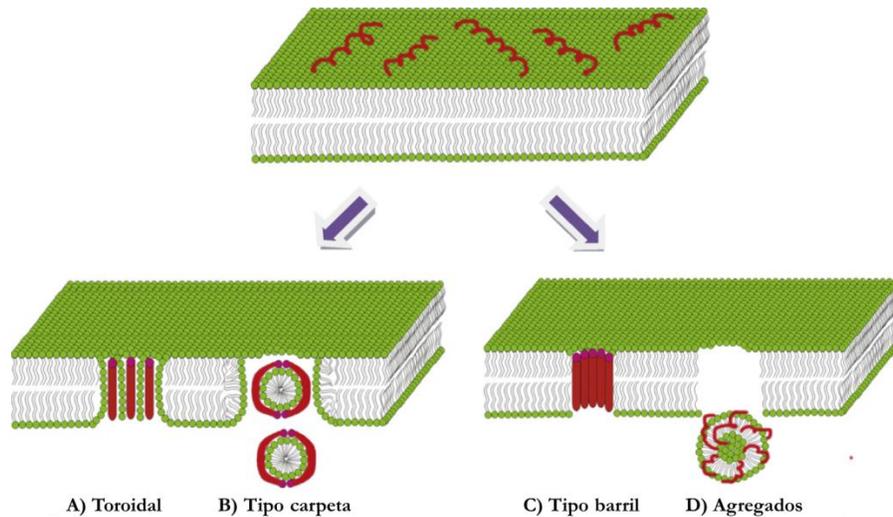


Figura 7. Principales modelos de acción de los PAMs contra bacterias. **A)** Tipo barril, los PAMs se insertan en la membrana perpendicularmente, unidos hacia el lado hidrofóbico de la bicapa lipídica. **B)** Tipo carpeta, pequeñas áreas de la membrana están recubiertas con moléculas de PAMs con los lados hidrofóbicos mirando hacia adentro dejando poros en la membrana. **C)** Modelo toroidal, este modelo se parece al modelo tipo barril, con la diferencia de que los PAMs siempre están en contacto con los grupos fosfatos de los fosfolípidos. **D)** Canal agregado, aquí los péptidos se insertan en la membrana y luego se agrupan en agregados no estructurados que se extienden por la membrana. Imagen modificada de Li et al., 2012.

Otros mecanismos de acción descritos para estas moléculas involucran la internalización celular para llegar a blancos específicos. Existen reportes de PAMs capaces de inhibir funciones determinantes para el funcionamiento celular como por ejemplo la síntesis de proteínas, la formación del septo en bacterias, la síntesis de la pared celular y la síntesis de ácidos nucleicos (Brogden, 2005). No obstante, estos mecanismos están descritos para PAMs de vertebrados, por lo que la información referente a los mecanismos de acción intracelulares en insectos es pobre (Tonk & Vilcinskas, 2017).

El principal papel que desempeñan estas moléculas se da dentro del sistema inmunológico, como agentes antimicrobianos efectores y como inmunomoduladores, sin embargo, también participan en el control poblacional de la microbiota y recientemente se ha reportado una sobre expresión de genes durante el proceso

de envejecimiento de *D. melanogaster* (Hancock & Diamond, 2000; Hancock, et al., 2006; Hanson & Lemaitre, 2018; Garschall & Flatt, 2018; Min & Tatar, 2018).

I.7.1.1 Defensinas

Las defensinas son una familia de PAMs catiónicos ampliamente distribuida en la naturaleza y están agrupadas dentro de la categoría de péptidos cuya estructura está establecida por puentes disulfuro. Las defensinas de insectos poseen 6 residuos de cisteínas conservados que dan como resultado la formación de tres puentes disulfuro, el patrón de apareamiento entre las cisteínas es único en insectos (Cys¹-Cys⁴, Cys²-Cys⁵, Cys³-Cys⁶) y la formación de los puentes disulfuro estabiliza el dominio activo CS $\alpha\beta$, el cual también se encuentra en diferentes grupos de organismos invertebrados como plantas y escorpiones (Dassanayake, et al., 2007; Gao & Zu, 2014). El dominio CS $\alpha\beta$ está compuesto por una α -hélice y dos β -laminas antiparalelas unidas por los tres puentes disulfuro (Fig. 8), los cuales brindan al péptido una compactación de la estructura, incrementando su estabilidad (Koehbach, 2017).

Las defensinas son sintetizadas como proteínas precursoras de mayor tamaño, denominadas pre-pro-péptidos conformados por: un péptido señal, el cual se encargará de guiar a la molécula al retículo endoplásmico; un propéptido que sirve como inhibidor intramolecular para evitar la autocitotoxicidad (Michaelson, et al., 1992) y un péptido maduro que en insectos tiene un tamaño de entre 34-51 residuos de aminoácidos, cuya estructura terciaria es el dominio CS $\alpha\beta$. Los péptidos maduros de esta familia poseen alto grado de similitud.

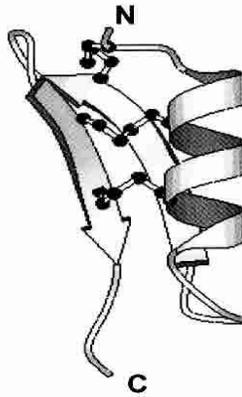


Figura 8. Estructura terciaria (CS $\alpha\beta$) de una defensina de invertebrado. Se representan los tres puentes disulfuro y el extremo C- y N- terminal. Tomada de Ilsayov, et al., 2011.

La gran mayoría de las defensinas de insectos tienen actividad contra bacterias Gram + (Ganz, 2005), a través de la formación de poros en la membrana o por medio de la inhibición de la síntesis de la pared celular, ya que son capaces de unirse al lípido II (precursor del peptidoglicano) (Schneider, et al., 2010). La variabilidad en la composición fosfolipídica de las membranas bacterianas podría explicar el amplio espectro de acción que tiene esta familia de péptidos (Suárez-Carmona, et al., 2015). De manera interesante, pocas defensinas de insectos se

han reportado por tener exclusivamente actividad contra hongos, la mayoría de ellas exhiben actividad tanto bactericida como fúngica (Aumer, et al., 2019). Asimismo, se ha reportado la participación de estas moléculas en mecanismos de destrucción de células tumorales en *D. melanogaster* (Parvy, et al., 2019).

II. ANTECEDENTES

En 2015 se publicó la secuencia del genoma de *R. prolixus*, que hasta ahora es el único insecto triatomino cuya secuencia genómica ha sido determinada. En ese estudio se reportó la ausencia de los principales componentes canónicos de la vía Imd y particularmente se identificó la presencia de 11 genes que codifican para defensinas, además de otros PAMs como lisozimas y prolixicinas (Mesquita, et al., 2015).

La familia de PAMs más estudiada en triatominos es la de las defensinas. Diferentes isoformas de estas moléculas se han reportado en los principales vectores de *T. cruzi* de Sudamérica: *R. prolixus*, *T. infestans* y *T. brasiliensis* (López, et al., 2003; Waniek, et al., 2009; Araújo, et al., 2015; Mannino, et al., 2019). La mayoría de estos trabajos se enfocan en la caracterización de los genes y en la expresión de RNA mensajeros bajo diferentes retos inmunológicos (Vieira, et al., 2014 y 2016). Sin embargo, la información referente a moléculas del sistema inmunológico y particularmente de PAMs en especies de triatominos norteamericanos es escasa y para especies mexicanas es prácticamente nula.

También se ha reportado que existe una expresión localizada de las defensinas en los diferentes órganos sintetizadores de PAMs. En *T. brasiliensis* se ha observado que *def1* se expresa de forma diferencial en los diferentes compartimentos del tracto digestivo y particularmente en el intestino anterior a tiempos tardíos de la ingesta de sangre con *T. cruzi*, por lo que posiblemente participa tanto en la regulación de bacterias después de la alimentación como en la regulación de la población del parásito (Araújo, et al., 2006; Waniek, et al., 2011), sin embargo se desconoce el efecto directo del péptido. Mientras que *defA* de *R. prolixus* aumenta en el intestino y cuerpo graso tras un desafío inmune (López, et al., 2003).

Recientemente se reportó el transcriptoma de *T. pallidipennis*, donde nuevamente se observó la ausencia de componentes de la vía Imd, curiosamente tampoco se encontraron PAMs como cecropinas y atacinas, pero sí lisozimas, prolixicinas y se identificaron 8 transcritos de defensinas (Zumaya-Estrada, et al., 2018). Además, se ha reportado el proteoma y el transcriptoma de los componentes de la saliva de *T. pallidipennis*, donde se identificaron dos moléculas de bajo peso molecular: una denominada toxin_38 (péptido tipo defensina) muy similar a la Hge-scorpine reportada en el veneno del escorpión *Hadrurus gertschi*, la cual tiene como mecanismo de acción bloquear canales de potasio y tiene actividad contra bacterias y protozoarios; y la tonxin_2, similar al bloqueador de canales de potasio Kv1.3 reportada en el escorpión *Heterometrus laoticus* (Hernández-Vargas, et al., 2017).

III. JUSTIFICACIÓN

Pese a que la enfermedad de Chagas es uno de los principales padecimientos parasitarios en México, no existen ni vacunas ni fármacos completamente efectivos contra el parásito que la produce, además de que los fármacos utilizados generan efectos secundarios. En México se ha tratado de controlar la población vectorial por medio de campañas de fumigación, sin embargo, éstas no han sido exitosas.

El estudio sobre la respuesta inmune de insectos de importancia médica ha mejorado el entendimiento de diversos procesos biológicos que involucran la transmisión de patógenos, lo cual ayuda a generar estrategias para controlar las enfermedades que transmiten. A pesar de que *T. pallidipennis* es uno de los principales vectores de *T. cruzi* en México, no existen estudios orientados a la interacción vector-parásito ni a la caracterización del sistema inmune del insecto, lo cual es determinante para desarrollar nuevas estrategias de control.

Particularmente, las defensinas son moléculas efectoras que participan en la respuesta inmunológica en diversos grupos de organismos. En triatomíneos se han identificado diferentes isoformas de estas moléculas y existen evidencias del posible papel que tienen ante la presencia de *T. cruzi* dentro del insecto, por lo que, al conocer la variabilidad genética de estas moléculas, así como su expresión ante la presencia del parásito, podremos entender más sobre el papel de estas moléculas en el sistema inmunológico de los insectos, así como en la relación vector-parásito.

IV. HIPÓTESIS

Si existen diferentes isoformas de defensinas en *T. pallidipennis* y tienen actividad antimicrobiana, entonces podrían tener un efecto directo contra *T. cruzi*.

V. OBJETIVOS

Objetivo General

Caracterizar las defensinas de *T. pallidipennis* a nivel de gen, transcrito y proteína funcional.

Objetivos Particulares

- Identificar, secuenciar y caracterizar genes codificantes para defensinas en *T. pallidipennis*.
- Determinar la expresión de genes de defensinas en *T. pallidipennis* bajo diferentes tipos de infecciones.
- Generar una defensina recombinante.
- Evaluar la actividad de la defensina recombinante contra bacterias.
- Evaluar la actividad de la defensina recombinante contra los tripanosomátidos: *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma rangeli*, *Leishmania major* y *Leishmania mexicana*.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

VI.1. Mantenimiento de *T. pallidipennis*

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 y temperatura (25 - 28 °C). Los insectos se alimentaron de sangre de conejo cada 15 días, todos los procedimientos se realizaron siguiendo los lineamientos generales del Código de Ética del Instituto de Investigaciones Biomédicas para el cuidado de los animales.

VI.2. Cultivo de *T. cruzi*, *T. rangeli*, *Leishmania major* y *Leishmania mexicana*

Los epimastigotes de la cepa Querétaro (Qro) y la cepa Ninoa de *T. cruzi* (Espinoza, et al., 2010) se mantuvieron rutinariamente en medio LIT pH 7.2 (por sus siglas en inglés, *Liver Infusion Tryptose*), suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB) y 25 µl/ml de hemina a 28 °C. Los parásitos se mantuvieron en cultivo de 3 - 4 días para obtener la fase logarítmica (log) de crecimiento.

Los epimastigotes de *Trypanosoma rangeli* se mantuvieron en medio LIT suplementado con 20 % SFB sin hemina a 28 °C (De Moraes, et al., 2008). Los parásitos se mantuvieron en cultivo de 3 - 4 días para obtener la fase log de crecimiento.

Promastigotes de *Leishmania major* (*L. major*) y *Leishmania mexicana* (*L. mexicana*) se mantuvieron en medio 199 (M199) (Gibco BRL, France) suplementado con 10 % de SFB, 2 mM L-glutamina, 25 mM HEPES, 100U/ml penicilina (Sigma-Aldrich) y 100 µg/ml de estreptomycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (Dey, et al., 2002). Los parásitos se mantuvieron a 28 °C en cultivo de 2 - 3 días para obtener la fase log de crecimiento.

VI.3. Infecciones de *T. pallidipennis*

Infeción con *T. cruzi* cepa Ninoa

Se utilizaron ratones hembra de la cepa BALB/c de 8 a 11 semanas, proporcionados por el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas. Los ratones se inocularon intraperitonealmente con 300,000 tripomastigotes sanguíneos de la cepa Ninoa, la cual ha sido catalogada de baja virulencia (Espinoza, et al., 2010), los ratones se mantuvieron con alimento y agua *ad libitum*. A los 22 días post infección (dpi) (día máximo de parasitemia en circulación), se tomó una muestra de sangre y los parásitos se contaron mediante cámara de Neubauer, aquellos ratones que tuvieran una parasitemia similar se utilizaron en la infección de los insectos (Monteón et al., 1996; Espinoza et al., 2010). Para cada experimento se infectaron de 4 a 6 ratones, dependiendo del número de insectos a utilizar.

Para la infección de los insectos, se utilizó el estadio V, dado que es un estadio donde los insectos tienen un buen tamaño para poder ser manipulados y la presencia de hormonas sexuales es mínima. Los insectos fueron alimentados por 4 hrs con los ratones infectados y como grupo control, se alimentaron insectos con sangre de ratones no infectados. Para garantizar la homogeneidad en la alimentación de los insectos, éstos se pesaron antes y después de la alimentación con la finalidad de determinar cuanta sangre ingirieron y estimar el número de parásitos con el que se infectaron. Los insectos alimentados con sangre de ratones infectados y ratones no infectados se sacrificaron a diferentes tiempos: 1 y 7 dpi, para posteriormente analizar la expresión de defensinas mediante RT-PCR cuantitativo. Cada punto experimental consistió en tres individuos.

Infeción con bacterias

Las bacterias utilizadas fueron *Listeria innocua* (*L. innocua*), *Escherichia coli* (*E. coli*) y *Micrococcus luteus* (*M. luteus*), las cuales se crecieron en medio líquido Luria Bertani (LB) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a 37 °C por 18 hrs y 180 rpm. Pasadas las 18 hrs, 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.O₆₀₀ 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, para posteriormente infectar ninfas de estadio V de *T. pallidipennis* que tuvieran 15 días de haber consumido su última alimentación. La infección se realizó vía hemocele, para lo cual, los insectos se inmovilizaron con alfileres en una placa rellena de parafina y con ayuda de una aguja Hamilton se cargaron 7 µl de PBS estéril (grupo control) o 7 µl de bacterias en PBS (D.O₆₀₀ 1.2) (grupos experimentales). La inoculación se realizó entre el trocánter y la coxa¹, para evitar que se saliera la solución inoculada por presión la herida se selló con cera. Los insectos se sacrificaron a las 4 hrs post infección, para posteriormente analizar la expresión de defensinas mediante RT-PCR cuantitativo. Se realizaron dos experimentos independientes, cada grupo experimental consistió en pools de tres insectos.

VI.4. Disección de *T. pallidipennis*

Todo el material utilizado para la disección de los insectos se esterilizó previamente en autoclave. Los insectos se anestesiaron con frío a -20 °C durante 10 min y una vez inmovilizados se realizó un corte sobre el conxivo² de tal forma que no se lastimaran los tejidos al hacer el corte para extraer el contenido abdominal (tracto digestivo, túbulos de Malpighi³ y cuerpo graso⁴). Los insectos se sumergieron en cajas Petri con agua tratada con 0.1 % de dietilpicrocarbonato (agua DEPC) estéril (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) para

¹ Segmentos que componen la estructura de las patas de insectos.

² Parte lateral del abdomen de los insectos, en triatomínos se caracteriza por presentar manchas de color amarillas, naranjas o rojas.

³ Sistema de excreción y osmoregulación en insectos.

⁴ Órgano del sistema de almacenamiento de lípidos en insectos, se caracteriza por presentar manchas amarillas, naranjas o rojas.

³ Sistema de excreción y osmoregulación en insectos.

⁴ Órgano en insectos localizado en el hemocele, tiene un papel central en las funciones metabólicas y participa en los sistemas endocrino e inmunológico.

eliminar el contenido intestinal y con ayuda de una aguja de insulina, se realizaron varios lavados con agua DEPC.

VI.5. Extracción de ácidos nucleicos y obtención de ADN complementario (ADNc) de órganos de *T. pallidipennis*

Extracción de ADN genómico (ADNg)

Se extrajo ADN genómico de los órganos del contenido abdominal (tracto digestivo, cuerpo graso y túbulos de Malpighi) (Sambrook, et al., 1989) para lo cual, todo el tejido se maceró en amortiguador de lisis (50 mM Tris-HCl, pH 8; 100 mM EDTA, pH 8; 100 mM NaCl y 1 % SDS) y se incubó a 37 °C por 18 hrs. Transcurrido este tiempo, se agregó un volumen igual de fenol saturado (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), se mezcló por inversión 1 min, se centrifugó a 12800 × g por 5 min a temperatura ambiente (TA) y la fase acuosa se recuperó para pasarse a otro vial. Después se agregó un volumen igual de cloroformo (Sigma Aldrich), se realizaron los mismos pasos descritos anteriormente. Al volumen recuperado, se le agregó un volumen igual de fenol: cloroformo: isoamílico (25: 24: 1) (Sigma-Aldrich), se mezcló, se centrifugó y se recuperó la fase acuosa. Para la precipitación, se agregaron 2.5 volúmenes de etanol (EtOH) absoluto (Sigma-Aldrich), se dejó a -20 °C por 18 hrs, se centrifugó a 12800 × g a 4 °C por 15 min, a la pastilla se le agregó la misma cantidad de 70 % EtOH y se centrifugó en las mismas condiciones. Finalmente, la pastilla se resuspendió en agua inyectable estéril. La concentración del ADN se cuantificó en un NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) y su integridad se analizó por medio de geles de agarosa 1 %. El ADN se guardó a -20 °C hasta su uso.

Extracción de ARN total y obtención de ADN complementario (ADNc)

El ARN total se extrajo de los órganos del contenido abdominal (tracto digestivo, cuerpo graso y túbulos de Malpighi) para lo cual los órganos se mantuvieron en todo momento en presencia de agua tratada con 0.1 % DEPC. El tracto digestivo se lavó varias veces con agua tratada con 0.1 % DEPC, con ayuda de una aguja de insulina, hasta que la solución quedara limpia. Posteriormente, los órganos se colocaron en tubos eppendorf y se maceraron con ayuda de un pistilo en 400 µl de TRIZOL™ (Invitrogen, USA), siguiendo la metodología del fabricante. Para la fase de separación, se agregó una proporción de 20 % cloroformo grado molecular (Sigma-Aldrich) del volumen original en TRIZOL™, se mezcló por inversión 15 segundos a TA y se dejó reposar por 3 min, luego se centrifugó a 12800 × g a 4 °C por 15 min. Para recuperar la fase orgánica se agregó una proporción de 50 % del volumen inicial de isopropanol y se dejó a -20 °C por 18 hrs, se centrifugó a 12800 × g por 10 min a 4 °C, se desechó el sobrenadante y la pastilla se lavó con 75 % EtOH. Finalmente, para obtener el ARN total, se centrifugó a 7500 × g por 5 min y se desechó el sobrenadante, una vez que el tubo estuviera seco de los residuos del EtOH, la pastilla se resuspendió en agua tratada con 0.1 % DEPC. La

concentración del ARN se cuantificó con un NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) y la integridad se analizó por medio de geles de agarosa 1 %. El ARN total se congeló a -70 °C hasta el momento de su uso.

Para eliminar residuos de ADN, partiendo de 1 µg de ARN, se realizó el tratamiento con la enzima DNasa I (desoxyribonuclease I) amplification Grade (Invitrogen, USA). Para la mezcla de reacción se preparó un volumen final de 10 µl: por cada µg de ARN total se adicionó 1 µl de DNasa I (1 U/µl), 1 µl de amortiguador DNasa 10 x y agua tratada con 0.1 % DEPC. La mezcla se incubó a TA por 15 min, se añadió 1 µl 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 µl de reacción que consistieron en 1 µg de ARN, 1.25 mM de cada dNTP (Invitrogen, USA), 4.25 µM de oligo dT (Invitrogen, USA), 40 U de inhibidor de ribonucleasas (Invitrogen) y 50 U transcriptasa reversa del virus Moloney de la leucemia murina (Invitrogen). 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.

VI.6. Caracterización de genes que codifican para defensinas en *T. pallidipennis*

Amplificación de los genes de defensinas

Para la estandarización de la amplificación de los genes, se extrajo ADN genómico (previamente descrito), a partir del contenido abdominal (cuerpo graso, tracto digestivo y túbulos de Malpighi) de un insecto adulto hembra, utilizando los oligonucleótidos reportados para la amplificación de los genes completos de tres isoformas de defensinas (*def1*, *def3* y *def4*) de *Triatoma brasiliensis* (Araújo et al., 2006; Waniek et al., 2009) ya que no se ha reportado la secuencia del genoma de *T. pallidipennis*. La mezcla de reacción consistió en lo siguiente: 1.5 mM MgCl₂, 1× de amortiguador de Taq polimerasa, 0.2 mM dNTPs, 1 U Taq polimerasa, 0.5 µM oligonucleótidos y 70 ng de DNA. El programa de PCR consistió en 30 ciclos de amplificación: 1 min a 94 °C, 1 min de T_m a 66 °C (*def1*) o 70 °C (*def3/def4*) y 1 min a 72 °C. La amplificación de los genes se realizó en un termociclador T100 thermal cycler (Bio-Rad, Inc).

Tabla 3. Oligonucleótidos usados para la amplificación de los genes *def1*, *def3* y *def4*.

Gen	Secuencia 5' → 3'	Tamaño esperado del gen (pb)
<i>def1</i>	Fw: 5'- GGCGCCATGAAGTGC GCACTCTCTTTG - 3' Rv 5'- CATTGCAGGAAGTGAATTGATGCTTGGG - 3'	400
<i>def3</i>	Fw: 5'- GGCGCCATGAAGTGTGCACTCTCTTTG - 3' Rv: 5'- CTATCTGTCAGGAAAGTGAGCTTGGG - 3'	400
<i>def4</i>	Fw: 5'- GGCGCCATCATGAAGTGTGCACTCTC - 3' Rv: 5'- CACTGCAGGAAGTGAAGAGTGCTTGGG - 3'	400

Clonación de genes de defensinas en el plásmido de clonación pJET

Los productos de PCR de cada gen se purificaron con el kit PureLink PCR Purification (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) y con ayuda del kit CloneJet PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) se clonaron independientemente en el plásmido de clonación pJET, siguiendo las instrucciones del fabricante. Las bacterias transformadas se plaquearon en cajas de LB-Agar (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) y de las colonias crecidas, se seleccionaron 15 (5 colonias por gen) para la obtención del ADN plasmídico. El ADN obtenido de cada gen se mandó secuenciar al CINVESTAV, unidad Zacatenco, por la técnica de Sanger (ABI PRISM 3100), utilizando el oligonucleótido Fw (5' CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC 3').

Análisis bioinformático de defensinas

Para la identificación de los intrones en las 15 secuencias de *def1*, *def3* y *def4*, éstas se alinearon con las secuencias de ARN reportadas para *T. brasiliensis*: *def1* (AY641574.1), *def3* (EU694177.1) y *def4* (EU694178.1). La traducción a aminoácidos se realizó con ayuda de la plataforma ExpASy y el alineamiento se realizó en el servidor MultAlin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>) (Corpet, 1988). La identificación del péptido señal se realizó en el servidor ProP 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ProP/>). La masa molecular, punto isoeléctrico y otros parámetros moleculares se obtuvieron con ExpASy.

Análisis filogenético de defensinas

El análisis filogenético se realizó por dos métodos: Máxima verosimilitud⁵, usando el programa MEGA6 y el modelo de Tamura 3-parameter. Se utilizó una distribución gamma discreta para modelar las diferencias de velocidad evolutiva entre los sitios (5 categorías (+G, parámetro = 2.2566)) y las posiciones de codón

⁵ Método estadístico utilizado para estimar parámetros desconocidos de un modelo probabilístico. Se define como la cantidad proporcional de la probabilidad de los datos observados, dado el modelo.

incluidas fueron 1st + 2nd + 3th + sin codificación, y se utilizaron 10,000 replicas. El otro análisis fue por Inferencia Bayesiana⁶ utilizando el software Mr. Bayes, los valores de soporte de nodo se obtuvieron de 1,000,000 de generaciones mostrados a un lado de las ramas, la distancia evolutiva fue calculada usando el modelo de sustitución GTR con una tasa distribución gamma entre sitios y una proporción de sitios invariables.

Modelo por homología de defensinas

Las tres secuencias identificadas *def1.1*, *1.2* y *4.6* correspondientes a los péptidos maduros, se enviaron al servidor I-TASSER (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) para la predicción de la estructura terciaria. Los modelos obtenidos se mejoraron minimizando la energía utilizando el software YASARA (15097).

VI.7. Expresión de genes de defensinas en *Triatoma pallidipennis*

Generación de oligonucleótidos para péptidos maduros de defensinas

De las tres defensinas diferentes (*def1.1*, *def1.2* y *def4.6*) se diseñaron oligonucleótidos para amplificar la región del péptido maduro (Tabla 4), con la finalidad de analizar su expresión por medio de PCR cuantitativo.

Tabla 4. Oligonucleótidos para PCR cuantitativo del péptido maduro de *def1.1*, *def1.2* y *def4.6*.

Gen	Secuencia 5' → 3'	Tamaño (pb)
<i>Act</i>	Fw: 5' - CTGACCGAGGCCCTCAA - 3' Rv: 5' - GGAACAAGGCTTCTGGGCAG - 3'	475
<i>def1.1</i>	Fw: 5' - ATGACGCCGTATGGGAACAA - 3' Rv 5' - CTGCAATGGCACACAGTTCC - 3'	190
<i>def1.2</i>	Fw: 5' - TGGGAACAACCAGCTGGTGAA - 3' Rv: 5' - CTGCAATGGCACACAGTTCC - 3'	178
<i>def4.6</i>	Fw: 5' - AGCAGAATGGACTCAGCAACA - 3' Rv: 5' - CCCTTACATTGGCCACCACG - 3'	196

Amplificación de genes por RT-PCR cuantitativo (RT-PCRq)

El ARN obtenido del contenido abdominal de insectos infectados con bacterias y *T. cruzi*, así como de insectos adultos sin infectar (hembras y machos), se trató (10 µg) con la enzima DNAsa (Invitrogen, USA) y utilizando el kit KAPA SYBR FAST One-Step qRT-PCR (Kapa Biosystems, Boston, MA, USA) se realizaron las reacciones de amplificación de los genes de interés, siguiendo las instrucciones del fabricante. Las

⁶ Método matemático basado en el Teorema de Bayes y utilizado para calcular la verosimilitud de una hipótesis teniendo en cuenta información condicional. Calcula la probabilidad posterior partiendo de su probabilidad previa y multiplicándola por la probabilidad condicional, para dar una probabilidad conjunta.

reacciones de PCR se llevaron a un volumen final de 9 µl con: 100 ng de ARN como templado, 1x Kapa Sybr, 1x RT Kapa, 0.2 µM de cada oligonucleótido y agua estéril. Como gen constitutivo utilizado para normalizar los datos, se utilizó el gen de actina.

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, Australia).

La expresión relativa de los genes entre grupo de insectos infectados con respecto a grupos no infectados (controles) se realizó midiendo los cambios relativos del gen de interés (defensinas) con referencia al gen constitutivo (actina), la fórmula que se utilizó es la siguiente (Arroyo-Olarte, et al., 2018):

$$\text{Expresión Relativa} = \frac{(\text{Eficiencia defensina})^{\Delta\text{CT defensina}} (\text{promedio en controles} - \text{promedio en infectados})}{(\text{Eficiencia actina})^{\Delta\text{CT actina}} (\text{promedio de controles} - \text{promedio de infectados})}$$

VI.8. Generación de la defensina recombinante tipo 1 (rDef1)

Clonación del gen *def1* en el plásmido de clonación/expresión pQE-30

A partir de la secuencia del gen *def1* reportado en *T. brasiliensis* (Araújo, et al., 2006) y utilizando ADNc de *T. pallidipennis*, se amplificó este gen y el amplicón obtenido se secuenció, a partir de la secuencia, se diseñaron oligonucleótidos para amplificar únicamente la región del péptido maduro adicionando el sitio de reconocimiento para la enzima de restricción *Bam*HI en el extremo 5' y en el extremo 3' se ubicaron dos codones de paro, seguidos por el sitio de reconocimiento para la enzima de restricción *Ps*I (Tabla 5).

Tabla 5. Oligonucleótidos para amplificar la región del péptido maduro de *def1* con los sitios de corte *Bam*HI y *Ps*I.

Gen	Secuencia 5' → 3'	Tamaño de la región del péptido maduro (pb)
<i>def1.3</i>	Fw: 5'- caa <i>ggatc</i> agggccactgtgatctgctaag - 3' Rv: 5'- caa <i>ctgcag</i> cttctgcaatggcacag - 3'	160

Las condiciones de amplificación fueron las ya descritas para la amplificación de los tres genes. El producto de amplificación se purificó con el kit QIAEX II Gel Extraction Kit (QiaGen, Hilden, Germany). Posteriormente, se realizó la digestión parcial con la enzima *Bam*HI por 18 hrs a 37 °C, transcurrido el tiempo se añadió la enzima *Ps*I y se incubó por 2 hrs a 37 °C. El plásmido de clonación/expresión pQE-30 (donado por el Dr. Gerardo Corzo del Instituto de Biotecnología de la UNAM) se digirió en las mismas condiciones.

Una vez linealizado el inserto de interés y el plásmido, se realizó el proceso de ligación en 25 μ l de reacción de ligación con 5 U de la enzima T4 ADN Ligasa (Invitrogen, USA), 1x amortiguador T4 ADN Ligasa (Invitrogen, USA), más el inserto y el vector linealizado en una relación molar de 4 a 1 respectivamente. La reacción se realizó a 16 °C por 16 hrs. Transcurrido el tiempo, 1 μ l de la reacción de ligación se utilizó para transformar células hospederas de mantenimiento *E. coli* Top10 por medio de electroporación utilizando celdas de electroporación con una distancia de 1.0 mm entre electrodos, la cual se enfrió previamente a 4 °C hasta el momento de su uso, la electroporación se realizó con una descarga de 1.75 kV. Inmediatamente se permitió la recuperación de las células incubándolas en medio LB a 37 °C por 1 hr y 180 rpm. Posteriormente se concentraron las células mediante centrifugación (12800 \times g por 1 min) y el paquete celular se dispersó con ayuda de una espátula en cajas con LB agar-100 μ g/ml de ampicilina y se incubó por 18 hrs a 37 °C.

Aleatoriamente se seleccionaron 8 colonias para extraer ADN plasmídico (ADNp), las cuales se incubaron en medio líquido LB-100 μ g/ml de ampicilina por 18 hrs a 37 °C y 180 rpm. Se concentraron las células por centrifugación (12800 \times g por 1 min) y se resuspendieron en 300 μ l de solución STET (8 % sacarosa, 50 mM Tris-HCl pH 8.8, 50 mM EDTA, 5 % Tritón X-100 y 1 mg/ml de Lisozima), la mezcla se agitó por 5 seg en vortex, se hirvió por 45 seg y se centrifugó a TA y 13000 \times g por 15 min. El sobrenadante se pasó a un vial nuevo y el ADN se precipitó con 300 μ l de isopropanol, se incubó en hielo por 10 min y el paquete celular se resuspendió en 500 μ l de 70 % EtOH, luego se centrifugó a 4 °C por 20 min a 13000 \times g y una vez que el tubo estuviera seco de los residuos de EtOH, el ADN se resuspendió en 50 μ l de agua estéril. El ADNp se digirió con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Pst*I para corroborar la presencia del inserto de 150 pb.

Una vez identificadas las colonias que presentaron la integración del inserto, se crecieron dos colonias que tuvieran la integración del inserto en 10 ml de medio LB con 100 μ g/ml de ampicilina a 37 °C, por 18 hrs y 180 rpm, transcurrido el tiempo se extrajo el DNAP con el kit QIprep Spin Miniprep (QiaGen, Hilden, Germany). La concentración del ADN se cuantificó en el NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) y su integridad se analizó con geles de agarosa 1 %. La construcción se secuenció por la técnica de Sanger en el equipo 3500XL (Applied) para corroborar la secuencia y que el inserto estuviera en el marco de lectura. La secuenciación se realizó en el Laboratorio de secuenciación genómica de la biodiversidad y de la salud del Instituto de Biología (UNAM).

Generación de células competentes de la cepa de *E. coli* M15 [pREP4]

En condiciones de esterilidad, de un glicerol congelado de *E. coli* cepa M15 [pREP4] (donado por el Dr. Gerardo Corzo) se tomaron 10 μ l y se incorporaron en 3 ml de LB con 30 μ g/ml de kanamicina (Kan), este cultivo llamado pre-inóculo se incubó a 37 °C por 18 hrs y 180 rpm. Transcurrido el tiempo, se tomaron 100 μ l del pre-inóculo, se adicionaron 5 ml de LB-Kan y se incubó a 37 °C y 180 rpm, hasta llegar a una densidad óptica de 0.6 a 600 nm y una vez que se llegó a la D.O. deseada, se centrifugó a 4 °C y 5000 \times g por 5 min. El

paquete celular se resuspendió en 5 ml de 100 mM CaCl₂, se dejó en hielo por 20 min y se centrifugó a 5000 × g por 5 min a 4 °C. Posteriormente, el paquete celular se resuspendió con suavidad en 800 µl de 100 mM CaCl₂, se dejó en hielo por 1 hr y de esa mezcla, 200 µl se pasaron a un nuevo vial donde se agregó 1 µl de la construcción y se dejó en hielo por 30 min. El vial se incubó en agua previamente calentada a 43 °C por 2 min y enseguida se pasó a hielo por 5 min. Inmediatamente, se permitió la recuperación de las células, agregando 1 ml de medio LB e incubando a 37 °C por 1 hr y en agitación a 180 rpm. Finalmente, se concentró el paquete celular centrifugando a 12800 × g por 2 min, este se dispersó con ayuda de una espátula en cajas con LB-agar con ampicilina y se incubó a 37 °C por 18 hrs.

Expresión heteróloga de rDef1.3

Para la inducción de la expresión de rDef1.3, de las colonias crecidas de *E. coli* M15 [pREP4] con la construcción pQE-30_def1.3, se tomó una colonia y se incubó en 5 ml de medio enriquecido 2xYT (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) a 37 °C por 18 hrs. Transcurrido el tiempo de incubación, se tomaron 14 ml del pre-inóculo para agregarlo a 500 ml de medio 2xYT con 100 µg/ml de ampicilina, e incubarlo a 37 °C y 180 rpm hasta llegar a una D.O.₆₀₀ de 0.7 para adicionar el inductor 1 mM de IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido) (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), e incubar el cultivo a 30 °C por 18 hrs y 180 rpm. Se tomó una alícuota del cultivo antes de inducirlo y al finalizar la inducción, se analizó la expresión de la proteína en un gel de poliacrilamida de Tricina – dodecil sulfato de sodio (Tricina-SDS/PAGE) (15% gel separador / 4 % gel concentrador) teñido con el colorante azul de Coomassie G-250 (BioRad).

Una vez expresada la proteína de interés, se analizó si la proteína recombinante se encontraba en la fracción soluble o insoluble. El paquete celular (1 gr) se descongeló a TA, se resuspendió en amortiguador de lisis (20 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8, 5 mM DTT y 1 mM PMSF) siguiendo una relación de 2.5 ml de amortiguador por 50 ml de cultivo. La ruptura celular se realizó por sonicación utilizando el equipo Ultrasonic-Homogenizer (Cole-Parmer) con 6 pulsos de 30 segundos, con intervalos de reposo de 15 segundos a 4 °C y la fracción soluble e insoluble se separaron por medio de centrifugación (8000 × g durante 30 minutos a 4 °C). Las fracciones fueron analizadas en un gel SDS-PAGE Tricina al 15%.

Para corroborar la presencia de la recombinante en la fracción insoluble, se transfirió un gel SDS-PAGE Tricina al 15 % a membrana de nitrocelulosa para realizar un western blot (WB) anti-Histidinas. La membrana se bloqueó a TA por 2 hrs en presencia de 10 % leche descremada, posteriormente se incubó con el anticuerpo primario anti-Histidinas (Roche, Penzberg, Germany) en presencia de 5 % leche descremada/ 0.05 % PBS-Tween 20 a 4 °C por 18 hrs en agitación. Luego se incubó a TA por 2 hrs en agitación con el anticuerpo secundario, anti-mouse IgG acoplado a peroxidasa de rábano (IgG-HRP) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). La membrana se reveló por quimioluminiscencia (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA).

Solubilización de cuerpos de inclusión

Para solubilizar la fracción insoluble (cuerpos de inclusión), se siguió el protocolo reportado por Cárdenas-Guerra, et al., 2015. La fracción insoluble se resuspendió con 15 ml del amortiguador de lavado frío (2 M Urea, 20 mM Tris-HCl pH 8, 0.5 M NaCl y 2 % Tritón X-100), se sonicó con 4 pulsos de 30 segundos, con 15 segundos de reposo a 4 °C y las muestras se centrifugaron a $8000 \times g$ por 10 min a 4 °C, estos pasos de lavado se repitieron 4 veces. Posteriormente, la pastilla se resuspendió en amortiguador de solubilización (8 M Urea, 20 mM Tris-HCl pH 8, 0.5 M NaCl y 1 mM β -mercaptoetanol) en una relación 5 ml de amortiguador por 100 ml de cultivo y se dejó incubando en agitación inclinada a 37 °C por 18 hrs. Finalmente, se centrifugó a $8000 \times g$ a 4 °C por 20 min y el sobrenadante (los cuerpos de inclusión solubilizados) se analizó en un gel SDS/PAGE-Tricina al 15 %.

Purificación y replegamiento de rDef1.3

La proteína recombinante (rDef1.3) se purificó mediante cromatografía de afinidad a Níquel con columnas Ácido Níquel-Nitrilotriacético-Agarosa (Ni-NTA) de QiaGen (Hilden, Germany) cuyo principio es la interacción del tag de Histidinas de la proteína recombinante con cationes divalentes del Níquel que se encuentran en la resina. Primeramente, la columna precargada con 1 ml de resina, se equilibra con 2 ml de amortiguador de solubilización (previamente descrito), se adiciona 1.5 ml de los cuerpos de inclusión solubilizados y posteriormente se adicionan 3 ml de amortiguador de lavado (100 mM Na_2PO_4 , 10 mM Tris-HCl pH 6.3, 4 M de Urea y 40 mM Imidazol) para eliminar proteínas unidas inespecíficamente. La proteína se eluyó con 1.6 ml de amortiguador de elución (20 mM Na_2PO_4 pH 8, 0.5 M NaCl, 4 M de Urea y 500 mM Imidazol). La pureza de fracciones recolectadas se analizó por geles SDS/PAGE-Tricina al 15 %. Se realizó un análisis de densitometría para determinar el rendimiento de la purificación.

Con el objetivo de eliminar el agente desnaturante, 1.2 ml de rDef1.3 purificada se dializó con membrana de corte 15000 Da (Spectrum™ Labs Spectra/Por™) en 250 ml de PBS estéril a 4 °C por 18 hrs con dos recambios. Debido a que durante este proceso una gran parte de la rDef1.3 se precipitó, fue necesario centrifugar a $8000 \times g$, 4 °C por 3 min para eliminar el precipitado y se analizó que cantidad de proteína se recuperaba bajo estas condiciones. Para lo cual, el sobrenadante se cuantificó en un NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Para concentrar la rDef1.3, se utilizaron columnas Amicon-Ultra 0.5 ml filtros de centrifugado (Merck) con punto de corte 3 K. El producto de diálisis se concentró de 2-4 veces, dependiendo de la concentración deseada. Inmediatamente después de obtener el péptido concentrado, este se cuantificó otra vez en NanoDrop 1000, se le determinó como rDef1.3 y se utilizó para evaluar su efecto contra bacterias y parásitos.

Análisis de rDefl.3 por espectrometría de masas

El análisis se realizó en el Laboratorio Nacional de Servicios Experimentales (LaNSE), Unidad de Genómica, Proteómica y Metabolómica del CINVESTAV, Unidad Zacatenco. Se envió una muestra de rDefl.3 proveniente de un gel SDS-PAGE-Tricina al 15 %, la cual fue enzimáticamente digerida con tripsina de acuerdo con el protocolo modificado de Shevchenko, et al. 2006. Los péptidos resultantes fueron cargados en una columna trampa Symmetry C18 Trap V/M (Waters, Milford, MA) usando una fase móvil A, 0.1% ácido fórmico (FA) en H₂O y una fase móvil B, 0.1% FA en acetonitrilo (ACN). Posteriormente, los péptidos fueron separados en una columna C18 HSS T3 (Waters, Milford, MA); usando un UPLC ACQUITY M-Class (Waters, Milford, MA), con un flujo de 400 nL min⁻¹ y 45 °C. Los espectros fueron adquiridos en un espectrómetro de masas con ionización por aspersión eléctrica y separación por movilidad iónica Synpat G2-Si (Waters, Milford, MA) usando adquisición de datos independientes (DIA) en el modo HDMSE (Waters, Milford, MA). Los archivos .raw generados que contenían los espectros de MS y MS/MS fueron deconvolucionados y comparados usando el software ProteinLynx Global SERVER (PLGS) v3.0.32 (Waters, Milford, MA) contra una base de datos reversa en formato .fasta de *Homo sapiens*, *Rhodnius prolixus* y defensinas de *Triatoma (Meccus) pallidipennis*.

VI.9. Evaluación de la actividad de rDefl.3 sobre bacterias y tripanosomátidos

Actividad antibiótica

Para la determinación de actividad bactericida se utilizó la técnica Kirby-Bauer (difusión de disco en agar), para lo cual se utilizaron las cepas *M. luteus*, *L. innocua* y *E. coli*. Las cepas utilizadas para los ensayos de antibiosis fueron reactivadas a partir de los viales de preservación en caldo nutritivo a 37 °C durante 18 hrs y 180 rpm, posteriormente se pasaron a medio sólido (agar nutritivo). Se tomaron 3-4 colonias y se crecieron en 5 ml LB líquido, hasta llegar a una turbidez comparable a la solución de Mc Farland 0.5. Se tomaron 10 µl del inóculo bacteriano preparado y se sembraron sobre una placa de LB-agar para obtener un crecimiento confluyente, esta se estrió con ayuda de un asa bacteriológica en forma paralela y bien compacta abarcando toda la superficie de la misma. Luego se repitió el procedimiento rotando la placa 60 ° en dos oportunidades más y se dejó secar 3 a 5 min antes de colocar los discos. Las muestras se colocaron sobre sensidiscos de papel filtro, a cada sensidisco se le agregó un volumen de 25 µl de la rDefl.3 disuelta en PBS, las concentraciones usadas fueron 25 µg y 100 µg. Una vez agregada la solución, los sensidiscos se dejaron secar a TA, una vez secos se colocaron sobre la superficie de agar solidificado. Las cajas de LB-agar se dejaron en incubación a 37 °C por 18 hrs y posteriormente se midieron los halos de inhibición. Como control positivo se utilizó 3 µg de Ampicilina y como control de vehículo PBS estéril.

Alteración morfológica de tripanosomátidos

Para la evaluación de este parámetro, se utilizaron 2×10^5 epimastigotes de *T. cruzi* (cepa Qro) incubados con diferentes concentraciones de rDef1.3 (5.2, 10.5, 21, 42 y 84 μM). Los epimastigotes de *T. rangeli* y promastigotes de *L. major* y *L. mexicana* se incubaron en presencia de 84 μM , como grupo control se incubó la misma cantidad de parásitos con PBS estéril, el tiempo de incubación fue de 4 hrs a 28 °C. Transcurrido el tiempo de incubación, los parásitos se centrifugaron a $3100 \times g$ por 5 min a 4 °C, el paquete celular se lavó dos veces y se resuspendió en 100 μl de PBS estéril.

Para las preparaciones permanentes, del volumen de 100 μl de PBS con parásitos, se tomaron 10 μl y se colocaron sobre pozos de portaobjetos *Teflon printed slides* (Electron Microscopy Science) de 21 pozos, permitiendo que las células se pudieran adherir a los pozos y se dejaron a TA durante 20 minutos. Los parásitos adheridos se fijaron con metanol absoluto durante 6 minutos y se tiñeron con el colorante Giemsa (Sigma Aldrich) por 30 minutos. Posteriormente, se lavaron y se montaron con la resina *Organo/Limonene Mount* (Santa Cruz, Biotechnology), colocando un cubreobjetos encima. Se contaron 300 parásitos por condición y de esas células se contabilizaron los parásitos con morfología alterada (parásitos con acortamiento de flagelo y redondeados).

Para analizar la actividad sinérgica de rDef1.3 con peróxido de Hidrógeno (H_2O_2), se probó la concentración de 21 μM de rDef1.3 con 1.5, 3, 10, 20 y 40 μM de H_2O_2 sobre 2×10^5 de epimastigotes de *T. cruzi*. La incubación de los parásitos se realizó por 2, 4 y 8 hrs a 28 °C, como grupo control se incubó la misma cantidad de parásitos en PBS estéril en presencia de las diferentes concentraciones de H_2O_2 . Transcurrido el tiempo de incubación, los parásitos se centrifugaron a $3100 \times g$ por 5 min a 4 °C, el paquete celular se lavó 2 veces y se resuspendió en 100 μl de PBS estéril. Los parásitos se fijaron en preparaciones permanentes y el conteo de parásitos se realizó como previamente se describió. Este análisis se realizó por triplicado.

Curva de recuperación de *T. cruzi*

Para evaluar la recuperación de los parásitos post tratamiento con la rDef1.3, 5×10^5 epimastigotes de *T. cruzi* o promastigotes de *L. major* se incubaron a 28 °C por 4 hrs con 84 μM de rDef1.3. Transcurrido el tiempo de incubación, los parásitos se lavaron dos veces con PBS estéril como se mencionó antes y finalmente el paquete celular se resuspendió en medio LIT pH 7.2 suplementado (*T. cruzi*) o medio M199 suplementado (*L. major*). Posteriormente, los parásitos se incubaron a 28 °C por 8 días y se realizó el conteo de células cada dos días, con ayuda de la cámara Neubauer y observación al microscopio óptico (Zeiss).

Viabilidad de parásitos

La viabilidad de los parásitos se determinó utilizando el kit LIVE/DEAD (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA). Se utilizaron 2×10^6 epimastigotes (*T. cruzi*) o promastigotes (*L. major*) incubados en presencia o ausencia de rDef1.3 (21, 42 y 84 μM) por 4 hrs, transcurrido el tiempo de incubación, los parásitos se centrifugaron a $3000 \times g$ por 10 min a 4 °C, se lavaron con PBS y se centrifugaron nuevamente a $3000 \times g$ a 4 °C por 10 min, se descartó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en 498 μl de PBS, se añadió 2 μl de una solución de trabajo de tinción de 50 μM Calceína (C-AM) (Invitrogen) y 2 mM de Homodímero de Etidio (EthD-1). Los tubos se incubaron en obscuridad total a 28 °C por 45 min y se centrifugaron a $3000 \times g$, se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 0.5 ml de PBS frío en tubos para Facscalibur (Falcon, num. Cat. 352003). Finalmente, las muestras se analizaron por citometría de flujo (BD FACSCalibur) y se leyeron con el filtro de 530/30-nm (FL1-H) para C-AM (fluorescencia verde: células vivas) y a 670 nm (FL3-H) para EthD-1 (fluorescencia roja: células muertas). Por tratamiento se adquirieron 20 000 eventos, el análisis de datos se realizó con el programa FlowJo 7.3.2. Los resultados se presentaron como el porcentaje de las poblaciones de células muertas y dañadas. La compensación se realizó con parásitos vivos sólo en medio teñidos con C-AM y con parásitos muertos expuestos a calor (55 °C por 10 min) teñidos con EthD-1. Se realizaron dos experimentos independientes por triplicado.

VI.10. Estadística

Los análisis de la expresión de genes en insectos infectados con diferentes patógenos, se analizaron por medio de ANOVA de 2 vías y post prueba de Tukey y Sidak. Los datos obtenidos del efecto de diferentes concentraciones de rDef1.3 sobre los parásitos, así como la tasa relativa de crecimiento entre parásitos tratados y no tratados con rDef1.3 se analizaron por medio de ANOVA de 2-vías y con el análisis de múltiple comparación Sidak. Los análisis de citometría de flujo se analizaron por medio de ANOVA de una vía y método de Tukey. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software Prism v. 6.01 (GraphPad).

VII. RESULTADOS

VII.1. Caracterización de genes que codifican para defensinas en *T. pallidipennis*

Debido a que el genoma de *T. pallidipennis* aún no está secuenciado, este trabajo comenzó con la búsqueda de genes de defensinas en esta especie mediante la estrategia que se describe a continuación.

Análisis de los genes *def1*, *def3* y *def4* que codifican para defensinas en *T. pallidipennis*

Para identificar si *T. pallidipennis* cuenta con los mismos genes de defensinas reportados en *T. brasiliensis*: *def1*, *def3* y *def4* (Araújo, et al., 2006; Wanick, et al., 2009), se utilizaron las secuencias reportadas en el GenBank con los números de acceso: KF056971.1, FJ655008.1 y FJ655009.1 respectivamente. Así, a partir de las secuencias de *def1*, *def3* y *def4* de *T. brasiliensis*, se diseñaron oligonucleótidos que reconocieran los extremos 5' y 3' para amplificar los genes completos a partir de ADNg de *T. pallidipennis*, desde el ATG hasta el codón de paro. El ADNg fue extraído del contenido abdominal (cuerpo graso y tracto digestivo) de un adulto hembra y los tres productos de PCR obtenidos tuvieron el tamaño esperado de ~400 pb (Fig. 9).

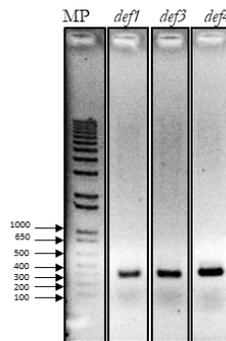


Figura 9. Amplificación de los genes *def1*, *def3* y *def4* a partir de ADNg de *T. pallidipennis*. A partir de las secuencias de *def1*, *def3* y *def4* de *T. brasiliensis*, se diseñaron oligonucleótidos para amplificar esos genes a partir de ADNg de *T. pallidipennis*. Los tres amplicones tuvieron un tamaño de 400 pb. Gel de agarosa 1.5%

Para obtener los marcos de lectura abierto (*Open Reading Frame*, ORF) de los tres genes (*def1*, *def3* y *def4*) de *T. pallidipennis*, los productos de PCR obtenidos fueron secuenciados. Para ello, se clonaron en el plásmido pJET y se transformaron bacterias *E. coli*. Se seleccionaron 5 colonias por cada gen para obtener su ADN plasmídico, el cual fue enviado a secuenciar. Para el análisis de los ORF de las defensinas, las secuencias obtenidas se alinearon con las secuencias de los genes *def1*, *def3* y *def4* de *T. brasiliensis* utilizando el programa Clustal Omega y mediante este análisis se determinó la posición de los intrones.

La principal diferencia entre las secuencias de *T. pallidipennis* comparadas con las de *T. brasiliensis* se observó en la composición de los intrones. Las 5 secuencias correspondientes a *def1* fueron diferentes, los intrones comienzan en la posición 89 y el tamaño de los intrones oscila entre los 97 y 112 pb (Apéndice 1A). En el

caso de las 5 secuencias de las clonas obtenidas con oligos para *def3*, dos presentaron la misma secuencia (*def3.1* y *def3.4*) y la posición de los intrones es la misma en las 5 secuencias, los cuales comienzan en la posición 89 y terminan en la 186 con un tamaño de 97 pb (Apéndice 1B). De las secuencias de *def4*, tres son idénticas (*def4.1*, *def4.2* y *def4.4*), en todas las secuencias los intrones comienzan en la posición 89 y terminan en la 196, teniendo un tamaño de 106 pb (Apéndice 1C). Dado que de las clonas secuenciadas algunas presentaron la misma secuencia, al final se obtuvieron 12 genes diferentes codificantes para defensinas, los cuales se subieron a la base de datos GenBank, con los siguientes números de acceso: *def1.1* (MH000324), *def1.2* (MH000325), *def4.1* (MH000326), *def4.2* (MH000327), *def4.3* (MH000328), *def4.4* (MH000329), *def4.5* (MH000330), *def4.6* (MH0003319), *def4.7* (MH000332), *def4.8* (MH000333), *def4.9* (MH000334) y *def4.10* (MH000335). La nomenclatura corresponde a dos tipos de defensinas: defensinas tipo 1 y tipo 4. Esta nomenclatura se generó con base al análisis filogenético y comparativo que mas adelante se explicará.

Análisis de las 12 defensinas a nivel de proteína

Una vez identificada la ubicación de los intrones en las 12 secuencias, éstos se eliminaron para hacer la traducción de nucleótidos a aminoácidos (aa), utilizando la plataforma ExPASy. Una vez que se obtuvieron las secuencias a nivel de aa, se utilizaron diferentes softwares para identificar las tres regiones características de las defensinas precursoras (péptido señal, propéptido y péptido maduro). De las 12 secuencias, 10 tienen un tamaño de 93 aa y dos (Def1.1 y Def1.2) de 94 aa, debido a que tienen una Glutamina (Q) extra en la región del propéptido. El péptido señal (MKCALSLVTLFLVAALAYS) es el mismo en 8 de las 9 secuencias, la que no es igual (Def1.1) tiene una Alanina (A) en lugar de una Valina (V). La región correspondiente al propéptido fue variable, en total se obtuvieron 9 propéptidos diferentes ya que las secuencias de Def4.1, 4.7, 4.8 y 4.10 a nivel proteína son la misma. Sin embargo, todas las secuencias presentan el sitio de corte Lisina-Arginina (KR) que funciona para la escisión del péptido maduro (Fig. 10). Al analizar la identidad la región del péptido maduro, de las 9 secuencias diferentes obtenidas, éstas corresponden a tres defensinas maduras diferentes, y dado que la especie de estudio es *T. pallidipennis* la nomenclatura establecida para estos péptidos fue “TpDef”, denominando a los 3 péptidos maduros como: TpDef1.1, TpDef1.2 y TpDef4. Como se puede observar en la Figura 10, del total de 9 secuencias, 7 presentan el mismo péptido maduro correspondiente al grupo de las defensinas tipo 4. Las 6 cisteínas (C) características de las defensinas se identificaron en todas las secuencias.

	Péptido señal	Pro-péptido	Péptido maduro	
AXY04217.1	MKCALSLATLFLVAALAYS	YPAELAQQE	LDVAVWEQPTGEIIEEHGARQ	Tipo 1
AXY04218.1	MKCALSLVTLFLVAALAYS	YPAELAQQE	LDVAVWEQPAGEIIEEHGARQ	
AXY04219.1	MKCALSLVTLFLVAALAYS	HPTEWTQQQLDEALWE	-PAGEVTEQHVARLKRATCDLFSFQSKWVTPNHAACA	Tipo 4
AXY04220.1	MKCALSLVTLFLVAALAYS	QPAEWTQQQLDEALWE	-PAGEVTEEHVARLKRATCDLFSFQSKWVTPNHAACA	
AXY04221.1	MKCALSLVTLFLVAALAYS	HAAEWTQQQLDEALWE	-PAGEVTEEHVARLKRATCDLFSFQSKWVTPNHAACA	
AXY04222.1	MKCALSLVTLFLVAALAYS	HPAEWTQQQLDEALWE	-PAGEVTEEHVARLKRATCDLFSFQSKWVTPNHAACA	
AXY04223.1	MKCALSLVTLFLVAALAYS	QPAEWTQQQLDEASWE	-PAGEVTEEHVARLKRATCDLFSFQSKWVTPNHAACA	
AXY04224.1	MKCALSLVTLFLVAALAYS	QPAEWTQQQLDEALWE	-PAGEVTEEHVARLKRATCDLFSFQSKWVTPNHAACA	
AXY04227.1	MKCALSLVTLFLVAALAYS	HPTEWTQQQLDEALWV	-PAGEVTEEHVARLKRATCDLFSFQSKWVTPNHAACA	
	*****	*****	*****	*****

Figura 10. Análisis de secuencias de defensinas precursoras presentes en *T. pallidipennis*. Las defensinas, están compuestas por tres regiones: péptido señal, pro-péptido y péptido maduro. El péptido señal es el mismo en 8 secuencias y tiene un tamaño de 19 residuos de aminoácidos. El pro-péptido (marcado en gris) es la región más variable y termina con el sitio de corte (KR), el cual es el sitio de corte para liberar al péptido maduro al espacio extracelular. Únicamente se obtuvieron tres péptidos maduros, dos correspondientes a defensinas tipo 1 (Def1.1 y Def1.2) y las 7 restantes corresponden a defensinas tipo 4. Los aminoácidos idénticos entre las secuencias están indicados por asteriscos (*), los (.) indican aa fuertemente conservados y (.) aa débilmente.

Para mostrar las diferencias entre las tres defensinas maduras de *T. pallidipennis* con respecto a defensinas de triatominos sudamericanos, se realizó un alineamiento múltiple de TpDef1.1, TpDef1.2 y TpDef4 con 25 defensinas de otras especies de triatominos, como grupo externo se utilizó una defensina de *Aedes aegypti* (Fig. 11). El alineamiento muestra la posición altamente conservada de las 6 cisteínas (C) y 4 secuencias conservadas en todas las defensinas de triatominos: la secuencia inicial ATCDL localizada en una de las β -láminas, CAAHC que compone la α -hélice, GNRGG ubicado antes de la C_4 y CHCRK ubicado en otra β -lámina. El tamaño en todas las secuencias es de 43 aa, con excepción de la defensina del grupo externo (*A. aegypti*) que es más pequeña por 3 aa, sin embargo, la posición de las C es igual a la de los insectos triatominos. Interesantemente la TpDef4 es igual a las def4 de *T. brasiliensis*, *T. b. macromelasoma*, *T. juazeirensis*, *T. sherlocki* y *T. melanica*; por el contrario, las TpDef1.1 y TpDef1.2 son diferentes al menos en un residuo de aa con respecto a las defensinas tipo 1 de otros triatominos.



Figura 11. Análisis de tres defensinas de *T. pallidipennis* con defensinas de triatomíneos sudamericanos. Se alinearon 25 secuencias de defensinas reportadas en otras especies de triatomíneos y en rojo se marcan las tres defensinas de *T. pallidipennis*. Todas las secuencias muestran las 6 cisteínas conservadas en el mismo lugar, marcadas en gris. Los aminoácidos idénticos entre las secuencias están indicados por asteriscos (*), los (:) indican aa fuertemente conservados y (.) aa débilmente conservados. Como grupo externo se utilizó una defensina de *A. aegypti*.

Análisis filogenético de 12 genes de defensinas presentes en *T. pallidipennis*

Para establecer la filogenia de los 12 genes de defensinas presentes en *T. pallidipennis*, se realizaron dos tipos de análisis filogenéticos Máxima verosimilitud (MV) y el método probabilístico de inferencia Bayesiana (IB). Los árboles generados por MV (Fig. 12-A) e IB (Fig. 12-B) presentan gran identidad en topología, ya que todas las secuencias correspondientes a defensinas tipo 1 se agrupan dentro del mismo clado, mientras que las 10 secuencias de defensinas tipo 4 se agrupan en un clado diferente y resalta que se agrupan con las defensinas de *R. prolixus*. En ambos análisis, las secuencias de defensinas tipo 1 provenientes de *T. pallidipennis* (*def1.1* y *def1.2*) muestran una clara diferencia en comparación con las defensinas tipo 1 de triatomíneos sudamericanos, las cuales forman un subgrupo con un alto porcentaje de soporte estadístico. Estos resultados indican que ambos métodos muestran a las defensinas de insectos triatomíneos como un grupo monofilético con un soporte estadístico alto. También corroboraron la clasificación que previamente ya se había dado en el alineamiento de las 12 proteínas, donde denominados dos defensinas tipo 1 como TpDef1.1 y TpDef1.2, y las demás secuencias como TpDef4.

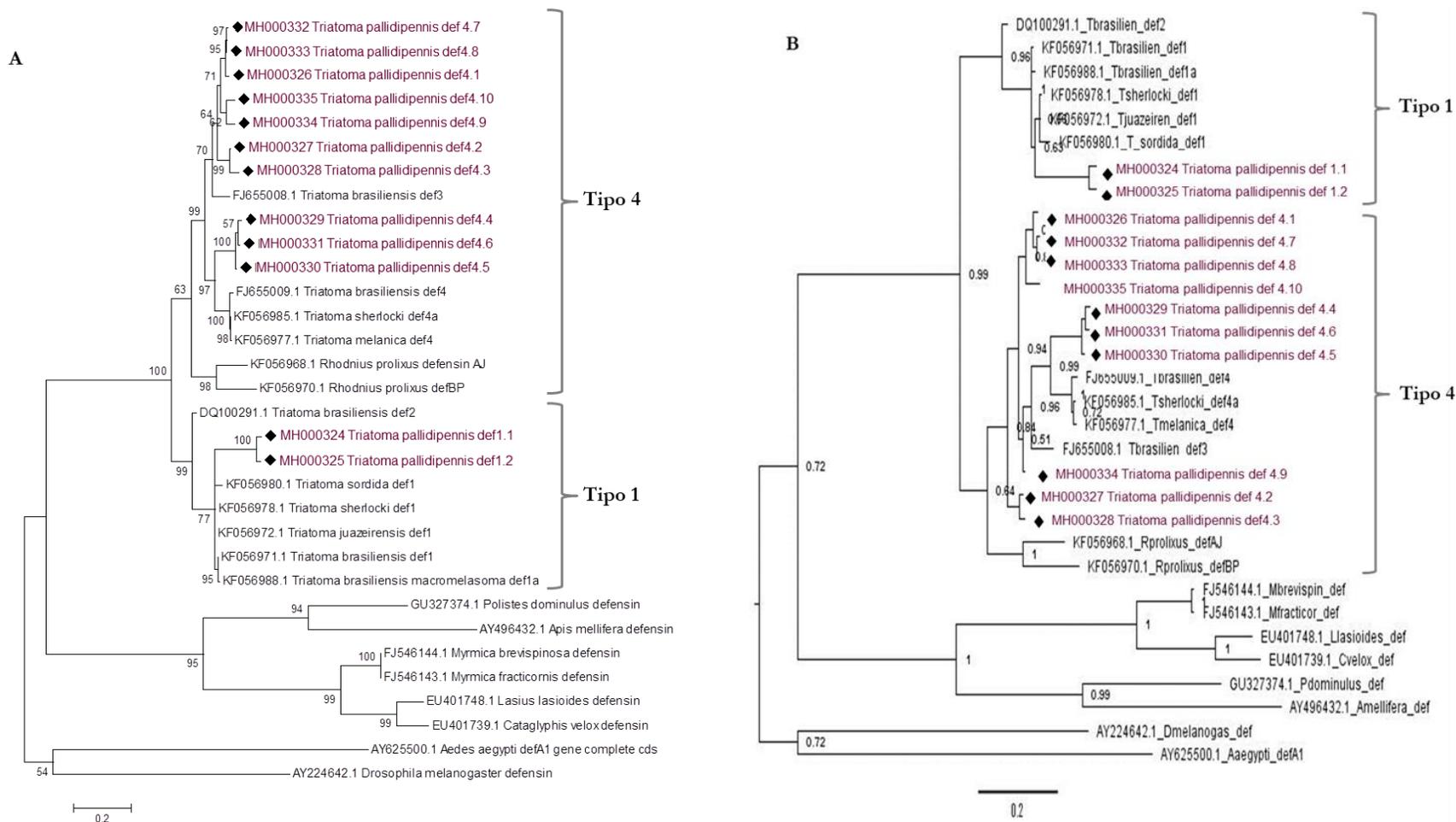


Figura 12. Análisis filogenético de genes de defensinas de *T. pallidipennis*. **A)** Árbol filogenético máxima verosimilitud, la historia evolutiva de las defensinas se infirió por el método de máxima verosimilitud, basado en el modelo de Tamura 3-parametros, el modelo de la tasa de variación permitió que algunos sitios fueran evolutivamente invariables. Hubo un total de 465 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se realizaron en el programa MEGA6. **B)** Árbol filogenético bayesiano, la relación filogenética se estableció utilizando el software Mr. Bayes. Los valores de los nodos se obtuvieron de 1,000,000 generaciones y se muestran junto a las ramas. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el modelo de sustitución GTR con tasa de distribución gamma entre sitios y una proporción de sitios invariables. El análisis incluyó 32 secuencias de nucleótidos y un total de 465 posiciones en el conjunto de datos final (incluyendo gaps). Desviación estándar de frecuencias divididas = 0.0091. En ambos árboles se indican los clados separados correspondientes a defensinas tipo 1 y tipo 4, y las secuencias de *T. pallidipennis* se muestran en violeta y con el símbolo ◆.

Análisis estructural de las defensinas TpDef1.1, TpDef1.2 y TpDef4

Se realizó un alineamiento de las tres defensinas maduras de *T. pallidipennis* (TpDefs) y como previamente ya se había mostrado TpDef1.1 y TpDef1.2 difirieron únicamente en dos residuos de aminoácidos: en el loop Alanina (A) cambia a Treonina (T) y en la hélice Fenilalanina (F) cambia por Leucina (L). En cambio, TpDef4 tiene 8 residuos de aminoácidos diferentes con respecto a las dos TpDefs tipo 1 (Fig. 13).

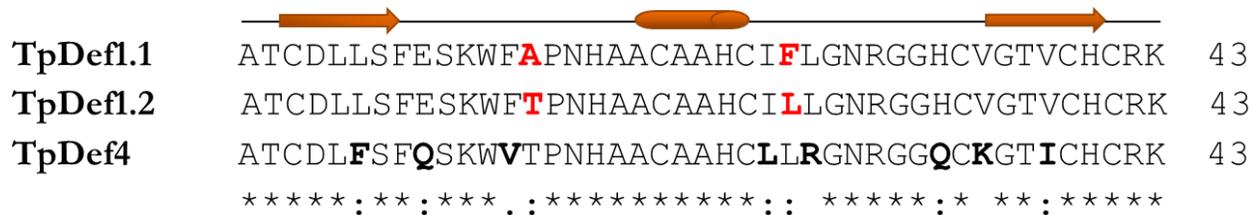


Figura 13. Análisis de las secuencias de TpDef1.1, TpDef1.2 y TpDef4. Alineamiento de aminoácidos de los tres péptidos maduros teóricos presentes en *T. pallidipennis*. En rojo se marcan los aminoácidos diferentes entre TpDef1.1 y 1.2 y en negritas se marcan 8 aminoácidos diferentes en TpDef4 con respecto a las dos TpDefs tipo 1. Los aminoácidos idénticos entre las secuencias están indicados por asteriscos (*), los (:) indican aa fuertemente conservados y (.) aa débilmente conservados.

Para determinar si estas diferencias en aminoácidos alteraban la conformación final de las defensinas, se generó el modelaje molecular de las tres TpDefs, las cuales presentan la misma estructura terciaria: una α -hélice seguida de dos β -láminas antiparalelas, estabilizadas por los tres puentes disulfuro, dando como resultado el motivo típico de las defensinas de invertebrados CS $\alpha\beta$. Al hacer el solapamiento de los tres modelos observamos que la región del loop es diferente pero la conformación final de las moléculas no cambia (Fig. 14).

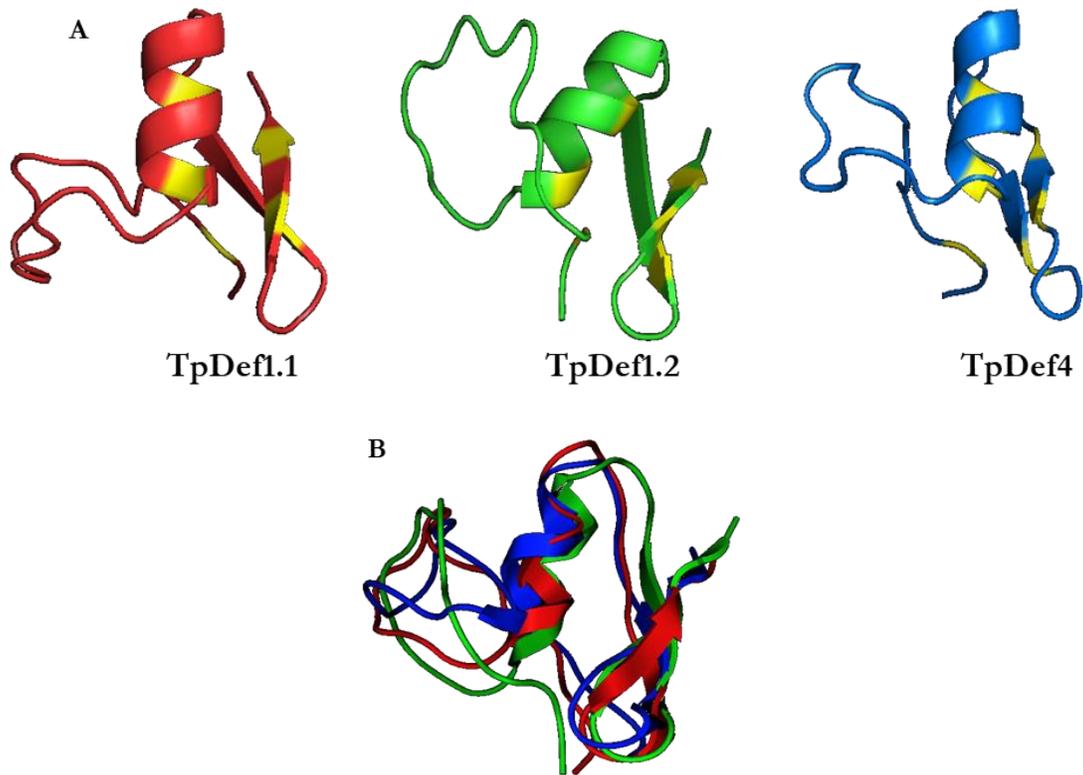


Figura 14. Modelaje por homología de las tres TpDefs teóricas. A) Los tres modelos muestran la misma estructura molecular que da como resultado un motivo CS $\alpha\beta$. **B)** El sobrelapamiento de los tres modelos muestra que el cambio en aminoácidos no altera la estructura final. En los modelos, las 6 cisteínas están marcadas en amarillo. El modelaje estructural de las defensinas se realizó con el software I-TASSER.

VII.2. Análisis de la expresión de defensinas en *T. pallidipennis*

Se continuó con el análisis de la expresión de los ARN mensajeros (ARNm) de las tres isoformas previamente identificadas *def1.1*, *def1.2* y se seleccionó solo un gen como representante de las secuencias identificadas como defensinas tipo 4, el gen *def4.6*. La expresión de los ARNm se analizó bajo diferentes condiciones. Para este análisis se diseñaron oligonucleótidos que amplificaran desde la región del propéptido hasta el péptido maduro.

Evaluación de la expresión de *def1.1*, *def1.2* y *def4.6* en hembras y machos de *T. pallidipennis*

Para conocer la expresión de *def1.1*, *def1.2* y *def4.6* en el contenido abdominal (tracto digestivo, cuerpo graso y túbulos de Malpighi) en estado basal de hembras y machos de *T. pallidipennis*, se realizó RT-PCR cuantitativo de 6 individuos: tres hembras y tres machos. El análisis se enfocó en la detección del Ct (ciclo de umbral) del ya que es una forma de extrapolar la cantidad de ARNm, mientras más bajo sea el Ct indica una mayor expresión del gen y, por el contrario, mientras más alto sea el Ct, indica que hay una expresión menor del gen. Como se puede observar en la gráfica de la Fig. 15, con respecto al gen constitutivo actina (*Act*), las defensinas

tipo 1 (*def1.1* y *def1.2*) presentan un Ct menor tanto en hembras como en machos, el cual se encuentra entre Ct 13 y 15 para ambos genes, sin embargo, no se observa una diferencia significativa entre ambos sexos. Por el contrario, *def4.6* tiene un Ct más alto (23) tanto para hembras como para machos y tampoco se observa una diferencia significativa entre sexos. Estos resultados indican que existe una mayor cantidad de ARNm para defensinas tipo 1 que para defensinas tipo 4 en adultos de *T. pallidipennis*.

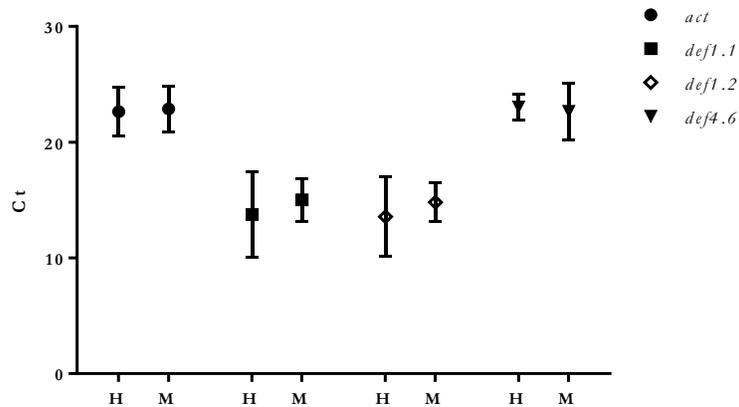


Figura 15. Análisis de los valores del ciclo de umbral (Ct) de los genes de *act*, *def1.1*, *def1.2* y *def4.6* en el contenido abdominal de hembras y machos de *T. pallidipennis*. Se utilizaron 6 adultos de *T. pallidipennis*: tres hembras (H) y tres machos (M). Cada insecto se trató por separado, se les extrajo el contenido abdominal (tracto digestivo, cuerpo graso y túbulos de Malpighi) y se extrajo el ARN para posteriormente realizar la RT-PCR cuantitativo amplificando los genes de interés *def1.1*, *def1.2* y *def4.6*, como gen control se utilizó actina (*act*). Cada punto representa la media \pm SD de los valores Ct.

Expresión de *def1.1*, *def1.2* y *def4.6* en ninfas V estadio infectadas con bacterias

Las defensinas se caracterizan por tener actividad bactericida, principalmente contra bacterias de tipo Gram+. Para identificar si existe una expresión diferencial entre defensinas tipo 1 y tipo 4 de *T. pallidipennis* ante un reto inmunológico con bacterias, se evaluó la expresión de *def1.1*, *def1.2* y *def4.6* en ninfas de V estadio infectadas vía intrahemocélica con tres bacterias: *E. coli*, *L. innocua* y *M. luteus*; como grupo control se inocularon insectos con PBS estéril. Los insectos se disectaron a las 4 hrs post infección y se realizó la RT-PCR cuantitativa. Las infecciones con las bacterias *E. coli* y *M. luteus* dieron como resultado un aumento en la expresión de las tres defensinas con respecto al grupo control, sin embargo, no se observó una expresión diferencial significativa entre defensinas, aunque la desviación estándar es grande, se observó una ligera tendencia en el aumento de *def4.6* solo en aquellos insectos infectados con *L. innocua* (Fig. 16).

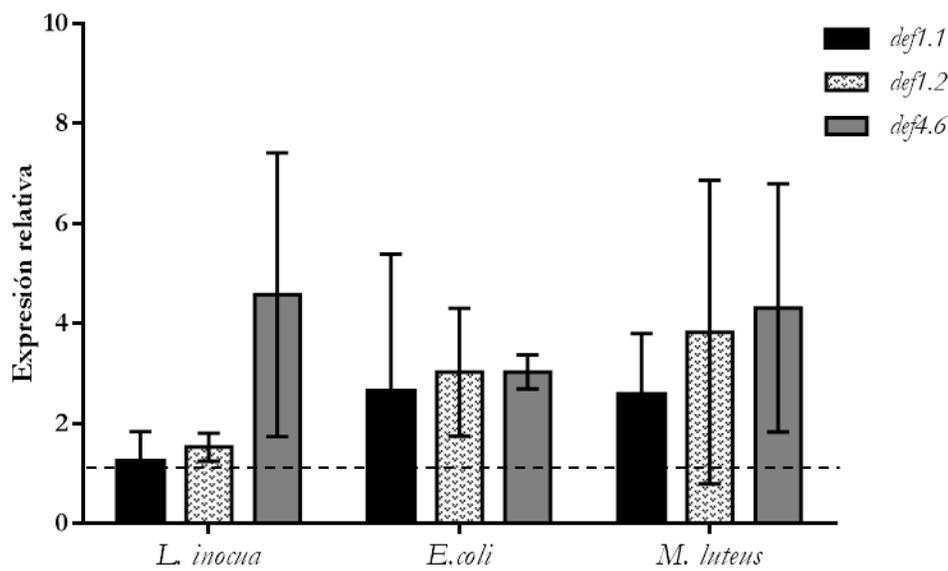


Figura 16. Expresión relativa de *def1.1*, *def1.2* y *def4.6* en ninfas V estadio infectadas con diferentes bacterias. Se infectaron vía intrahemocélica 4 insectos por grupo experimental con las siguientes bacterias: *L. innocua*, *E. coli* y *M. luteus* las cuales se utilizaron en una D.O.₆₀₀ de 1.2. A las 4 hrs post infección se extrajo el contenido abdominal de los insectos (tracto digestivo, cuerpo graso y túbulos de Malpighi) y se extrajo el ARN, a partir de ahí se realizó una RT-PCR cuantitativa para amplificar los genes *def1.1*, *def1.2* y *def4.6*. La expresión relativa de los genes se normalizó con respecto al gen constitutivo (actina) y al grupo control (insectos inoculados con PBS estéril). Se presenta el resultado de dos experimentos independientes. Se realizó una prueba estadística ANOVA de 2 vías y post prueba de Tukey.

Evaluación de la expresión de *def1.1*, *def1.2* y *def4.6* en ninfas V estadio infectadas con *T. cruzi*

Para determinar si la infección con el parásito *T. cruzi* tiene un efecto sobre la expresión de los ARNm de las defensinas *def1.1*, *def1.2* y *def4.6*, se evaluaron ninfas V estadio infectadas vía oral con sangre que contenía la cepa mexicana Ninoa de *T. cruzi* (1.5×10^6 parásitos/ml). Los insectos se sacrificaron en los días 1 y 7 dpi (días seleccionados con base al recorrido que tiene el parásito a lo largo del tracto digestivo de los insectos). En ambos días las defensinas tipo 1 no mostraron un aumento con respecto al grupo control de insectos no infectados y tampoco presentaron una expresión diferencial significativa entre ellas. 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 defensinas tipo 1, en ambos días analizados (Fig. 17).

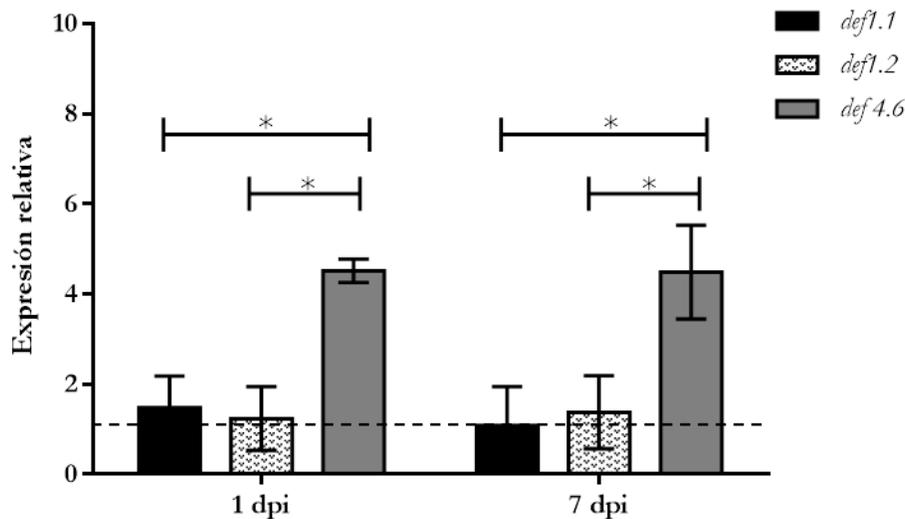


Figura 17. Expresión de *defl.1*, *defl.2* y *def4.6* en ninfas V estadio infectadas con *T. cruzi*. Se infectaron 3 ninfas V estadio con 2×10^6 tripomastigotes sanguíneos. Por individuo se extrajo el contenido abdominal (tracto digestivo y cuerpo graso). La expresión relativa se normalizó con respecto al gen constitutivo (actina) y al grupo control (insectos alimentados con sangre de ratones sin infectar). Resultado de dos experimentos independientes. Una prueba estadística ANOVA de 2 vías y post prueba de Sidak fue aplicada donde $*P < 0.05$.

VII.3. Generación de una defesina tipo 1 recombinante

Por otra parte, cuando se identificaron las tres defensinas maduras (TpDef1.1, TpDef1.2 y TpDef4) de *T. pallidipennis* se iniciaron a la par los experimentos para obtener a las defensinas de manera recombinante y poder determinar su función *in vitro*. Sin embargo, a pesar de las varias estrategias realizadas, probando diferentes plásmidos de expresión, sitios de corte para insertar los genes de interés y cepas *E. coli* para sobre expresar las defensinas (Apéndice 2). Solo se logró obtener de manera recombinante una defensina tipo 1.

Clonación del gen *defl.3* en plásmido de expresión pQE-30

A partir de ADNc de *T. pallidipennis* y utilizando oligonucleótidos reportados para *T. brasiliensis*, se amplificó una defensina tipo 1. El amplicón se secuenció y a partir de la secuencia obtenida se diseñaron nuevos oligonucleótidos para amplificar únicamente la región del péptido maduro y poder secuenciarlo (Apéndice 3). Una vez que se obtuvo la secuencia en nucleótidos correspondiente al péptido maduro de la defensina tipo 1, se realizó un alineamiento para analizar dicha secuencia y compararla con las dos secuencias de defensinas tipo 1 a nivel de péptido maduro (*defl.1* y *defl.2*) previamente identificadas en el genoma de *T. pallidipennis*. Se observó que la secuencia de la defensina recombinante tipo 1 tenía una alta identidad (98.5 %), a nivel de nucleótidos con la *defl.2*, ya que solo difirieron en dos nucleótidos (Fig. 18), los cuales al traducirse a proteína correspondieron a un cambio de aminoácido, una Valina (V) por una Leucina (L), por lo que se decidió

denominar a esta nueva defensina tipo 1 como *def1.3* y a nivel de proteína como TpDef1.3 (Fig. 19), para fines prácticos la defensina recombinante generada a partir de esta secuencia se llamó rDef1.3.

```

def1.2      gggccacttgatctgctcagtttcgaatcaaaatggtttactcctaatcatgcagcct      60
def1.3      gggccacttgatctgctaagtttcgaatcaaaatggtttactcctaatcatgcagcct      60
            *****
def1.2      gtgccgcacattgtatattactgggcaaccgtggcggccactgtgtaggaactgtgtgcc      120
def1.3      gtgccgcacattgtatattactgggcaaccgtggcggccactgtgtaggaactctgtgcc      120
            *****
def1.2      attgcaggaagtga      134
def1.3      attgcaggaagtga      134
            *****

```

Figura 18. Análisis de las regiones de los péptidos maduros de *def1.2* y *def1.3* a nivel nucleótidos. Se presenta un alineamiento en nucleótidos de dos defensinas tipo 1 (*def1.2* y *def1.3*). Los nucleótidos diferentes entre las secuencias se marcan en rojo y los asteriscos (*) indican nucleótidos iguales.

```

TpDef1.1    ATCDLLSFESKWFAPNHAACAAHCIFLGNRGGHCVGTVCHCRK      43
TpDef1.2    ATCDLLSFESKWFTPNHAACAAHCILLGNRGGHCVGTVCHCRK      43
TpDef1.3    ATCDLLSFESKWFTPNHAACAAHCILLGNRGGHCVGTLCHCRK      43
            *****:*****:*****:*****

```

Figura 19. Alineamiento de aminoácidos de tres defensinas maduras tipo 1 presentes en *T. pallidipennis*. Las tres secuencias cuentan con 43 residuos de aminoácidos. Los dos aminoácidos diferentes entre TpDef1.1 y las otras TpDefs se marcan en negritas. La única diferencia entre TpDef1.2 y TpDef1.3 es el cambio de una Valina (V) por Leucina (L) (marcado en rojo). Los asteriscos (*) indican aa iguales, los (:) aa fuertemente conservados.

Para identificar posibles similitudes entre TpDef1.3 con defensinas de otros triatomíneos, se realizó un alineamiento múltiple de aminoácidos. Como ya se había mencionado anteriormente, todas las defensinas maduras de triatomíneos tienen un tamaño de 43 residuos de aminoácidos y la posición de las 6 cisteínas es altamente conservada. Como grupo externo se utilizó una defensina tipo 1 de *Lutzomyia longipalpis* especie de la subfamilia Phlebotominae, que funge como vector de algunas especies de parásitos del género *Leishmania*, esta defensina es más pequeña con respecto a las de insectos triatomíneos (39 residuos de aminoácidos), sin embargo, como se puede observar, las 6 cisteínas también permanecen conservadas (Fig. 20).

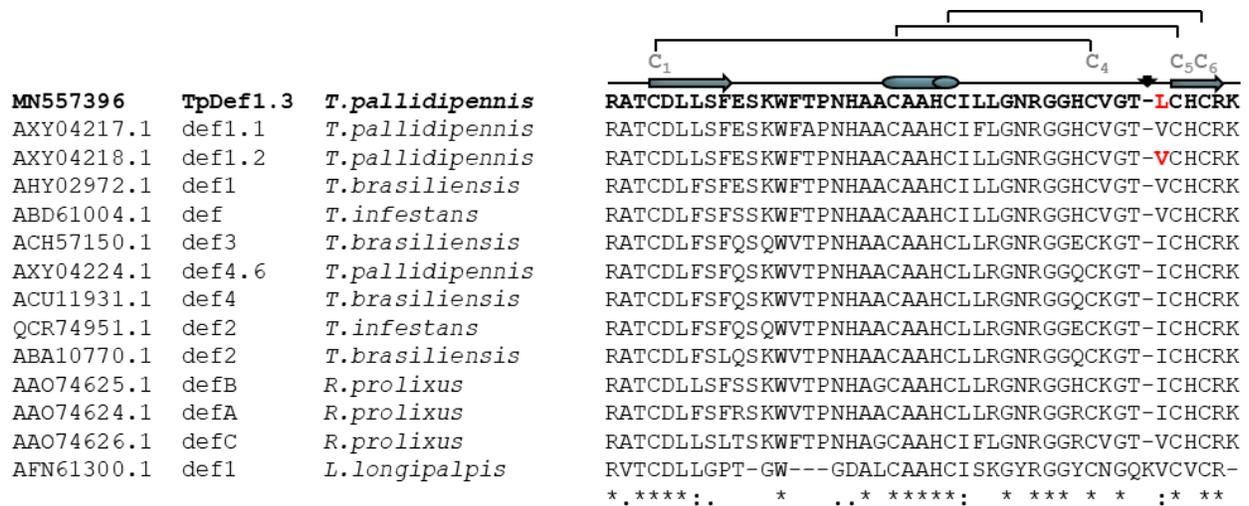


Figura 20. Comparación del alineamiento múltiple de aminoácidos de TpDef1.3 con otras defensinas de triatominos. Todas las secuencias de triatominos tienen un tamaño de 43 residuos de aminoácidos y poseen las 6 cisteínas (C) en el mismo lugar. La defensina del grupo externo *L. longipalpis* es más pequeña, ya que consta de 39 residuos de aminoácidos, sin embargo, la posición de las 6 cisteínas (C) es la misma. En rojo y con una flecha se indica el aminoácido diferente entre TpDef1.2 y rDef1.3. Las flechas en la parte superior indican la posición de las dos β -láminas y el cilindro la α -hélice. Los asteriscos (*) indican aa iguales, los puntos (:) aa fuertemente conservados y (.) aa débilmente conservados.

Una vez que se obtuvo el amplicón para *def1.3*, con un tamaño de 160 pb (con una Arginina extra en la región del péptido maduro), se clonó dentro del plásmido de clonación/expresión pQE-30 entre los sitios de corte *Bam*HI y *Pst*I (Fig. 21). La secuencia obtenida de la clonación corroboró el marco de lectura y que no hubiera mutaciones. La secuencia cuenta con la etiqueta de histidinas (6x-His) en el extremo 5' seguido del sitio de corte de *Bam*HI, el cual codifica para dos aminoácidos (GS), y en el extremo 3' se tienen dos tripletes que codifican para codones de paro. La secuencia traducida a aminoácidos tiene un total de 53 residuos de aminoácidos.

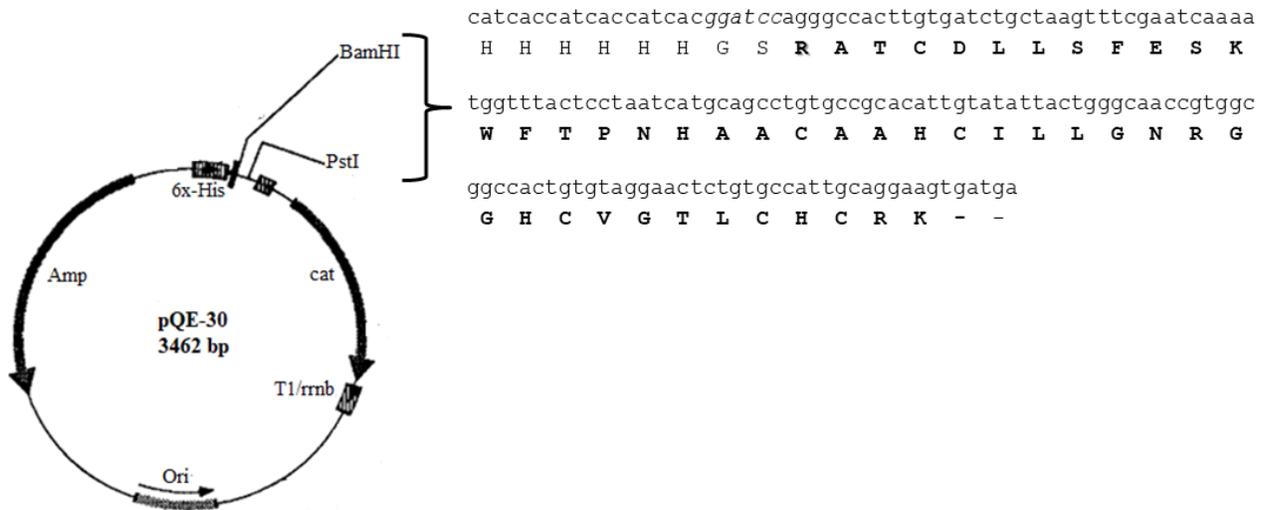


Figura 21. Construcción del vector pQE-30_def1.3. Utilizando los sitios de corte *Bam*HI y *Pst*I del plásmido de clonación/expresión pQE-30, se ligó la secuencia del gen *def1.3*. En el extremo 5' se encuentra la etiqueta de 6x-His, seguida del sitio de corte para *Bam*HI y en el extremo 3' dos tripletes que codifican para codones de paro. En negritas se marca la secuencia traducida a aminoácidos de *def1.3*.

Expresión y purificación de rDef1.3

Células *E. coli*, cepa M15 [pREP4] se transformaron con el plásmido que contenía la secuencia del gen *def1.3* (pQE-30_def1.3) para poder inducir la expresión de la proteína rDef1.3. La inducción se realizó al llegar a una densidad óptica de 0.7 (600 nm) con 1 mM de IPTG, incubando el cultivo a 30 °C por 18 hrs y 180 rpm. La proteína recombinante se observó en el peso esperado de 5.7 kDa (Fig. 22-A, carril 2). Transcurrido el tiempo de inducción, se colectaron las células y se sometieron a un proceso de ruptura para obtener las fracciones soluble e insoluble que se analizaron por medio de geles de SDS/PAGE-Tricina al 15% (Fig. 22-A, carriles 3 y 4). La defensina recombinante se detectó en la fracción insoluble (cuerpos de inclusión) (Fig. 22-A, carril 4), en el peso esperado. Los cuerpos de inclusión se solubilizaron con 8 M de Urea y la proteína de interés se purificó por medio de cromatografía de afinidad a níquel (IMAC-Ni-NTA), la cual se eluyó con 500 mM de Imidazol, la proteína purificada se obtuvo en tres fracciones de elución, siendo la fracción 2 la más enriquecida (Apéndice 4) y con la que se trabajó (Fig. 22-A, carril 5). Para eliminar las altas concentraciones del agente desnaturante y del imidazol, así como para estimular su correcto plegamiento y evaluar su actividad biológica, rDef1.3 purificada se dializó en amortiguador de fosfatos salinos (PBS) (Fig. 22-A, carril 6). Durante el proceso de diálisis una cantidad del péptido se precipitó, por lo cual hubo necesidad de centrifugar la muestra, una vez obtenido el sobrenadante, finalmente la proteína se cuantificó y la cuantificación obtenida fue de ~120 µg/ml lo que corresponde a una molaridad de ~21 µM. Para obtener concentraciones altas de rDef1.3 fue necesario utilizar columnas concentradoras con punto de corte 3 K (Amicon-Ultra 0.5 ml), con lo cual se obtuvo el doble (42 µM) y cuádruple (84 µM) de la concentración original. La presencia de la rDef1.3

se confirmó por medio de western blot con un anticuerpo anti-Histidinas, observándose una banda del peso esperado (Fig. 22-B).

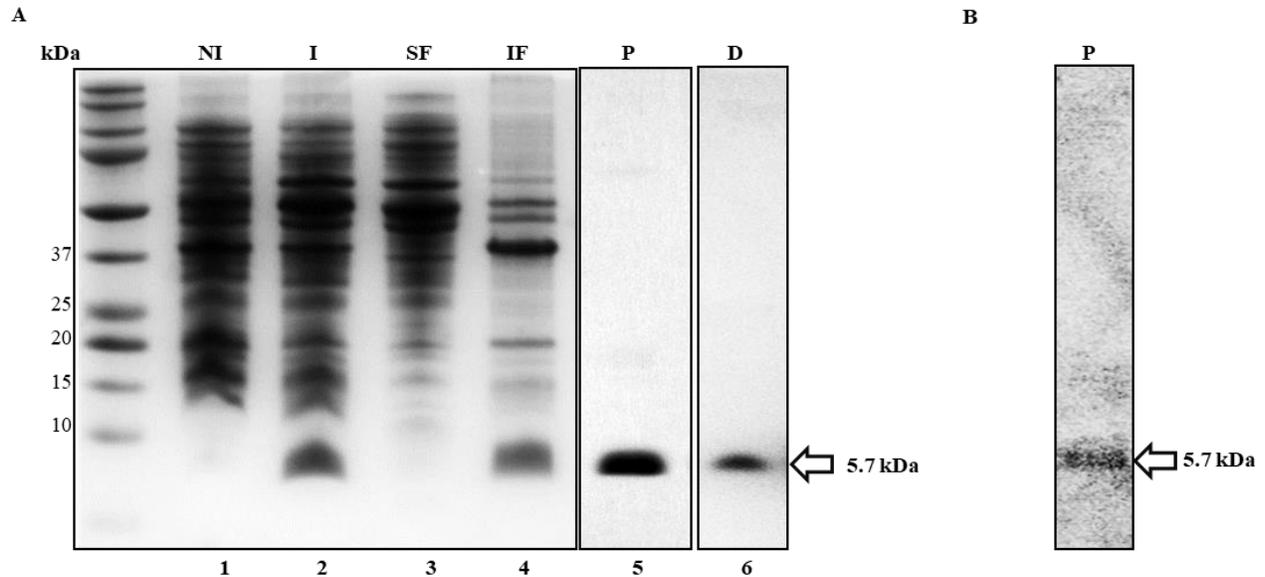


Figura 22. Expresión de la de rDefl.3 obtenida en la fracción insoluble. La rDefl.3 tiene un peso molecular de 5.7 kDa. **A)** Carril 1 corresponde al extracto de bacterias no inducido (NI); carril 2, extracto inducido con 1 mM de IPTG (I); carril 3 fracción soluble (FS); carril 4, fracción insoluble (FI); carril 5, purificación por IMAC-Ni (P) y carril 6, producto de diálisis de la purificación (D). **B)** Western blot utilizando un anticuerpo anti-Histidinas, revelado por quimioluminiscencia.

El rendimiento total que se obtuvo en la producción de rDefl.3 fue de 9 mg por 500 ml de cultivo inicial y en promedio este procedimiento se realizó 5 veces obteniendo los mismos resultados (Tabla 6). Además, bajo nuestras condiciones se determinó que la defensina purificada es estable en concentraciones ≤ 0.5 mg/ml y 4 °C hasta por 2 meses, sin embargo se identificó que una vez que es dializada, ésta pierde su actividad en un lapso de 24 hrs, por lo que es indispensable utilizar rápido la proteína recién sea dializada.

Tabla 6. Rendimiento en la producción de rDefl.3 usando un sistema bacteriano.

Cultivo inicial (ml)	Biomasa húmeda (g)	Cuerpos de Inclusión (g)	rDefl.3 purificada (mg)
500	5	1.6	0.9

Para corroborar la naturaleza de rDefl.3, el péptido se analizó por espectrometría de masas, donde inicialmente se obtuvo un espectro con un pico principal el cual correspondía a un ion mayoritario (m/z 645.29) (Fig. 23A), el cual se fragmentó y se obtuvo un patrón de fragmentación (Fig. 23B). Se determinaron manualmente “de novo” las series iónicas “ γ ” y “b” correspondientes a la secuencia ATCDLLSFESK, la cual al compararse con la base de datos del NCBI, corresponde a un péptido presente en las defensinas tipo 1 de

T. pallidipennis. Usando solo los péptidos con una confiabilidad $\geq 95\%$, la cobertura de secuencia fue del 25% (Tabla 7).

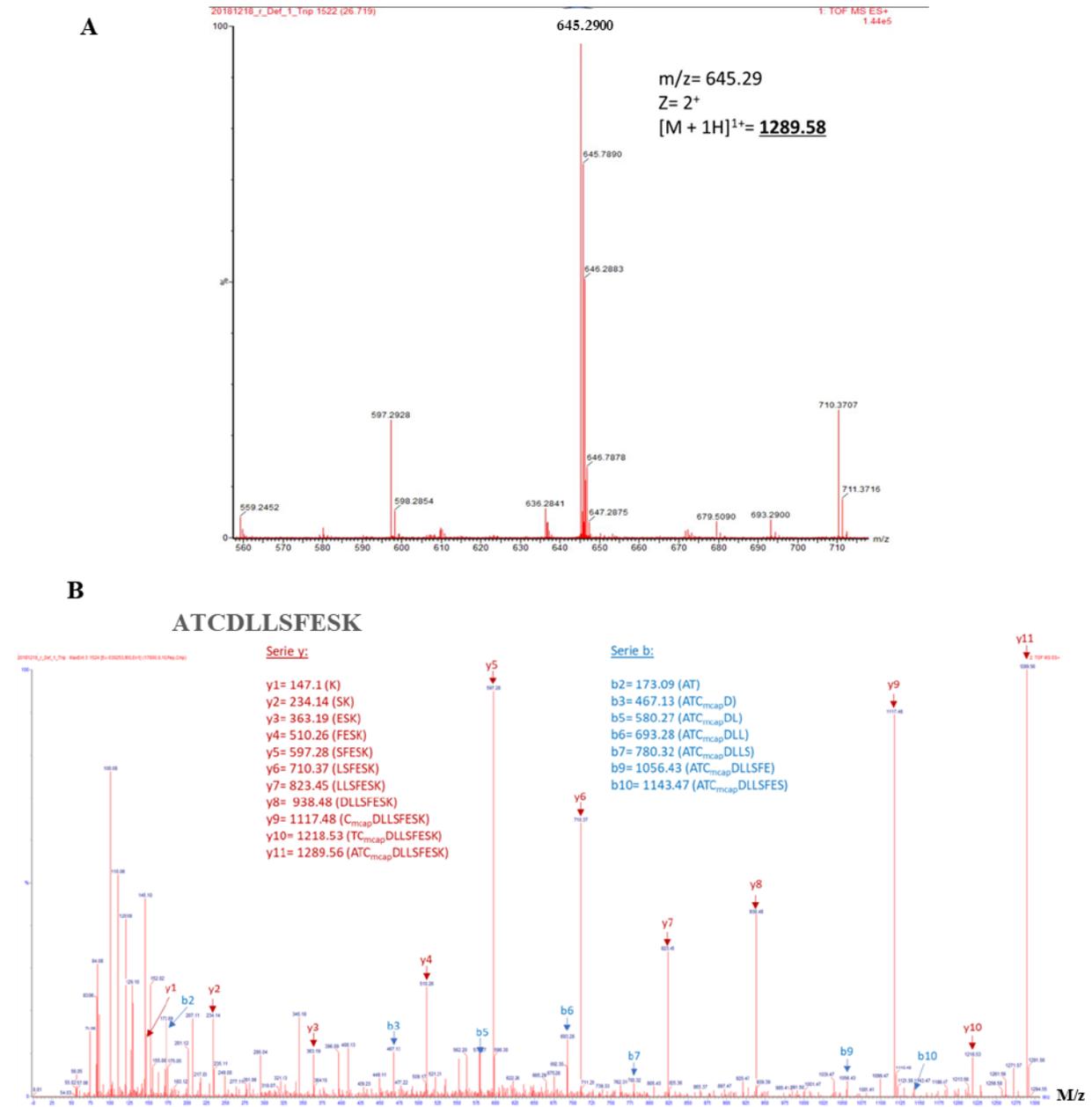


Figura 23. Espectro representativo obtenido a partir de una MS/MS de una muestra de rDef1.3. A) Espectro obtenido inicialmente, el cual muestra un pico principal que corresponde a un ion mayoritario (m/z 645.29) **B)** A partir de una MS/MS de una muestra de rDef1.3 se identificó el péptido ATCDLLSFESK presente en las defensinas tipo 1 de *T. pallidipennis*.

Tabla 7. Caracterización de rDef1.3 por medio de espectrometría de masas.

No. de acceso	Nombre	Peso Molecular (kDa)	Score	Cobertura (%)	Secuencia de péptidos (aa)
MN557396	Def1.3	5.7	1553.646	25	ATC SFESK DLLSFESK

Para corroborar que la etiqueta de 6x-His, así como los aminoácidos extras en la secuencia de la proteína recombinante no modificaban la estructura terciaria típica de una defensina de insecto, se realizó el modelaje molecular por homología de rDef1.3 a partir de la Def-AAA de *Anopheles* y se comparó con el modelo de la TpDef1.2. La única diferencia notoria se observa en la región del loop (Fig. 24).

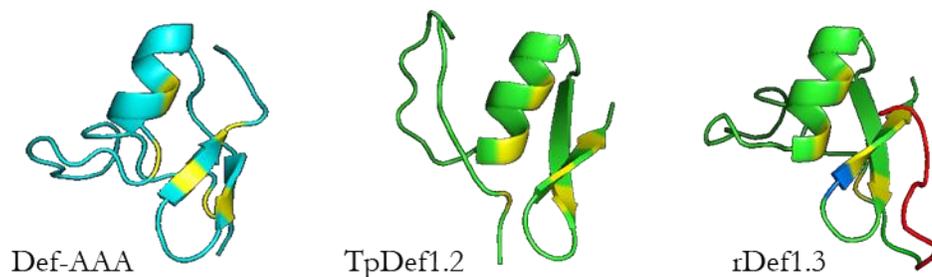


Figura 24. Modelaje por homología de TpDef1.2 y rDef1.3. El modelo por homología se realizó a partir del modelo establecido para la Def-AAA de *Anopheles*, utilizando la plataforma ITASSER. TpDef1.2 y rDef1.3 difieren en un solo aminoácido, ambos modelos muestran la misma estructura terciaria que da como resultado el motivo estructural CS $\alpha\beta$. En amarillo se marcan las 6 Cisteínas que forman los tres puentes disulfuro, en rojo la etiqueta de 6x-His y en azul los dos aminoácidos correspondientes al sitio de corte de *Bam*HI.

Una vez que se obtuvo rDef1.3 purificada y replegada se procedió a realizar los ensayos funcionales *in vitro* para determinar su actividad antimicrobiana contra diferentes bacterias y tripanosomátidos.

VII.4 Evaluación de la actividad de rDef1.3 sobre bacterias y *T. cruzi*

Al evaluar la actividad de rDef1.3 contra diferentes bacterias tanto Gram + como Gram –, en concentraciones de 25 y 100 μg por medio de ensayos de difusión en discos (Kirby-Bauer), no se observó actividad bactericida contra ninguna de las bacterias evaluadas (Apéndice 5).

Evaluación del daño morfológico de la actividad de rDef1.3 contra *T. cruzi*

Se evaluó el efecto de rDef1.3 sobre la morfológica de epimastigotes de *T. cruzi* (cepa Querétaro) a las 4 hrs con diferentes concentraciones de la defensina recombinante (5.2, 10.5, 21, 42 y 84 μM). Para la evaluación de este parámetro, se observaron al microscopio preparaciones permanentes de los parásitos previamente tratados y como grupo control parásitos sin tratamiento, es decir, solo con el vehículo PBS. En la Figura 25-A se muestran micrografías de parásitos tratados con las diferentes concentraciones de rDef1.3, como se puede

observar, el vehículo (PBS) causa un mínimo porcentaje de parásitos con morfología alterada (2.3%), que se puede considerar un límite basal de daño. En cuanto a los parásitos tratados con la rDefl.3, se observa que los parásitos tratados con 5.2 μM no muestran un daño mayor al basal (2.3 %), sin embargo, al aumentar la concentración del péptido recombinante, el número de parásitos con morfología alterada va aumentando, la cual incluye contorsión del cuerpo celular y acortamiento del flagelo, indicando que la rDefl.3 actúa sobre los parásitos de forma dosis-dependiente. A 10.5 μM se observó 6.6 % de parásitos dañados, a 21 μM se encontró un 16.3 % y el mayor efecto se observó a 42 μM (26.6 %), en la concentración más alta utilizada (84 μM) no se observó un aumento significativo de daño con respecto a 42 μM (Fig. 25-B).

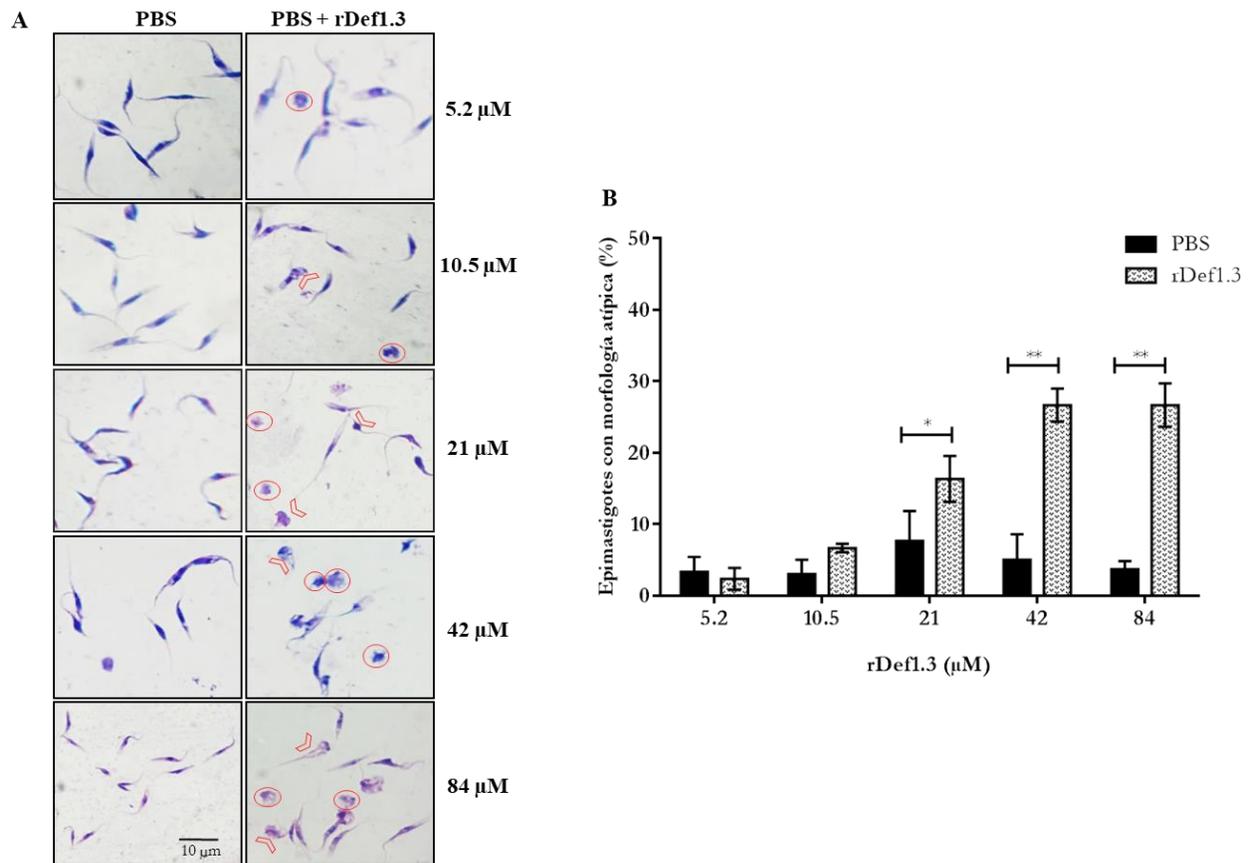


Figura 25. Evaluación del efecto de diferentes concentraciones de rDefl.3 sobre la morfología de epimastigotes de *T. cruzi* (cepa Qro). La rDefl.3 alteró la morfología de los parásitos en una forma concentración dependiente. **A)** Micrografías de epimastigotes tratados con 5.2, 10.5, 21, 42 y 84 μM de rDefl.3. Los parásitos expuestos a la defensina recombinante presentan una morfología redondeada (puntas de flecha roja) y algunos no presentan flagelo (círculo rojo). Los parásitos se tiñeron con el colorante Giemsa. **B)** Porcentajes de parásitos tratados con diferentes concentraciones de rDefl.3 que presentaron morfología alterada, a partir de 21 μM se tiene una diferencia significativa con respecto a los parásitos control, el mayor porcentaje se tiene a 42 μM . Se realizaron tres experimentos independientes. Una prueba estadística ANOVA de 2 vías y post prueba de Sidak fue aplicada donde, * $P < 0.01$ y ** $P < 0.0001$.

Dado que en insectos se ha reportado que las defensinas trabajan en sinergia con otras moléculas efectoras del sistema inmunológico, se comenzó analizando el daño morfológico a epimastigotes de *T. cruzi* utilizando la concentración de 21 μM de rDef1.3 en conjunto con diferentes concentraciones de H_2O_2 (1.5, 3, 10, 20 y 40 μM) y a diferentes tiempos de incubación (2, 4 y 8 hrs). No se observó una diferencia significativa al incubar los parásitos en presencia de la rDef1.3 en adición con las diferentes concentraciones de H_2O_2 , tampoco se observó un aumento entre 4 y 8 hrs (Apéndice 6). Estos resultados sirvieron como antecedente para determinar que los parásitos se incubarán únicamente en presencia de la rDef1.3 y en un tiempo de 4 hrs de exposición para los siguientes ensayos.

Evaluación de la viabilidad de epimastigotes de *T. cruzi*

Una vez determinada la concentración de rDef1.3 en donde se observó el mayor número de parásitos dañados, la siguiente pregunta a responder fue: ¿Qué porcentaje de esos parásitos con morfología alterada tienen membrana comprometida o están muertos? Para lo cual los epimastigotes se incubaron por 4 hrs con tres concentraciones de rDef1.3 (21, 42 y 84 μM), se tiñeron con dos colorantes para distinguir poblaciones de células, ya sea células vivas (Calceína AM, C-AM) o células muertas (Homodímero de Etidio, EthD-1). La distribución de las poblaciones celulares se identificó mediante citometría de flujo. La C-AM es permeable a la membrana de células sanas y luego es hidrolizada por esterasas para emitir fluorescencia en células vivas, mientras que el EthD-1 se internaliza dentro de las células con membrana dañada o de células muertas, intercalándose al ADN para finalmente emitir fluorescencia. La fluorescencia de las células tratadas con los colorantes mencionados permitió la separación de las siguientes poblaciones en una gráfica de eventos (dot plot). Para este análisis, los cuadrantes correspondientes a células positivas para EthD-1 y dobles positivas (C-AM y EthD-1) se sumaron para obtener el porcentaje de células con membrana dañada y células muertas. Estos resultados corroboraron el efecto dosis-dependiente de rDef1.3 sobre la alteración morfológica del parásito y además mostraron un daño a la membrana celular, afectación al metabolismo celular y muerte de *T. cruzi*. En este caso se observó que a la concentración de 21 μM el porcentaje de epimastigotes con daño en membrana y muertos fue de 5 %, a 42 μM de 9.3 % y con 84 μM de 16.1 %. Aunque a diferencia del análisis morfológico, aquí si se observó un aumento significativo en el efecto entre las concentraciones de defensina de 42 y 84 μM (Fig. 26).

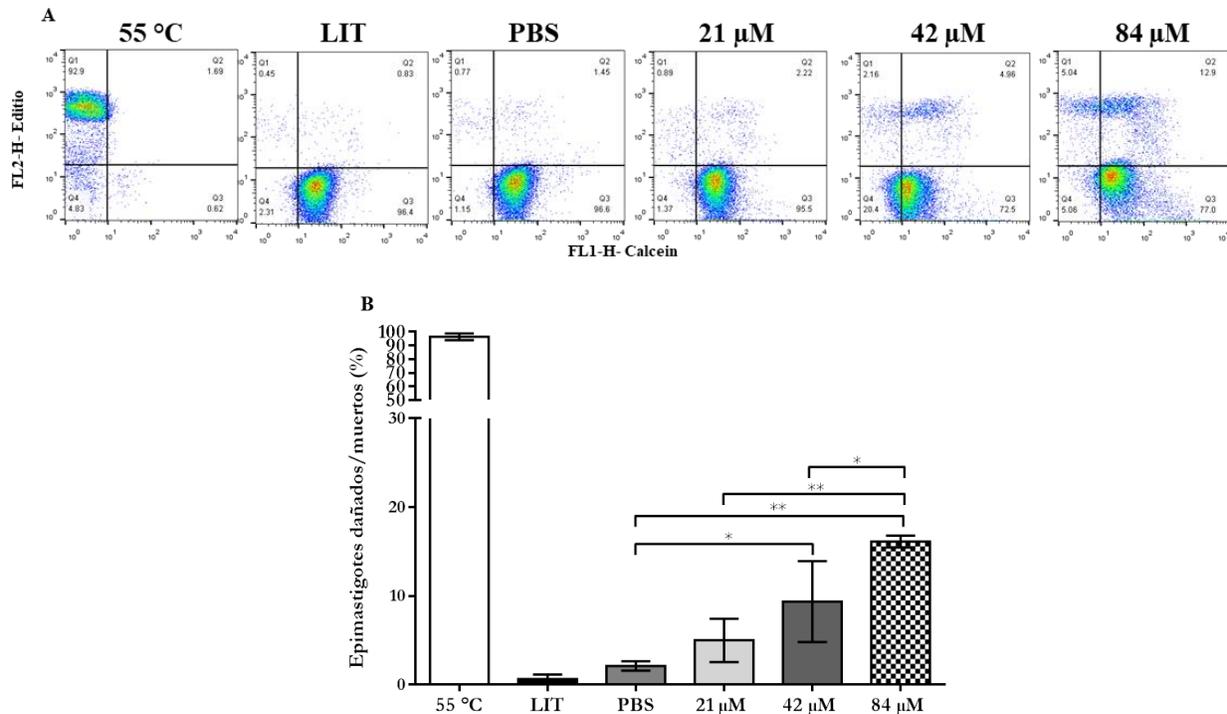


Figura 26. Análisis de viabilidad de epimastigotes de *T. cruzi* (cepa Qro), expuestos a diferentes concentraciones de rDef1.3. A) Dot plots (también llamados gráficas de puntos) representativos de dos experimentos independientes, cada uno realizado por triplicado. En las graficas se presenta el efecto de 21, 42 y 84 μM de rDef1.3 sobre epimastigotes. Las células en el cuadrante superior izquierdo son únicamente positivas para EthD-1 (células muertas); las células en el cuadrante inferior derecho son solo positivas a C-AM (células vivas); células en el cuadrante superior derecho son dobles positivas para ambos marcadores (células vivas pero con membrana dañada) y las células en el cuadrante inferior izquierdo son negativas para ambas tinciones (células no teñidas). Para separar las poblaciones celulares, se tuvieron diferentes controles: parásitos incubados solo en medio LIT (control de células vivas), parásitos muertos con calor 55 °C (control de células muertas) y parásitos incubados en el vehículo PBS. Se obtuvieron 20 000 eventos por condición. Los diagramas son representativos de dos experimentos independientes, cada uno realizado por triplicado. **B)** Porcentaje del promedio y desviación estándar de epimastigotes muertos/dañados. Se realizó una prueba estadística ANOVA de 1 vía y post prueba de Tukey, donde * $P < 0.05$ y ** $P < 0.005$.

Para determinar si el daño observado en los epimastigotes afectaba el crecimiento de los parásitos, se analizó la proliferación de éstos posterior al tratamiento con 84 μM de rDef1.3. El número de parásitos tratados con la rDef1.3 empezó a ser menor que el control a partir del día cuatro llegando a ser 3 veces menor que los parásitos controles sin tratamiento después de 8 días de cultivo (Fig. 27).

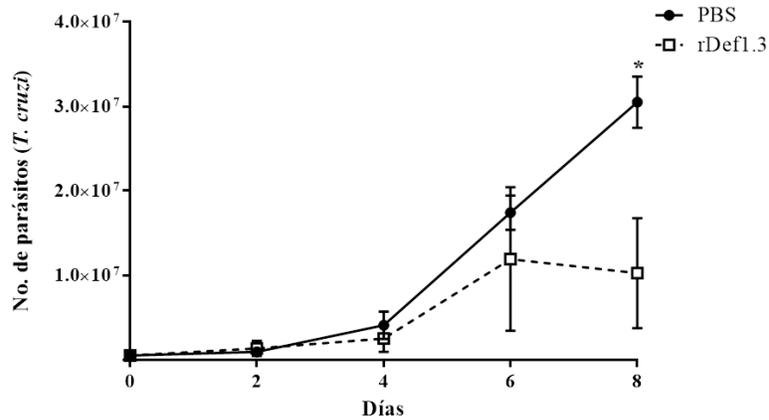


Figura 27. Curva de proliferación de epimastigotes de *T. cruzi* (cepa Qro) después de haber sido tratados con 84 μ M de rDefl.3. Se incubaron 0.2×10^6 epimastigotes en PBS (control) o tratados con 84 μ M de rDefl.3 por 4 hrs, se lavaron dos veces para posteriormente sembrarlos en medio LIT fresco. El número de parásitos se determinó después de 48 hrs y a partir de ahí cada dos días hasta llegar al día 8. Se realizaron tres experimentos independientes por duplicado. Una prueba estadística ANOVA de 2 vías y post prueba de Sidak fue aplicada donde los asteriscos representan diferencia significativa con respecto al grupo control * $p < 0.0001$.

VII.5. Evaluación de la actividad de rDefl.3 contra otros tripanosomátidos

Una vez que se determinó el efecto negativo que tiene la rDefl.3 contra epimastigotes de *T. cruzi*, se decidió evaluar su efecto sobre otros tripanosomátidos. Debido a que utilizando bajas concentraciones de la proteína recombinante no se logró observar un efecto negativo significativo en *T. cruzi*, para este análisis se decidió probar únicamente la concentración más alta probada en *T. cruzi* (84 μ M) contra los estadios de epimastigotes de *T. rangeli* (patógeno de insectos triatominos, pero no de humanos) y promastigotes de *L. major* y *L. mexicana* (agentes causales de la Leishmaniasis cutánea). Una vez concluida la incubación de los parásitos por 4 hrs con la rDefl.3, se analizó la morfología para determinar el daño. En el caso de *T. rangeli* se observó 37.6 % de parásitos con morfología atípica, es decir, parásitos con flagelos visiblemente más pequeños y en algunos casos los parásitos estaban completamente redondeados (Fig. 28-A). En el caso de las cepas de *Leishmania*: para *L. mexicana* se observó un daño de 63.3 % mientras que para *L. major* el porcentaje de parásitos dañados fue de 71.6 % (Fig. 28-B).

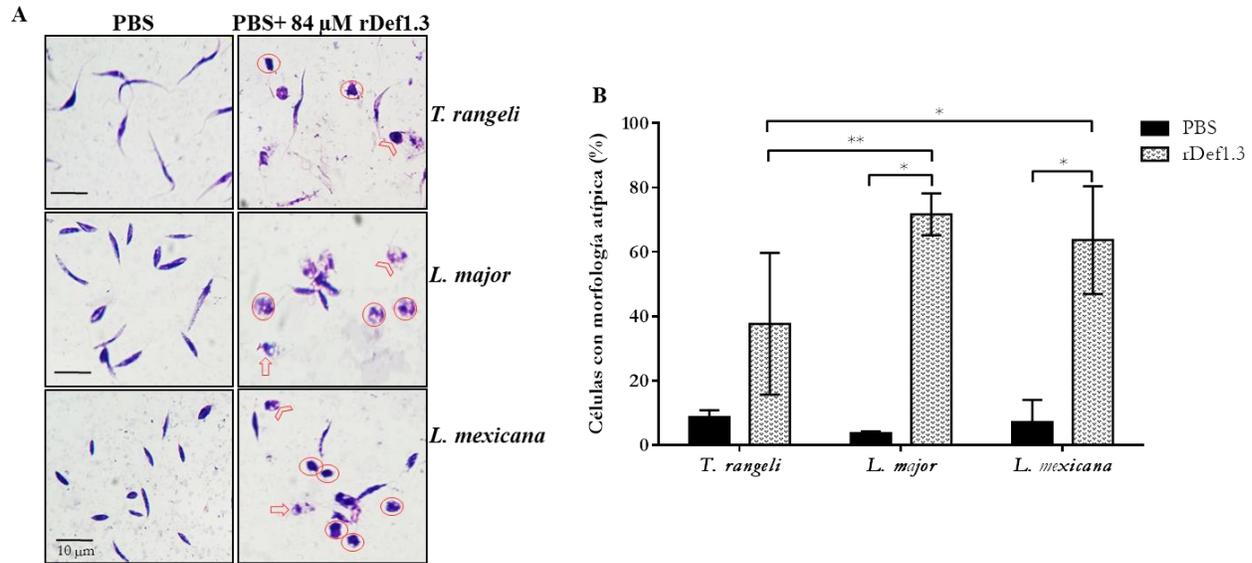


Figura 28. Efecto de rDef1.3 sobre la morfología de *T. rangeli*, *L. major* y *L. mexicana*. Se incubaron 0.2×10^6 parásitos con $84 \mu\text{M}$ de la rDef1.3 por 4 hrs. **A)** Micrografías representativas de epimastigotes de *T. rangeli* y promastigotes de *L. major* y *L. mexicana* tratados con $84 \mu\text{M}$ de rDef1. Los parásitos controles (PBS) muestran una forma típica. Los parásitos encerrados en un círculo rojo son formas completamente redondeadas sin flagelo, la flecha roja indica células lisadas y la punta de flecha roja señala formas redondeadas con acortamiento del flagelo. Los parásitos se tiñeron con el colorante Giemsa. **B)** Porcentajes de parásitos con morfología alterada. Se realizaron tres experimentos independientes. Una prueba estadística ANOVA de 2 vías y post prueba de Tukey fue aplicada donde $*p < 0.005$ y $**p < 0.0005$ indican diferencia significativa con respecto al grupo control y entre los diferentes parásitos tratados.

Evaluación de la viabilidad de promastigotes de *L. major*

Debido a que *L. major* fue el tripanosomátido que presentó un mayor daño morfológico comparado con *T. rangeli* y *L. mexicana*, se decidió analizar la viabilidad de los promastigotes de *L. major* después del tratamiento con rDef1.3, con la finalidad de determinar el porcentaje de parásitos con membrana comprometida y/o muertos, para lo cual se probaron tres concentraciones de rDef1.3 (21 , 42 y $84 \mu\text{M}$). Los parásitos se tiñeron con C-AM (células vivas) y EthD-1 (células muertas), por medio de citometría de flujo se determinó el porcentaje de parásitos con membrana comprometida y/o muertos. Los resultados muestran un daño dosis-dependiente como previamente se había observado con *T. cruzi*, sin embargo, el efecto sobre *L. major* fue mayor. Los parásitos tratados con $21 \mu\text{M}$ presentaron 4.5% de células dañadas/muertas, con $42 \mu\text{M}$ se obtuvo 33.2% y con $84 \mu\text{M}$ se observó 55.5% (Fig. 29-A). Los parásitos tratados con las tres concentraciones de rDef1.3 presentaron daño a la membrana o muerte celular en proporción significativamente mayor a los parásitos tratados con el vehículo (PBS) (Fig. 29-B).

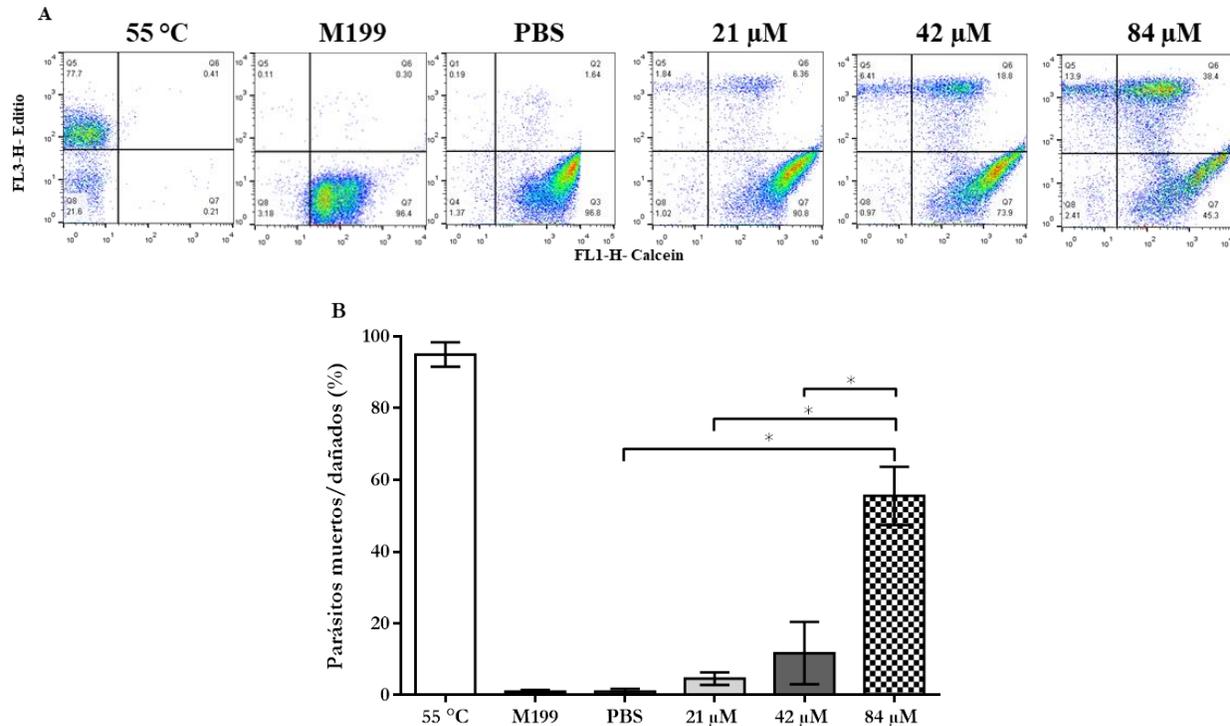


Figura 29. Análisis de viabilidad de promastigotes de *L. major* expuestos a 21, 42 y 84 μ M de rDef1.3. A) Dot plots representativos de dos experimentos independientes realizados por triplicado. Las graficas muestran promastigotes bajo diferentes tratamientos, las células en el cuadrante inferior derecho son positivas a Calceína (células vivas), células en el cuadrante superior izquierdo son positivas para heterodímero de Etdio (células muertas), células en el cuadrante superior derecho son dobles positivas para ambos marcadores (células vivas con membrana dañana) y las células en el cuadrante inferior izquierdo son negativas para ambas tinciones (células no teñidas). Para separar poblaciones, se incubaron parásitos solo en medio LIT (control de células vivas), parásitos muertos con calor 55 °C (control de células muertas) y parásitos incubados en el vehículo PBS. Se obtuvieron 20 000 eventos por condición. Los diagramas son representativos de dos experimentos independientes, cada uno realizado por triplicado. **B)** Porcentaje de epimastigotes muertos/dañados. Se realizaron dos experimentos independientes por triplicado. Una prueba estadística ANOVA de 1 vía y post prueba de Tukey fue aplicada donde * $p < 0.0001$.

Finalmente, se determinó el efecto de rDef1.3 sobre el crecimiento de los promastigotes de *L. major*, por lo que se analizó la recuperación de los parásitos posterior al tratamiento con 84 μ M de la proteína recombinante. Los parásitos se contaron cada dos días hasta el día 6, ya que a diferencia de *T. cruzi*, *L. major* alcanza su máximo crecimiento en cultivo en 4-5 días. Estos resultados indican que los parásitos tratados con la defensina recombinante crecieron 2 veces menos al sexto día, comparados con los parásitos tratados solo con el vehículo (Fig. 30).

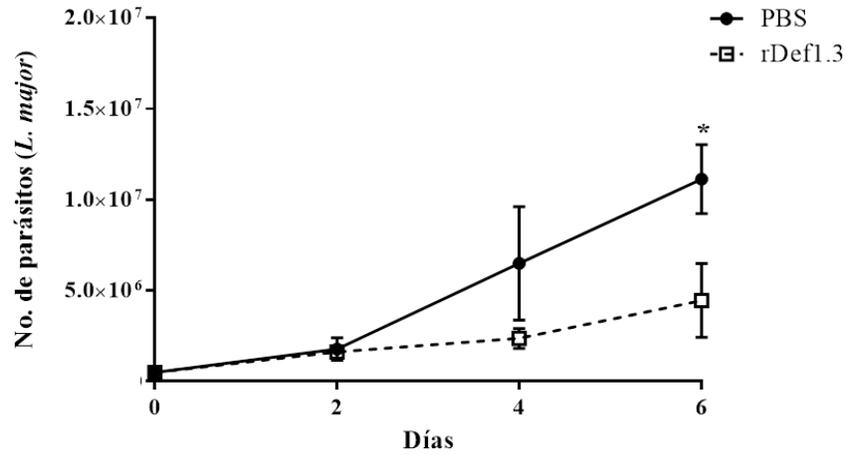


Figura 30. Curva de proliferación de promastigotes de *L. major* después de haber sido tratados con 84 μ M de rDef1.3. Se incubaron 0.2×10^6 promastigotes en PBS (grupo control) o tratados con 84 μ M de rDef1.3 por 4 hrs y transcurrido el tiempo, se lavaron dos veces para posteriormente sembrarlos en medio M199 fresco. El número de parásitos se determinó después de 48 hrs y a partir de ahí cada dos días hasta llegar al día 6. Los asteriscos indican diferencia significativa con respecto al grupo control PBS * $p < 0.001$.

VIII. DISCUSIÓN

Este trabajo se enfocó en el estudio de la familia de las defensinas, el grupo de PAMs más conservado en organismos invertebrados, lo cual indica la importancia biológica de estas moléculas (Bulet, et al., 2004). Particularmente en insectos triatominos, la familia de las defensinas ha sido el grupo de PAMs más estudiado, sin embargo, como ya se mencionó en secciones anteriores, esos estudios están enfocados a especies de triatominos sudamericanos cuya distribución no abarca a México. La finalidad de este trabajo fue ampliar el conocimiento sobre el papel de estas moléculas tanto en la fisiología como en la respuesta inmunológica de una especie mexicana de triatomino de importancia médica como lo es *T. pallidipennis*.

Aquí reportamos por primera vez la presencia de 12 genes que codifican para defensinas en *T. pallidipennis*, estos resultados correlacionan con los reportados para *R. prolixus*, única especie de triatomino de la que se tiene información, y donde se han reportado 11 genes codificantes para defensinas. La conformación de los genes está dada por un intrón y dos exones, la principal diferencia observada en los genes se da en los intrones. Los intrones son secuencias de ADN que forman parte de los genes pero que no codifican para proteínas y que, anteriormente se consideraban no funcionales, sin embargo, se ha demostrado que tienen un papel en la regulación transcripcional de las proteínas (Chorev & Carmel, 2007), los intrones pueden aumentar los niveles de transcripción, la exportación nuclear y la estabilidad de la transcripción (Shaul, 2017). En *D. melanogaster*, se ha descrito que el grado de variación de las proteínas está relacionado inversamente con el tamaño de los intrones, es decir, los intrones largos contienen mayor cantidad de secuencias conservadas que los intrones cortos y la presencia de estas secuencias conservadas explica la relación entre tamaño de los intrones y la variación en las proteínas (Petit, et al., 2007). En nuestros resultados, los intrones son las regiones donde se observa una mayor variabilidad. Sin embargo, el tamaño de los intrones no varía significativamente entre secuencias, ya que en general el tamaño de los intrones para los tres grupos de secuencias obtenidas (*def1*, *def3* y *def4*) oscila entre los 97 y los 107 pb. En este trabajo se lograron identificar 12 genes diferentes codificantes para defensinas en *T. pallidipennis*.

Al hacer la traducción de los genes a proteínas, se identificaron las tres regiones características de los precursores de defensinas: péptido señal (PS), pro-péptido (PP) y péptido maduro (PM). Dentro de la composición de los 12 genes identificados, el primer exón codifica para el PS, mientras que el segundo codifica tanto para la región del PP como para el PM. Los PAMs tienen secuencias señal o PS escindibles que median y translocan las cadenas polipeptídicas nacientes hacia el retículo endoplásmico (Pérez, et al., 2018). Nuestros resultados muestran que la región del PS, es la región más conservada, pues fue la misma en 11 de las 12 proteínas analizadas, esta región está constituida por 19 residuos de aminoácidos. El PP, sirve para almacenar en forma inactiva a los PAMs, proteger a los péptidos de la degradación enzimática y proteger a las células huésped de los posibles efectos citotóxicos (Júnior, et al., 2018). En nuestros resultados, en esta región

es donde se observó una mayor variabilidad de secuencias, ya que en total se identificaron 9 pro-péptidos diferentes, aunque todos presentaron el sitio de corte (KR) que sirve para liberar al PM. Las 7 defensinas tipo 4 presentan la secuencia PAGEVTE, lo cual podría indicar que es un sitio de marcaje para enviar a las prodefensinas a organelos citoplasmáticos específicos (Michaelson, et al., 1992), no obstante, dentro de las dos defensinas tipo 1 la naturaleza de este motivo no es evidente.

Al ser péptidos de secreción, las defensinas tienen un proceso de maduración intracelular y la región liberada al espacio extracelular con actividad biológica se encuentra en el PM. De las 12 proteínas identificadas, únicamente se obtuvieron tres PM que, al hacer el análisis filogenético y comparativo con defensinas de otros triatomíneos, se determinó que dos defensinas corresponden a las tipo 1 y una a las tipo 4, por lo que las denominamos TpDef1.1, TpDef1.2 y TpDef4. Se desconoce la razón por la cual existe una alta variabilidad en los PP que contienen un mismo PM, aunque existen trabajos que proponen que el PP interactúa con el PM durante la biosíntesis de estas moléculas para facilitar el plegamiento de la defensina y/o para evitar interacciones inadecuadas con otras proteínas o membranas lipídicas (Michaelson, et al., 1992; Ganz, et al., 1999). Este hallazgo es interesante puesto que por primera vez se reporta en Hemípteros.

Como ya se mencionó, la denominación de defensinas tipo 1 o tipo 4 se dio con base a los análisis de comparación con defensinas de triatomíneos sudamericanos, ya sea por medio de alineamiento de secuencias o por análisis filogenéticos, en este último análisis se observó que las 12 secuencias muestran una clara separación de dos clados, uno correspondiente a las defensinas tipo 1 y otro donde se agrupan las defensinas tipo 4 de Hemípteros de los géneros *Triatoma* y *Rhodnius*.

A nivel de proteína, el análisis comparativo de las tres TpDefs muestra que las dos defensinas tipo 1 (TpDef1.1 y TpDef1.2) difieren entre ellas solo en dos aminoácidos y con respecto a TpDef4 son diferentes en 5 y 6 residuos de aminoácidos respectivamente. No obstante, al generar los modelos de las estructuras terciarias observamos que esas diferencias no modifican la estructura característica de las defensinas de invertebrados, la cual está determinada por los tres puentes disulfuro y que da como resultado el motivo estructural denominado CS $\alpha\beta$. La diferencia más notoria a nivel estructural se observa en el loop, sin embargo, esta región no está relacionada con la capacidad antimicrobiana de las defensinas (Gao & Zhu, 2014).

Previamente se publicó el transcriptoma de *T. pallidipennis*, donde se reportaron 8 transcritos de defensinas (Zumaya-Estrada, et al., 2018), de los cuales solo dos secuencias coinciden con las reportadas en nuestro trabajo (*def1.2* y *def4.6*). En dicho trabajo, también reportan el agrupamiento de las defensinas en dos clados: uno donde se agrupan las tipo 1 y otro donde se agrupan las tipo 4 en conjunto con las tipo A y B de *R. prolixus* (Zumaya-Estrada, et al., 2018). En *T. brasiliensis* se ha descrito que la alimentación tiene un papel determinante en la expresión del gen *def1*, ya que la concentración del ARN mensajero varía dependiendo del día post alimentación (p.a.) analizado y oscila entre los 0.5 y 1.9 ng de ARN total (ARNm/ μ g), donde el pico

máximo de expresión es al día 15 p.a. (Araújo, et al., 2006). La fluctuación en la concentración del ARN mensajero de *def1* en insectos alimentados se atribuye al crecimiento de las bacterias simbiotes en el tracto digestivo de los insectos, pues el estómago fue el órgano que presentó una mayor cantidad de ARNm. Además, el día 15 p.a. donde se vió el máximo de expresión del gen, correlaciona con el proceso previo a la ecdisis de insectos donde hay un aumento de componentes antimicrobianos (Kollien, et al., 2003).

Para determinar el patrón de la expresión de diferentes isoformas de defensinas en adultos de *T. pallidipennis* y poder identificar si entre hembras y machos había una expresión diferencial, evaluamos la expresión de tres ARN mensajeros: *def1.1*, *def1.2* y *def4.6*; la selección de estos genes corresponde a los que identificamos en el genoma y a los reportados en el transcriptoma (<http://201.131.57.23:8080/data/triatoma>). El análisis de la expresión de defensinas se realizó en insectos que tuvieran 15 días de haber mudado al estado adulto y dado que está reportado que la alimentación influye en la expresión de los ARNm de defensinas, al menos de defensinas tipo 1, quisimos eliminar ese parámetro por lo que los insectos no se alimentaron hasta el día de su sacrificio. Nuestros resultados indican que, en concentración, hay casi el doble de ARNm de defensinas tipo 1 (*def1.1* y *def1.2*) con respecto al tipo 4 (*def4.6*) en ambos sexos y curiosamente, no se observó una diferencia entre hembras y machos. A diferencia de los trabajos donde han evaluado la expresión de AMPs en insectos, nosotros no evaluamos la expresión de los ARNm por órgano, por lo que desconocemos si la expresión de *def1.1*, *def1.2* y *def4.6* se dá de forma localizada. También se sabe que dentro de la regulación de genes de defensinas participan algunas las hormonas involucradas en el desarrollo, como por ejemplo la hormona esteroide 20-hidroxiecdisona (Contreras, et al., 2020). En insectos con desarrollo holometábolo, es decir con una metamorfosis completa como *Drosophila*, se ha estudiado la expresión de defensinas en diferentes estadios durante su ciclo de vida; al comparar los estadios de larva, pupa y adulto, en adultos es donde se observa una mayor cantidad de defensinas (Dimarcq, et al., 1994). Sin embargo, en insectos con metamorfosis incompleta o desarrollo hemimetábolo, como *T. pallidipennis*, se desconoce si ocurre este mismo fenómeno, ya que no existen trabajos donde analicen la expresión de estas moléculas en los diferentes estadios del ciclo de vida.

El siguiente parámetro que se evaluó fue la expresión de *def1.1*, *def1.2* y *def4.6* en ninfas de 5° estadio infectadas vía intrahemocélica con diferentes bacterias y disectadas a las 4 hrs post infección. La mayoría de las defensinas de insectos tienen actividad contra bacterias Gram + (Hetru, et al., 2003), aunque algunas pocas se han reportado con actividad contra Gram - (Bulet, et al., 2004; Cytrynska, et al., 2007) y casos excepcionales como el de la gallerimicina (descrita en *Galleria mellonella*) tienen actividad exclusiva contra hongos filamentosos (Langen, et al., 2006). Nuestros resultados indican que el gen *def4.6* bajo los tres retos inmunológicos, mostró un aumento en su expresión con respecto a los insectos no infectados, mientras que las *def1.1* y *def1.2* tienen un aumento solo en las infecciones con *E. coli* y *M. luteus*. Sin embargo, no hay una diferencia significativa en la expresión de los ARNm ante la infección con las diferentes bacterias, y tampoco entre las tres isoformas de defensinas analizadas, aunque se logra vislumbrar una tendencia en el aumento de

def4.6 cuando los insectos se encuentran infectados principalmente con las bacterias de tipo Gram + (*L. innocua* y con *M. luteus*). López, et al., 2003, reportó por primera vez que *R. prolixus* es capaz de expresar una isoforma de defensina (*defA*) en diferentes órganos tras un reto inmunológico realizado vía hemocele y que hay un aumento significativo en el intestino entre las 6 y 24 hrs post infección. Al hacer una infección vía hemocele esperábamos una respuesta inmunológica exacerbada y rápida, por esa razón se decidió analizar a las 4 hrs post infección, aunque también se analizó a las 24 hrs p.i. donde se observó un aumento significativo en la expresión de *def4.6* principalmente en insectos infectados con *L. innocua*, sin embargo, no se logró hacer una repetición de este último ensayo dado que no se tuvieron insectos suficientes ni en las condiciones óptimas y por lo tanto esos datos no se presentan en este trabajo. Nuestros resultados sugieren que los órganos estudiados (cuerpo graso, tubulos de Malpighi y tracto digestivo) no fueron lo suficientemente estimulados para montar una respuesta inmune como la esperada, asimismo el tiempo de infección no fue el idóneo para observar una diferencia significativa entre las infecciones con las diferentes bacterias. En este análisis no se estudió la hemolinfa (sistema circulatorio de insectos) que es el principal componente que estuvo en contacto con los microorganismos potencialmente patógenos para el insecto, la hemolinfa es un fluido que irriga toda la cavidad abdominal de los insectos y que está en contacto directo con el cuerpo graso, en ese fluido se encuentran los hemocitos (células del sistema circulatorio) las cuales tienen un papel importante en la síntesis y secreción de AMPs, por lo que será interesante evaluar dicho componente en futuras investigaciones.

El último parámetro evaluado para analizar la expresión de *def1.1*, *def1.2* y *def4.6* fue la infección por *T. cruzi*. El interés de estudiar a insectos de la subfamilia Triatominae, como por ejemplo *T. pallidipennis*, es por su capacidad de transmitir al parásito flagelado *T. cruzi*. Los insectos triatominos se infectan cuando se alimentan de sangre que contiene al parásito, el cual se va a localizar únicamente dentro del tracto digestivo de los insectos e irá recorriéndolo hasta llegar al recto para finalmente salir en las heces. Estudios han reportado que al inocular al parásito directo al hemocele, éste es eliminado rápidamente ya que el parásito induce la activación de moléculas efectoras del sistema inmune diferentes a los PAMs, tales como la fenol oxidasa y la formación de nódulos (Mello, et al., 1996), sin embargo, no se ha reportado la presencia de estos elementos en el tracto digestivo de los insectos. Diversos estudios han reportado una expresión diferencial de isoformas de defensinas en diferentes órganos de insectos alimentados de sangre que contiene *T. cruzi*. En *T. brasiliensis*, se ha reportado que el gen de *def1* se expresa en diferentes cantidades dependiendo de la región del tracto digestivo, por ejemplo, en el estómago la expresión de este gen es constante y no varía con respecto al grupo de insectos infectados, no obstante en el intestino delgado se reporta una fluctuación en la concentración del ARNm a los diferentes días post infección analizados (5, 10 y 20), teniendo su pico máximo al día 20 y es considerablemente mayor con respecto al grupo de insectos control (Waniek, et al., 2011). Como ya se ha mencionado anteriormente, en nuestro análisis no dividimos el tracto digestivo para la búsqueda de la expresión de genes y en los resultados se observó una concentración constante de las dos defensinas tipo 1

(*def1.1* y *def1.2*) la cual no cambió en los dos días post infección analizados y no aumenta con respecto al grupo control. Por el contrario, *def4.6* aumenta más de tres veces en comparación con las defensinas tipo 1 y con el grupo de insectos no infectados, ese aumento se mantiene en los dos días post infección analizados, indicando que la presencia del parásito estimula la expresión de ese gen.

Los análisis filogenéticos mostraron una mayor cercanía de las defensinas tipo 4 de *T. pallidipennis* con las defensinas presentes en *R. prolixus*, en ésta especie sudamericana de triatomino se han evaluado infecciones con diferentes cepas de *T. cruzi* (Dm28 y cepa Y) y los resultados han indicado que el insecto modula de forma diferente la expresión de PAMs dependiendo de la cepa del parásito ya que solo una de las dos cepas estudiadas logra completar exitosamente su ciclo de vida en el insecto (Vieira, et al., 2016), por lo que la capacidad de *T. cruzi* para colonizar a *R. prolixus* dependerá de las características genotípicas en combinación con su capacidad para modular la microbiota del insecto. En nuestro trabajo, analizamos la infección de los insectos utilizando una cepa catalogada como de baja virulencia para los humanos (cepa Ninoa), no obstante, en futuras investigaciones será interesante determinar si *T. pallidipennis* al exponerse a otras cepas de *T. cruzi* presentes en México mantiene la expresión de *def1.1*, *def1.2* y *def4.6* como la describimos en este trabajo.

Finalmente, como ya se ha mencionado, el papel de la microbiota del tracto digestivo de los insectos es determinante no solo para la fisiología de los insectos triatominos, sino también para el establecimiento de *T. cruzi*. Algunos trabajos han reportado que ciertos PAMs como la *defC* es capaz de controlar la microbiota de *R. prolixus* al reducir la cantidad de bacterias simbiotas y esto da como resultado un aumento en la población de *T. cruzi* (Azambuja, et al., 2004; Vieira, et al., 2016). La información referente a nuestro modelo de estudio (*T. pallidipennis*) es escasa, diversas cuestiones sobre la capacidad vectorial y la relación vector-parásito siguen siendo una incógnita, estos primeros resultados servirán como antecedentes para futuros estudios enfocados a la respuesta inmune, a la microbiota y a la fisiología de los insectos.

Debido a que la mayoría de los trabajos sobre PAMs en insectos están enfocados a la caracterización de genes y al análisis de la expresión de ARNm bajo diferentes estímulos, en paralelo a la caracterización de genes de defensinas en *T. pallidipennis*, se comenzó con la generación de una defensina recombinante para poder evaluar su actividad biológica *in vitro*, durante este proceso se siguieron diferentes estrategias y participaron investigadores pertenecientes a diferentes centros de investigación dentro de la UNAM (Apéndice 2).

La principal limitante para trabajar con PAMs de insectos es la fuente de obtención de la defensina nativa debido al tamaño de los organismos, ya que la cantidad de péptido purificado total es poca y por lo tanto se necesitaría de un número grande de individuos, pues para realizar análisis de actividad antimicrobiana es indispensable contar con cantidades considerables de péptido (Tonk & Vilcinskas, 2017). En la literatura se han empleado alternativas a este problema (Zhang, et al., 1998): uno es la síntesis de PAMs, la cual además de que es una técnica costosa tiene un inconveniente al sintetizar PAMs que contengan cisteínas (como es el caso

de las defensinas), pues se necesitan las condiciones idóneas para favorecer la formación de los tres puentes disulfuro *in vitro* y particularmente en insectos el apareamiento de las 6 cisteínas es altamente específico (Schmoltdt, et al., 2005). Otra alternativa es la generación de péptidos heterólogos en sistemas bacterianos, esta alternativa es la más factible para la producción de defensinas, aunque debido a las propiedades fisicoquímicas propias de estas moléculas, también pueden existir inconvenientes al momento de la inducción de la síntesis, los PAMs podrían dañar a las células hospederas o ser degradados por proteasas, en consecuencia se propone la unión de proteínas fusión para evitar tales percances (Fairlie, et al., 2002; Schmoltdt, et al., 2005 Song, et al., 2009).

Para la generación de la defensina recombinante se tomaron las secuencias de defensinas reportadas para *T. brasiliensis*, pues como ya se ha mencionado con anterioridad, aún no está reportado el genoma de *T. pallidipennis*. Durante el proceso de la generación de la proteína recombinante, se tuvieron diversas dificultades; el problema inicial se dio en la elección tanto del plásmido de clonación, como de los sitios de corte adecuados. Inicialmente, la estrategia consistió en clonar dos defensinas (*def3* y *def4*) tanto en la forma de propéptido como de péptido maduro, ya que se desconocía si las defensinas maduras ejercerían un efecto negativo sobre las células hospederas.

Se comenzó probando la metodología propuesta por Figueredo, et al., 2010, quién usó el plásmido de clonación/expresión pET-28a, el cual contiene dos etiquetas de 6x-His para purificar. El gen se insertó entre diferentes sitios de corte (Apéndice 2) y se adicionó una Metionina en el extremo C-terminal, la cual sirvió como sitio de corte para el Bromuro de Cianógeno (CNBr), esto con la finalidad de que una vez que se tuviera al péptido purificado, se pudiera liberar la región del propéptido para dejar solo al péptido maduro o de la etiqueta de 6x-His (en el caso del péptido maduro). Bajo estas condiciones, se logró clonar y expresar el gen de *def3* en forma de péptido maduro, sin embargo, dado que se necesitaba de una infraestructura especializada para realizar el corte químico con CNBr, el péptido purificado se envió al Instituto de Química (UNAM), no obstante, durante el corte y los lavados, la defensina se perdió. Por esta razón se decidió cambiar la estrategia y se optó por trabajar con la defensina únicamente en su forma de péptido maduro, ya que el resultado anterior nos sirvió como antecedente directo para determinar que la defensina madura no tiene un efecto nocivo contra la célula hospedera.

La nueva metodología se realizó tomando como referencia el trabajo de Corrales-García, et al., 2013, utilizando el plásmido de clonación/expresión pQE-30 y los sitios de corte *Bam*HI y *Pst*I, no obstante, al hacer el análisis de secuencias de las tres isoformas de defensinas (*def1*, *def3* y *def4*), se observó que *Pst*I cortaba dentro de los genes de *def3* y *def4* (con los que se venía trabajando), pero no así al gen de *def1*, por lo que se decidió comenzar con la clonación de este gen. Al analizar la secuencia del gen *def1* clonado en pQE-30 resultó ser diferente a los genes de defensinas tipo 1 que previamente caracterizamos (*def1.1* y *def1.2*), por lo

que, para seguir con la nomenclatura dada, se denominó como *def1.3*. Con este protocolo se logró expresar a la nueva defensina en *E. coli* cepa M15 [pREP4] y la defensina recombinante se denominó como rDef1.3 (recombinante de defensina tipo 1). Como ya se mencionó, las defensinas de insectos tienen un peso molecular de ~4 kDa, sin embargo, debido a la presencia de la etiqueta de 6x-His y los aminoácidos que corresponden al sitio de corte para *Bam*HI (GS), rDef1.3 tiene un peso de 5.7 kDa, lo cual se corroboró por WB con un anticuerpo anti-Histidinas y para completar la caracterización del péptido, también se realizó espectrometría de masas. Gao & Zhu reportan que el sitio activo de las defensinas de insecto se da en la región de las dos β -láminas antiparalelas (Gao & Zhu, 2013), se realizó un modelaje por homología de rDef1.3 y en efecto, la presencia de los aminoácidos extras no altera la estructura terciaria, además dado que se ha reportado que la presencia de proteínas fusión no altera la actividad antimicrobiana de los péptidos (Song, et al., 2009), se decidió trabajar a rDef1.3 con la etiqueta de 6x-His y con los aminoácidos extras.

La defensina se obtuvo en cuerpos de inclusión, por lo que para purificarla se usaron altas concentraciones de urea. La metodología que se empleó para la solubilización de los cuerpos de inclusión y para la purificación presenta una gran ventaja, pues no fue necesario utilizar HPLC, como la mayoría de los protocolos reportan, ya que al purificar rDef1.3 por IMAC en condiciones desnaturizantes, obtuvimos a la defensina pura y en buenas concentraciones. Otra ventaja de nuestra metodología es que no fue necesario usar agentes como glutatión reducido (GSH) o glutatión oxidado (GSSH) para inducir replegamiento del péptido, pues el proceso de diálisis en PBS fue suficiente para replegar y obtener a la rDef1.3 con actividad antimicrobiana. Además, bajo nuestras condiciones se determinó que la defensina purificada es estable en concentraciones ≤ 0.5 mg/ml y 4 °C hasta por meses en el buffer de elución, sin embargo se identificó que una vez que se dializa, ésta pierde su actividad en un lapso de 24 hrs pues comienza a precipitarse en la solución de diálisis (PBS), por esa razón es indispensable utilizar rápido a la proteína recién dializada.

Como ya se ha mencionado, la principal actividad antimicrobiana descrita en defensinas de insectos es la actividad contra bacterias Gram + (Ganz, 2003). Algunos reportes han demostrado que la presencia de aminoácidos cargados positivamente y de aminoácidos hidrofóbicos, pueden aumentar significativamente la capacidad de interactuar con membranas. Sorprendentemente rDef1.3 no mostró actividad bactericida contra las dos bacterias evaluadas mediante ensayos de difusión en placa, pese a que un 40 % de la composición total de aminoácidos son hidrofóbicos y 29 % son aminoácidos cargados positivamente (K, R, H). Este hallazgo es interesante pero no extraño, ya que en defensinas de humanos este fenómeno también ha sido reportado, ejemplo de esto es la HD6, la cual no mostró actividad contra bacterias, y se sugiere que más bien el papel que ejerce es contra los virus (Ericksen, et al., 2005). Asimismo, en artrópodos el péptido Sm2 aislado del centípedo *Scolopendra morsitans* que presenta la estructura típica de las defensinas ($CS\alpha\beta$), al probarlo contra 5 diferentes bacterias y 2 hongos, no mostró actividad antimicrobiana a una concentración de 32 mg/ml (Dash, et al., 2018). En vertebrados, se ha descrito que las defensinas también están involucrados en

diferentes procesos importantes de la respuesta inmune como en la citotoxicidad y quimiotaxis (Amerikova, et al., 2019). La nula actividad contra bacterias de rDef1.3 se podría correlacionar con los resultados obtenidos de la evaluación de la expresión de defensinas en insectos infectados con diferentes bacterias, donde a pesar de que si aumentan con respecto a los insectos no infectos, no son los mensajeros mas abundantes bajo la infección con *E. coli* y *M. luteus*, lo cual confirmaría la idea de que las defensinas tipo 1 en *T. pallidipennis* no participan directamente en la respuesta inmune contra bacterias, sin embargo podrían participar en otros mecanismo de la respuesta inmune de los insectos.

En insectos se han reportado diferentes concentraciones de defensinas en la hemolinfa después de diversos retos inmunológicos, por ejemplo, en *D. melanogaster* se encontró 1 μM de defensinas después de una infección por bacterias (Lemaitre & Hoffman, 2007), mientras que en *A. aegypti* puede llegar hasta 45 μM a las 24 hrs post infección (Lowenberger, et al., 2003). En triatominos se desconoce la concentración de defensinas, así que para evaluar la actividad de rDef1.3 contra diferentes tripanosomátidos, se probaron diferentes concentraciones partiendo desde 5.2 μM hasta llegar a 84 μM y en algunos insectos como por ejemplo en *D. melanogaster* se ha propuesto que bajo diferentes retos inmunológicos, la síntesis de defensinas se da en cuestión de horas (Lemaitre, et al., 1997), por lo que decidimos evaluar el efecto de rDef1.3 a las 4 hrs post tratamiento.

Al evaluar el efecto de rDef1.3 sobre la morfología de epimastigotes de *T. cruzi* (estadio replicativo dentro del insecto) el mayor daño se observó en las concentraciones de 42 y 84 μM (27 %), al evaluar la viabilidad el porcentaje de parásitos (muertos y con membrana alterada) fue de 16 % y el mayor efecto se observó en la proliferación de los parásitos post tratamiento, el cual disminuyó tres veces con respecto a los parásitos control. Diversos trabajos han demostrado que, en condiciones de laboratorio, *T. cruzi* es susceptible a diferentes PAMs y que el efecto de los péptidos depende de la concentración (4 – 100 μM) y del tiempo de exposición (Durvasula, et al., 1997; Azambuja, et al., 1989; Lofgren, et al., 2008). Nuestros resultados indican que rDef1.3 tiene un efecto moderado sobre el daño a la membrana de *T. cruzi* en tiempos cortos, sin embargo el daño hecho es suficiente para limitar el crecimiento del parásito en cultivo, lo cual podría sugerir un proceso coevolutivo exitoso de adaptación entre *T. pallidipennis* - *T. cruzi*, aunque se desconoce si en la naturaleza esta defensina se expresa en el tracto digestivo del insecto. De forma natural es muy probable que no se produzcan concentraciones suficientes de PAMs en el tracto digestivo de los insectos como para eliminar la población de *T. cruzi*, ya que los péptidos podrían ser degradados por la actividad de proteasas, asimismo la producción de defensinas podría estar bajo especial control del insecto para mantener a la microbiota que es indispensable para su sobrevivencia (Ursic-Bedoya, et al., 2011). El único trabajo donde se ha evaluado el efecto directo de un PAM proveniente de un insecto triatomino contra *T. cruzi*, es el de Ursic-Bedoya, et al., 2011, ahí evaluaron la actividad de una recombinante de un péptido lineal rico en Prolinas y Glicinas llamado prolixicina presente en *R. prolixus*, el cual tuvo actividad contra bacterias Gram + y Gram -, pero no tuvo un efecto significativo en el crecimiento de los parásitos incubados a la concentración mas alta (30 μM). Nuestros resultados sugieren

que rDef1.3 puede tener un papel en el control poblacional de *T. cruzi*, sin embargo, aún quedan muchos estudios por realizar en un futuro para contestar algunas preguntas determinantes como: ¿Cuánta cantidad de defensinas está sintetizando el insecto de forma natural? ¿Cuál es el principal órgano sintetizador de defensinas?

En la literatura se ha reportado que las defensinas pueden ejercer su efecto trabajando en sinergia con otras moléculas efectoras de la respuesta inmune, como por ejemplo con la fenol oxidasa (Hillyer & Christensen, 2005) o el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Lichtenstein, et al., 1988), por lo que se decidió probar la concentración de 21 μM de rDef1.3 en adición con diferentes concentraciones de H_2O_2 sobre epimastigotes de *T. cruzi*, pero en nuestros resultados no se observó un sinergismo en la actividad de la defensina en conjunto con esta molécula (Apéndice 6).

Teniendo como antecedente directo los resultados del daño generado por rDef1.3 a *T. cruzi*, se evaluó el daño sobre otros tripanosomátidos utilizando únicamente la concentración de 84 μM . Dentro del parámetro de daño morfológico generado por la proteína recombinante, se observó un mayor daño (38 %) en epimastigotes de *T. rangeli* con respecto a *T. cruzi*. *T. rangeli* es patógeno de insectos triatominos pero no de humanos y aunque *T. rangeli* es capaz de infectar el intestino de cualquier especie de triatomo, los únicos vectores reportados donde hay invasión de las glándulas salivales y producción de tripomastigotes metacíclicos infectivos para el mamífero, son las especies del género *Rhodnius* (Vallejo, et al., 2015). Es importante mencionar que no existen reportes de la presencia de *T. rangeli* en México y por lo tanto tampoco de la presencia de este parásito en *T. pallidipennis*.

También se evaluó el efecto de rDef1.3 contra dos especies de *Leishmania*: *L. major* y *L. mexicana*, agentes causales de la leishmaniasis cutánea. La alteración en la morfología de estos parásitos fue casi tres veces mayor al daño causado en los epimastigotes de *T. cruzi* y *T. rangeli*, este daño se corroboró midiendo la viabilidad por métodos de marcaje de actividad fisiológica y daño a membrana solo en *L. major*, dado que fue la especie donde se observó un mayor daño en la morfología. Los ensayos de viabilidad mostraron que a 84 μM el 55.5% de los parásitos están muertos o con una membrana dañada y en las curvas de proliferación se observó que de los pocos parásitos que lograron sobrevivir al tratamiento, estos crecen 2 veces menos que los parásitos no tratados, este resultado es similar al observado con *T. cruzi*.

En la naturaleza los parásitos no están expuestos a altas concentraciones de PAMs ya que podrían presentar tolerancia, aunque podrían mostrar susceptibilidad a péptidos similares presentes en otros insectos (Boulanger, et al., 2006). En nuestro trabajo, se probaron concentraciones muy altas de rDef1.3 a las que los parásitos no se encuentran en condiciones fisiológicas normales, esto con la finalidad de encontrar la concentración letal. Resultados similares han sido reportados por Boulanger et al., 2004, donde una defensina presente en *Phlebotomus duboscqi* tuvo efecto contra *L. major* a 85 μM , esto en un sistema natural vector-parásito, además esa

defensina tuvo efecto contra hongos. En nuestro trabajo no evaluamos el daño de rDef1.3 contra hongos, por lo que no descartamos la posibilidad de que pueda tener actividad fúngica.

En los diferentes tripanosomátidos evaluados, se observó una diferencia en el porcentaje de parásitos dañados, el cual se puede atribuir a la composición de las diferentes membranas celulares (fluidez, densidad de carga negativa y ausencia/presencia de colesterol), los tripanosomátidos poseen una superficie cargada negativamente, sin embargo, ese valor cambia entre especies y depende del estadio del ciclo de vida (Souto-Padrón, 2002).

Nuestros resultados sugieren que rDef1.3 tiene mayor efecto sobre tripanosomátidos con los que no está en contacto en la naturaleza, como es el caso de las dos especies de *Leishmania*, las cuales son transmitidas por dípteros del género *Plebotomus* y *Lutzomyia*.

Tanto la Enfermedad de Chagas como la Leishmaniasis cutánea son enfermedades tropicales que siguen siendo un grave problema de salud en el continente americano, particularmente en México y dado que no hay vacunas y los fármacos existentes son altamente tóxicos, la necesidad de buscar nuevas alternativas terapéuticas es decisiva. Los PAMs han sido muy estudiados en recientes años debido a su amplio espectro microbicida y considerando que los insectos son una fuente prometedora de PAMs (Tonk & Vilcinskas, 2017), este trabajo es uno de los primeros en enfocarse al estudio de defensinas presentes en insectos de importancia médica y en la evaluación del efecto sobre los agentes causales de estas terribles enfermedades.

IX. CONCLUSIONES

- Los 12 genes que codifican para defensinas en *T. pallidipennis* se agrupan en dos grupos: defensinas tipo 1 y tipo 4.
- La región del propéptido es altamente variable en las defensinas tipo 4.
- *T. pallidipennis* cuenta con al menos 4 péptidos maduros: TpDef1.1, TpDef1.2, TpDef1.3 y TpDef4.
- En estado basal, hay una mayor cantidad de ARNm de defensinas tipo 1 en adultos hembras y machos, a diferencia de defensinas tipo 4.
- Ante los diferentes retos inmunológicos, el único gen que tuvo un aumento en su expresión fue *def4.6*.
- La metodología realizada para la generación de una defensina recombinante ofrece una serie de ventajas en relación costo/beneficio.
- rDef1.3 afecta de manera importante el crecimiento de *T. cruzi* y *L. major*, así como la morfología de *Leishmania mexicana* y *Leishmania major*.
- rDef1.3 no tiene actividad sinérgica con H₂O₂, en las concentraciones analizadas.
- Las defensinas tipo 1 no aumentan en expresión cuando el insecto se encuentra en presencia de *T. cruzi*, lo cual indica que estas isoformas no participan en la respuesta inmune contra el parásito, esto se corrobora con el efecto moderado que tiene la defensina recombinante contra los epimastigotes *in vitro*.

X. PERSPECTIVAS

- Los hallazgos presentados en este trabajo, proponen nuevas interrogantes sobre la función que tiene la familia de las defensinas en *T. pallidipennis*, por lo que es determinante seguir con el estudio de estas moléculas para comprender la participación específica que tienen a nivel fisiológico y en la interacción *T. pallidipennis* - *T. cruzi*.
- Un abordaje esencial será comenzar con estudios más específicos enfocados a la expresión de ARNm de defensinas en los principales órganos sintetizadores de estas moléculas, de forma individual para identificar la expresión de estas moléculas de forma localizada.
- Los hemocitos son células secretoras presentes en la hemolinfa, las cuales han sido muy poco estudiadas en relación con la síntesis de PAMs, por lo que estudiarlas brindará un panorama más amplio sobre el papel que tienen en la respuesta inmune.
- Nuestros resultados indican un papel importante del gen *def4.6* cuando el insecto se encuentra infectado con diferentes microorganismos, será interesante determinar la expresión de las otras isoformas de defensinas tipo 4.
- Analizar la cantidad de péptidos maduros en las diferentes regiones del tracto digestivo servirá para identificar el efecto directo que tienen las defensinas en el insecto ante la presencia de *T. cruzi*.
- Los estudios de funcionalidad de estas moléculas, especialmente de las defensinas tipo 4, serán definitivos para la caracterización de esta familia de péptidos en Hemípteros.
- Para finalizar la caracterización de la actividad antimicrobiana de rDef1.3, será interesante evaluar el efecto contra hongos, células cancerígenas y eritrocitos.

XI. REFERENCIAS

1. Almeida-de-Faria, M., Freymüller, E., Colli, W. and Alves, M. J. 1999. *Trypanosoma cruzi*: characterization of an intracellular epimastigote-like form. *Exp Parasitol*, 92: 263-74.
2. Álvarez, V., Niemirowicz, G. T. and Cazzulo, J. 2011. The peptidases of *Trypanosoma cruzi*: digestive enzymes, virulence factors, and mediators of autophagy and programmed cell death. *Biochim Biophys Acta*, 1824: 195-206.
3. Amerikova, A., El-Tibi, I., Maslarska, V., Bozhanov, S. and Tachkov, K. 2019. Antimicrobial activity, mechanism of action, and methods for stabilisation of defensins as new therapeutic agents. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 33: 671-682.
4. 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 Biochem Mol Biol.*, 36: 547–560.
5. Araújo, C., Bastos-Lima, A., Janssen, A., Galvao, C., Jurberj, J., Costa, J., Azambuja, P. and Waniek, P. 2015. Genes encoding defensins of important Chagas disease vectors used for phylogenetic studies. *Parasitol Res.*, 114: 4503–4511.
6. 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*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 113: e170332.
7. Arnal, A., Waleckx, E., Rico-Chávez, O., Herrera, C. and Dumonteil, E. 2019. Estimating the current burden of Chagas disease in México: A systematic review and meta-analysis of epidemiological surveys from 2006 to 2017. *PLoS Negl Trop Dis*, 13: e0006859.
8. Aumer, T., Voisin, S. N., Knobloch, T., Landon, C. and Bulet, P. 2019. Impact of an antifungal insect defensin on the proteome of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *J Proteome Res*, 19: 1131-1146.
9. Azambuja, P., Mello, C., D'Escoffier, L. and García, E. 1989. *In vitro* cytotoxicity of *Rhodnius prolixus* hemolytic factor and mellitin towards different trypanosomatids. *Braz J Med Biol Res.*, 22: 597-599.
10. Azambuja, P., Feder, D. and García, E. 2004. Isolation of *Serratia marcescens* in the midgut of *Rhodnius prolixus*: impact on the establishment of the parasite *Trypanosoma cruzi* in the vector. *Exp Parasitol*, 107: 89–96.
11. Azambuja, P., Ratcliffe, N. A. and Garcia, E. S. 2005. Towards an understanding of the interactions of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* within the reduviid insect host *Rhodnius prolixus*. *An Acad Bras Cienc*, 77: 397-404.
12. Bahar, A. A. & Ren, D. 2013. Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals*, 6: 1543-1575.

13. Blandin, S. & Levashina, E. A. 2004. Thioester-containing proteins and insect immunity. *Mol Immunol*, 40: 903–908.
14. Bou, D. D., Tempone, A. G., Pinto, É. G., Lago, J. H. & Sartorelli, P. 2014. Antiparasitic activity and effect of casearins isolated from *Casearia sylvestris* on *Leishmania* and *Trypanosoma cruzi* plasma membrane. *Phytomedicine*, 21: 676 - 81.
15. Boulanger, N., Lowenberger, C., Volf, P., Ursic, R., Sigutova, L., Sabatier, Svobodota, Beverly, S., Späth, G., Brun, R., Pesson, B. and L., Bulet, P. 2004. Characterization of a defensin from the sand fly *Phlebotomus duboscqi* induced by challenge with bacteria or the protozoan parasite *Leishmania major*. *Infect Immun.*, 72: 7140-7146.
16. Boulanger, N., Bulet, P. and Lowenberger, C. 2006. Antimicrobial peptides in the interactions between insects and flagellate parasites. *Trends Parasitol*, 22: 262-268.
17. Brand, G. D., Leite, J. R., Silva, L. P., Albuquerque, S., Prates, M. V., Azevedo, R. B., Carregaro, V., Silva, J. S., Sá, V. C., Brandão, R. A. & Bloch, C Jr. 2002. Dermaseptins from *Phyllomedusa oreades* and *Phyllomedusa distincta*. Anti-*Trypanosoma cruzi* activity without cytotoxicity to mammalian cells. *J Biol Chem*, 277: 49332-49340.
18. Brogden, K. A. 2005. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol*, 3: 238-50.
19. Bulet, P., Stöcklin, R. and Menin, L. 2004. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol Rev*, 198: 169-184.
20. Bulet, P. & Stöcklin, R. 2005. Insect antimicrobial peptides: Structures, properties and gene regulation. *Protein Pept Lett.*, 12: 3-11.
21. Carcavallo, R. U., Jurberg, J., Lent, H., Noireau, F. F. & Galvão, C. 2000. Phylogeny of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). Edit. Gama Philo Proposals for taxonomic arrangements. Vol. 1 pp. 80-86.
22. Cárdenas-Guerra, R. E., Ortega-López, J., Flores-Pucheta, C. I., Benítez-Cardoza, C. G. & Arroyo R. 2015. The recombinant prepro region of TvCP4 is an inhibitor of cathepsin L-like cysteine proteinases of *Trichomonas vaginalis* that inhibits trichomonal haemolysis. *Int J Biochem Cell Biol.*, 59: 73-83. doi: 10.1016/j.biocel.2014.12.001.
23. Carrada-Bravo, T. 2004. *Trypanosoma cruzi*: Historia natural y diagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Rev Mex Patol Clin.*, 4: 205-219.
24. Chorev, M. & Carmel, L. 2012. The function of introns. *Front Genet*, 3: 1-15.
25. Colwell, D.D., Dantas-Torres, F. and Otranto, D. 2011. Vector-borne parasitic zoonoses: Emerging scenarios and new perspectives. *Vet Parasitol*, 182: 14-21.
26. Contreras, G., Shirdel, I., Braun, M. and Wink, M. 2020. Defensins: Transcriptional regulation and function beyond antimicrobial activity. *Dev Comp Immunol*, 104: 103556.

27. Corpet, F. 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res.*, 16: 10881-10890.
28. Corrales-García, L., Possani, L. D. & Corzo, G. 2011. Expression systems of human β -defensins: vectors, purification and biological activities. *Amino Acids.*, 40: 5-13.
29. Corrales-García, L., Ortíz, E., Castañeda-Delgado, J., Rivas-Santiago, B., Corzo, G. 2013. Bacterial expression and antibiotic activities of recombinant variants of human β -defensins on pathogenic bacteria and *M. tuberculosis*. *Protein Expr Purif.*, 89: 33–43.
30. Cortes-Jiménez, M., Noguera-Torres, B., Alejandre-Aguilar, R., Isita-Tornell, L. & Ramírez-Moreno, E. 1996. Frequency of triatomines infected with *Trypanosoma cruzi* collected in Cuernavaca city, Morelos, México. *Rev Latinoam Microbiol.*, 38: 115 - 119.
31. Costa, S., Almeida, A., Castro, A. and Domingues, L. 2014. Fusion tags for protein solubility, purification and immunogenicity in *Escherichia coli*: the novel Fh8 system. *Front Microbiol.*, 5: 63.
32. Cytryńska, M., Mak, P., Zdybicka-Barabas, A., Suder, P. & Jakubowicz, T. 2007. Purification and characterization of eight peptides from *Galleria mellonella* immune hemolymph. *Peptides*, 28: 533-46.
33. Dassanayake, R. S., Silva Gunawardene, Y. I. and Tobe, S. S. 2007. Evolutionary selective trends of insect/mosquito antimicrobial defensin peptides containing cysteine-stabilized α/β motifs. *Peptides*, 28: 62-75.
34. Dagan, A., Efron, L., Gaidukov, L., Mor, A. & Ginsburg, H. 2002. *In vitro* antiplasmodium effects of dermaseptin S4 derivatives. *Antimicrob Agents Chemother*, 46: 1059-1066.
35. Dash, T., Shafee, T., Harvey, P., Zhang, C., Peigneur, S., Deuis, J., Tytgat, J., Anderson, M., Craik, D., Durek, T., Undheim, E. 2014. A centipede toxin family defines an ancient class of CS $\alpha\beta$ defensins. *Structure*, 5: 315-326.
36. Database searching and accounting of multiplexed precursor and product ion spectra from the data independent analysis of simple and complex peptide mixtures. *Proteomics*, 9: 1696-1719.
37. De Fuentes-Vicente, J., Vidal López, D., Gutiérrez-Jiménez, J. and Schlie-Guzmán, M. 2016 Tasa de infección y tiempo de defecación de los estadios ninfales de *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811) después de la infección experimental con *Trypanosoma cruzi*. *Rev Biomed*, 27: 111-117.
38. De Fuentes-Vicente, J., Gutiérrez-Cabrera, A., Flores-Villegas, A., Lowenberger, C., Benelli, G., Salazar-Schettino, P. and Córdoba-Aguilar, A. 2018. What makes an effective Chagas disease vector? Factors underlying *Trypanosoma cruzi*-triatomine interactions. *Acta Trop*, 183: 23-31.
39. De Souza, W., Carreiro, I. P., Miranda, K. and Silva, N. L. 2000. Two special organelles found in *Trypanosoma cruzi*. *An Acad Bras Cienc*, 72: 421-32.
40. De Souza, W., de Carvalho, T. M. and Barrias, E. S. 2010. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. *Int J Cell Biol*, pii: 295394.

41. Dey, T., Afrin, F., Anam, K. & Ali, N. 2002. Infectivity and virulence of *Leishmania donovani* promastigotes: a role for media, source, and strain of parasite. *J Eukaryot Microbiol*, 49: 270-274.
42. Dias, J. C. P. O controle da doença de Chagas no Brasil. In: Silveira AC, editor. El control de la enfermedad de Chagas en los países del Cono Sur de América Historia de una iniciativa internacional. 1991/2001. Uberaba, MG: OPAS/OMS, Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro, p. 146-250.
43. Dimarcq, J., Hoffman, D., Meister, M., Bulet, P., Lanot, R., Reichhart, J. and Hoffman, J. 1994. Characterization and transcriptional profiles of a *Drosophila* gene encoding an insect defensin. A study in insect immunity. *Eur J Biochem*, 221: 201-209.
44. Dodd, R. B. & Drickamer, K. 2001. Lectin-like proteins in model organisms: implications for evolution of carbohydrate-binding activity. *Glycobiology*, 11: 71R-9R.
45. Dujardin, J. P., Steindel, M., Chavez, T., Machane, M. & Schofield, C. J. 2002. Changes in the sexual dimorphism of Triatominae in the transition from natural to artificial habitats. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 94: 565-569.
46. Durvasula, R., Gumbs, A., Panackal, A., Kruglov, O., Aksoy, S., Merrifield R., Richards, F. and Beard, C. 1997. Prevention of insect-borne disease: an approach using transgenic symbiotic bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94: 3274-3278.
47. Eaton, P., Bittencourt, C. R., Costa Silva, V., Vêras, L. M., Costa, C. H., Feio, M. J. & Leite, J. R. 2014. Anti-leishmanial activity of the antimicrobial peptide DRS 01 observed in *Leishmania infantum* (syn. *Leishmania chagasi*) cells. *Nanomedicine*, 10: 483-490.
48. Elston, D.M. 2004. Prevention of arthropod-related disease. *J Am Acad Dermatol.*, 51: 947 - 54.
49. Ericksen, B., Wu, Z., Lu, W. and Lehrer, R. 2005. Antibacterial activity and specificity of the six human α -Defensins. *Antimicrob Agents Chemother*, 49: 269-275.
50. Espinoza, B., Rico, T., Sosa, S., Oaxaca, E., Vizcaino-Castillo, A., Caballero, M. L. & Martínez, I. 2010. Mexican *Trypanosoma cruzi* T. *cruzi* I strains with different degrees of virulence induce diverse humoral and cellular immune responses in a murine experimental infection model. *J Biomed Biotechnol*, 2010: 890672.
51. Farlei, W., Uboldi, A., De Souza, D., Gemmings, H., Nicola, N. and Baca, M. 2002. A fusion protein system for the recombinant production of short disulfide-containing peptides. *Protein Expr Purif*, 26: 171-178.
52. Ferreira, R. C., Kessler, R. L., Lorenzo, M. G., Paim, R. M., Ferreira L de L, Probst, C. M., Alves-Silva, J. and Guarneri A. A. 2016. Colonization of *Rhodnius prolixus* gut by *Trypanosoma cruzi* involves an extensive parasite killing. *Parasitology*, 143: 434-443.
53. Figueredo, S., Mastroianni, J. R., Tai, K. and Ouellette, A. 2010. Expression and purification of recombinant α -defensins and α -defensin precursors in *Escherichia coli*. *Methods Mol Biol*, 618: 47-60.

54. Fuentes-Vicente, J., Vidal-López, D., Gutiérrez-Jimenez, J. and Schlie-Guzman, M. 2016. Tasa de infección y tiempo de defecación de los estadios ninfales de *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811) después de la infección experimental con *Trypanosoma cruzi*. *Rev Biomed*, 27: 111-117.
55. Ganz, T. 2003. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol*, 3: 710-720.
56. Ganz, T. 2005. Defensins: antimicrobial peptides of vertebrates. *C R Biol*, 327: 539-49.
57. Gao, B. & Zhu, S. 2013. An insect defensin-derived β -hairpin peptide with enhanced antibacterial activity. *ACS Chem Biol*, 9: 405-413.
58. García, E. S. & Azambuja, P. 1991. Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector. *Parasitol Today*, 7: 240-244.
59. García, E. S., Ratcliffe, N. A., Whitten, M. M., Gonzalez, M. S. and Azambuja, P. 2007. Exploring the role of insect host factors in the dynamics of *Trypanosoma cruzi*–*Rhodnius prolixus* interactions. *J Insect Physiol*, 53: 11-21.
60. García, E. S., Genta, F. A., de Azambuja, P. and Schaub, G. A. 2010. Interactions between intestinal compounds of triatomines and *Trypanosoma cruzi*. *Trends Parasitol*, 26: 499-505.
61. García, E. S., Gonzalez, M. S. and Azambuja, P. 1999. Biological Factors Involving *Trypanosoma cruzi* life cycle in the invertebrate vector, *Rhodnius prolixus*. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 94: 213-216.
62. Garschall, K. & Flatt, T. 2018. The interplay between immunity and aging in *Drosophila*. *F1000Res*, 7: 160.
63. Gillespie, J. P. & Kanost, M. R. 1997. Biological mediators of insect immunity. *Annu. Rev. Entomol*, 42: 611–643.
64. Gutiérrez-Cabrera, A. E., Alejandre-Aguilar, R., Hernández-Martínez, S. and Espinoza, B. 2014. Development and glycoprotein composition of the perimicrovilar membrane in *Triatoma (Meccus) pallidipennis* (Hemiptera: Reduviidae). *Arthropod Struct Dev*, 43: 571-578.
65. Hancock, R. & Diamond, G. 2000. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends Microbiol*, 8: 402-410.
66. Hancock, R., Brown, K. and Mookherjee, N. 2006. Host defence peptides from invertebrates – emerging antimicrobial strategies. *Immunobiology*, 211: 315-322.
67. Hanson, M. & Lemaitre, B. 2018. New insights on *Drosophila* antimicrobial peptide function in host defense and beyond. *Curr Opin Immunol*, 62: 22-30.
68. Hernández C., Mor. A., Dagger, F., Nicolas, P., Hernandez, A., Benedetti, EL. & Dunia, I. 1992. Functional and structural damage in *Leishmania mexicana* exposed to the cationic peptide dermaseptin. *Eur J Cell Biol*, 59: 414-424.

69. Hernández-Vargas, M., Gil, J., Lozano, L., Pedraza-Escalona, M., Ortiz, E., Encarnación-Guevara, S., Alagón, A. & Corzo, G. 2017. Proteomic and transcriptomic analysis of saliva components from the hematophagous reduviid *Triatoma pallidipennis*. *J Proteomics*, 162: 30-39.
70. Hetru, C., Troxler, L. and Hoffmann, J. A. 2003. *Drosophila melanogaster* antimicrobial defense. *J Infect Dis*, 2: S327-S334.
71. Hillyer, J. F. & Christensen, B. M. 2005. Mosquito phenoloxidase and defensin colocalize in melanization innate immune responses. *J Histochem Cytochem*, 53: 689-98.
72. Hotez, P. J., Dumonteil, E., Woc-Colburn, L., Serpa, J. A., Bezek, S., Edwards, M. S., Hallmark, C. J., Musselwhite, L. W., Flink, B. J. and Bottazzi, M. E. 2012. Chagas Disease: “The New HIV/AIDS of the Americas”. *PLoS Negl Trop Dis*, 6: e1498.
73. Hultmark, D., Steiner, H., Rasmuson, T. and Boman, H. G. 1979. Insect immunity: purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. *Eur J Biochem*, 106: 7-16.
74. Ilsayov, R. A., Gaïfullina, L. R., Saltykova, E. S., Poskriakov, A. V. and Nikolenko, A. G. 2011. Defensins in the honeybee antiinfectious protection. *Zh Evol Biokhim Fiziol*, 48: 425-32.
75. Imler, J. L. & Bulet, P. 2005. Antimicrobial Peptides in *Drosophila*: structures, activities and gene regulation. *Chem Immunol Allergy*, 86: 1-21.
76. Józefiak & Engberg, 2017. Insect proteins as a potential source of antimicrobial peptides in livestock production. A review. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 26: 87–99.
77. Júnior, N., Cardoso, M., Cândido, E., Broek, D., Lange, N., Velikova, N., Kleijn, J., Wells, J., Rezende, T., Franco, O. and Vries, O. 2018. An acidic model pro-peptide affects the secondary structure, membrane interactions and antimicrobial activity of a crotalicidin fragment. *Sci Rep*, 8: 11127.
78. Koehbach, J. 2017. Structure-activity relationships of insect defensins. *Front Chem.*, 5: 45.
79. Kollien, A., Schmidt, J. and Schaub, G. 1998. Modes of association of *Trypanosoma cruzi* with the intestinal tract of the vector *Triatoma infestans*. *Acta Tropica*, 70: 127 – 141.
80. Kollien, A., Fechner, S., Waniek, P. and Schaub, G. 2003. Isolation and characterization of a cDNA encoding for a lysozyme from the gut of the reduviid bug *Triatoma infestans*. *Arch Insect Biochem Physiol*, 53: 134-145.
81. Langen, G., Imani, J., Altincicek, B., Kieseritzky, G., Kogel, K. H., Vilcinskas, A. 2006. Transgenic expression of gallerimycin, a novel antifungal insect defensin from the greater wax moth *Galleria mellonella*, confers resistance to pathogenic fungi in tobacco. *Biol Chem*, 387: 549-57.
82. Lavine, M. D. & Strand, M. R. 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32: 1295-1309.

83. Lee, E., Jeong, K. W., Lee, J., Shin, A., Kim, J. K., Lee, J., Lee, D. G. and Kim, Y. 2013. Structure-activity relationships of cecropin-like peptides and their interactions with phospholipid membrane. *BMB Rep*, 46: 282-287.
84. Lemaitre, B., Reichhart, J. and Hoffman, J. 1997. *Drosophila* host defense: Differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. *Proc Natl Acad Sci*, 94: 14614-14619.
85. Lemaitre B. & Hoffman, J. 2007. The Host Defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu. Rev. Immunol*, 25: 697-743
86. Li, Y., Xiang, Q., Zhang, Q., Huang, Y. and Su, Z. 2012. Overview on the recent study of antimicrobial peptides: Origins, functions, relative mechanisms and application. *Peptides*, 37: 207-15.
87. Lichtenstein, A., Ganz, T., Selsted, M. and Lehrer, R. 1988. Synergistic cytolysis mediated by hydrogen peroxide combined with peptide defensins. *Cell Immunol*, 114: 104-116.
88. Lu, A., Zhang, Q., Zhang, J., Yang, B., Wu, K., Xie, W., Luan, Y. X. and Ling, E. 2014. Insect prophenoloxidase: the view beyond immunity. *Front Physiol*, 5: 252.
89. Löfgren, S., Miletto, L., Steindel, M., Bachère, E. and Barraco, M. 2008. Trypanocidal and leishmanicidal activities of different antimicrobial peptides (AMPs) isolated from aquatic animals. *Exp Parasitol*, 118: 197-202.
90. López, L., Morales, G., Ursic, R., Wolff, M. and Lowenberger, C. 2003. Isolation and characterization of a novel insect defensin from *Rhodnius prolixus*, a vector of Chagas disease. *Insect Biochem Mol Biol*, 33: 439-447.
91. Lowenberger, C., Smartt, T., Bulet, M., Severson, D., Hoffmann, J. and Christensen BM. 2003. Insect immunity: molecular cloning, expression, and characterization of cDNAs and genomic DNA encoding three isoforms of insect defensin in *Aedes aegypti*. *Insect Mol Biol*, 8: 107-118.
92. Manoel-Caetano, F. & Silva, A. E. 2007. Implications of genetic variability of *Trypanosoma cruzi* for the pathogenesis of Chagas disease. *Cad Saude Publica*, 23: 2263-2274.
93. Mannino, M., Paixao, F. and Pedrini, N. 2019. The limpet transcription factors of *Triatoma infestans* regulate the response to fungal infection and modulate the expression pattern of defensin genes. *Insect Biochem Mol Biol*, 108: 53-60.
94. Martina, B. E., Barzon, L., Pijlman, G. P., de la Fuente, J., Rizzoli, A., Wammes, L. J., Takken, W., van Rij, R. P. y Papa, A. 2017. Human to human transmission of arthropod-borne pathogens. *Current Opinion in Virology*, 22: 13-21.
95. Martínez, F., Villalobos, G., Cevallos, A., Torre, P., Lacleste, J., Alexandre-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. *Mol Phylogenet Evol*, 41: 279-287.

96. Martínez-Hernandez, F. 2008. Estudio de la variación genética del citocromo B en los vectores de la enfermedad de Chagas. Tesis de Doctorado. Facultad de Química, UNAM.
97. Martínez-Hernández, F., Martínez-Ibarra, J.A., Catalá, S., Villalobos, G., de la Torre, P., Laclette, J.P., Alexandre-Aguilar, R. and Espinoza, B. 2010. Natural crossbreeding between sympatric species of the Phyllosoma Complex (Insecta: Hemiptera: Reduviidae) indicate the existence of only one species with morphologic and genetic variations. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 82: 74-82.
98. Martínez-Ibarra, J. A., Noguera-Torres, B., Licón-Trillo, Á., Alexandre-Aguilar, R., Salazar-Schettino, P. M. and Vences-Blanco, M. O. 2014. Biological aspects of crosses between *Triatoma recurva* (Stål), 1868 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) and other members of the Phyllosoma complex. *J Vector Ecol*, 40: 117-22.
99. Martínez-Ibarra, J. A., Ventura-Rodríguez, L.V., Meillon-Isais, K., Barajas-Martínez, H., Alexandre-Aguilar, R., Lupercio-Coronel, P., Rocha-Chávez, G. and Noguera-Torres, B. 2008. Biological and genetic aspects of experimental hybrids from species of the Phyllosoma complex (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 103: 236-243.
100. Mathew, B. & Nagaraj, R. 2017. Variations in the interaction of human defensins with *Escherichia coli*: Possible implications in bacterial killing. *PLoS One*, 19; 12: e0175858.
101. Michaelson, D., Rayner, J., Couto, M. and Ganz, T. 1992. Cationic defensins arise from charge-neutralized propeptides: a mechanism for avoiding leukocyte autotoxicity? *J Leukoc Biol*, 51: 634-639.
102. Mead, G. P., Ratcliffe, N. A. & Renwanz, L. R. 1986. The separation of insect hemocyte types of percoll gradients methodology and problems. *Journal Insect Physiology*, 32: 167-177.
103. Mello, C., Azambuja, P., García, E. and Ratcliffe, N. 1996. Differential *in vitro* and *in vivo* behavior of three strains of *Trypanosoma cruzi* in the gut and hemolymph of *Rhodnius prolixus*. *Exp Parasitol*, 82: 112-121.
104. Mesquita, R., Vionette-Amaral, R., Lowenberger, C., Rivera-Pormar, R., Monteiro, F., Minx, P., Spieth, J., Carvahlo, B., Panzera, F., Lawson, D., Torres, Q., Ribeiro, M., Sorgine, M. Waterhouse, R., Montague, M., Abad-Franch, F., Alves-Becerra, M., et al. 2015. Genome of *Rhodnius prolixus*, an insect vector of Chagas disease, reveals unique adaptations to hematophagy and parasite infection. *Proc Natl Acad Sci*, 112: 14936-14941.
105. Min, K. J. & Tatar, M. 2018. Unraveling the molecular mechanism of immunosenescence in *Drosophila*. *Int J Mol Sci*, 19: 2472.
106. Monteón, V. M., Furuzawa-Carballeda, J., Alexandre-Aguilar, R., Aranda-Fraustro, A., Rosales-Encina, J. L. & Reyes, P. A. 1996. American Trypanosomiasis: *In situ* and generalized features of parasitism and inflammation kinetics in a murine model. *Experimental Parasitology*, 83: 267-274.

107. Moskalev, A., Zhikrivetskaya, S., Krasnov, G., Shaposhnikov, M., Proshkina, E., Borisoglebsky, D., Danilov, A., Peregodova, D., Sharapova, I. and Kudryavtseva, A. 2015. A comparison of the transcriptome of *Drosophila melanogaster* in response to entomopathogenic fungus, ionizing radiation, starvation and cold shock. BMC Genomics, 16: S8.
108. Muñoz, P., Thiermann, E., Atías, A. and Acevedo, C. 1992. Enfermedad de Chagas congénita sintomática en recién nacidos y lactantes. Rev. chil. Pediatr, 63: 196-202.
109. Noireau, F., Diosque, P. and Jansen, A. M. 2009. *Trypanosoma cruzi*: adaptation to its vectors and its hosts. Vet. Res, 40: 26.
110. Pandey, S., Chakraborti, P., Sharma, R., Bandyopadhyay, S., Sarkar, D., Adhya, S. 2004. Involvement of *Leishmania donovani major* surface glycoprotein gp63 in promastigote multiplication. J Biosci, 29: 15 - 22.
111. Parvy, J., Yu, Y., Dostalova, A., Kondo, S., Kurjan, A., Bulet, P., Lemaître, B., Vidal, M. and Cordero, J. B. 2019. The antimicrobial peptide defensin cooperates with tumour necrosis factor to drive tumour cell death in *Drosophila*. Elife, 20; 8, pii: e45061.
112. Pereira, K., Schmidt, F. L., Guaraldo, A. M., Franco, R. M., Dias, V. L. and Passos, L. A. 2009. Chagas' disease as a foodborne illness. J Food Prot, 72: 441-446.
113. Pérez-Morales, D. 2013. Estudio del efecto de diferentes tipos de estrés en el parásito *Trypanosoma cruzi*: consecuencias en su morfología, ultraestructura, capacidad infectiva y expresión de la proteína HSP16. Tesis de Doctorado. Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.
114. Pérez, O., Cancelarich, N., Aguilar, S., Basso, N. and Maraní, M. 2018. Genetic analysis of signal peptides in amphibian antimicrobial secretions. J Genet, 97: 1205-1212.
115. Petit, N., Casillas, S., Ruiz, A. and Barbadilla, A. 2007. Protein polymorphism is negatively correlated with conservation of intronic sequences and complexity of expression patterns in *Drosophila melanogaster*. J Mol Evol, 64: 511-518.
116. Pfaffl, M. W., Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. Nucleic Acids Res., 30: e36.
117. 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. Mem Inst Oswaldo Cruz, 110: 339-352.
118. Rassi, A., Rassi, A. and Marin-Neto, J. A. 2010. Chagas disease. Lancet, 375: 1388-1402.
119. Rassi, A., Rassi, A. and Marcondes de Rezende, J. 2012. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). Infect Dis Clin North Am, 26: 275-291.

120. Rossi, M. A., Ramos, S. G. and Bestetti, R. B. 2003. Chagas' heart disease: clinical-pathological correlation. *Front Biosci*, 8: e94-109.
121. Roy, A., Kucukural, A. and Zhang, Y. 2010. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat Prot*, 5: 725-738.
122. Sambrook, J., Fritschi, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
123. Schamber- Reis, B., Nardelli, S., Régis-Silva, C., Campos, P., Cerqueira, P., Lima, S., Franco, G., Macedo, A., Pena, S., Cazaux, C., Hoffmann, J., Motta, M., Schenkman, S., Teixeira, S. and Machado, C. 2012. DNA polymerase beta from *Trypanosoma cruzi* is involved in kinetoplast DNA replication and repair of oxidative lesions. *Mol Biochem Parasitol*, 183: 122-131.
124. Schaub, G. A. 1989. Does *Trypanosoma cruzi* stress its vectors? *Parasitology Today*, 5: 185-188.
125. Schaub, G. A. 1994. Pathogenicity of Trypanosomatids on insects. *Parasitology Today*, 10: 463-468.
126. Schaub, G. A. 2009. Interactions of Trypanosomatids and Triatomines. *Advances in insect physiology*, 37: 177-242.
127. Schlagenhaut, E., Etagens, R., Metcalf, P. 1998. The crystal structure of the *Leishmania major* surface proteinase leishmanolysin (gp63). *Structure*, 6:1035-1046.
128. Shevchenko, A., Tomas, H., Havlis, J., Olsen, J. V. and Mann, M. 2006, In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc*, 1: 2856-2860.
129. Schmoldt, H., Wentzel, A., Becker, S. and Kolmar, H. 2005. A fusion protein system for the recombinant production of short disulfide bond rich cystine knot peptides using barnase as a purification handle. *Protein Expr Purif*, 39: 82-89.
130. Schneider, T., Kruse, T., Wimmer, R., Wiedemann, I., Sass, V., Pag, U., Jansen, A., Nielsen, A., Mygind, P., Raventós, D., Neve, S., Ravn, B., Bonvin, A., De Maria, L., Andersen, A., Gammelgaard, L., Sahl, H. and Kristensen, H. 2010. Plectasin, a fungal defensin, targets the bacterial cell wall precursor lipid II. *Science*, 328: 1168-1172.
131. Schofield, C. J. & Galvão, C. 2009. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. *Acta Trop*, 110: 88-100.
132. Shaul, O. 2017. How introns enhance gene expression. *Int J Biochem Cell Biol*, 91: 145-155.
133. Souto-Pradón T. 2002. The surface charge of trypanosomatids. *An Acad Bras Cienc*, 74: 649-675.
134. Song, W., Shi, Y., Xiao, M., Lu, H., Qu, T., Li, P., Wu, G. and Tian, Y. 2009. *In vitro* bactericidal activity of recombinant human beta-defensin-3 against pathogenic bacterial strains in human tooth root canal. *Int J Antimicrob Agents*, 33: 237-243.
135. Suárez-Carmona, M., Hubert, P., Delvenne, P. and Herfs, M. 2015. Defensins: "Simple" antimicrobial peptides or broad-spectrum molecules? *Cytokine Growth Factor Rev*, 26: 361-370.

136. Teixeira, A., Gomes, C., Lozzi, S., Hecht, M., Rosa, A., Monteiro, P., Bussacos, A., Nitz, N. and McManus, C. 2009. Environment, interactions between *Trypanosoma cruzi* and its host, and health. *Cad. Saude Publica*, 25: 532-544.
137. Tonk, M. & Vilcinskas, A. 2017. The medical potential of antimicrobial peptides from insects. *Curr Top Med Chem*, 17: 554-575.
138. Torrico, F., Alonso-Vega, C., Suarez, E., Rodriguez, P., Torrico, M., Dramaix, M., Truyens, C. and Carlier, Y. 2004. Pregnancy outcome, morbidity, and mortality of congenitally infected and non-infected newborns in Bolivia. *Am J Trop Med Hyg*, 70: 201-209.
139. Tsakas, S. & Marmaras, V. J. 2010. Insect immunity and its signalling: an overview. *Invertebrate Survival Journal*, 7: 228-238.
140. Ursic-Bedoya, R., Nazzari, H., Cooper, D., Triana, O., Wolff, M. and Lowenberger, C. 2008. Identification and characterization of two novel lysozymes from *Rhodnius prolixus*, a vector of Chagas disease. *J Insect Physiol*, 54: 593-603.
141. Ursic-Bedoya, R., Buchhop, J., Joy, B., Durvasula, R. and Lowenberger, C. 2011. Prolixicin: a novel antimicrobial peptide isolated from *Rhodnius prolixus* with differential activity against bacteria and *Trypanosoma cruzi*. *Insect Mol Biol*, 20: 775-786.
142. Uvell, H. & Engström, H. 2007. A multilayered defense against infection: combinatorial control of insect immune genes. *Trends Genet*, 23: 342-349.
143. Vallejo, G., Guhl, F. and Schaub, G. 2009. Triatominae–*Trypanosoma cruzi*/T. *rangeli*: Vector–parasite interactions. *Acta Tropica*, 110: 137–147.
144. Vallejo, G., Suárez, Y., Olaya, J., Gutiérrez, S. and Carranza, J. 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. Ex. Fis. Nat*, 39: 111-122.
145. Vidal-Acosta, V., Ibáñez-Bernal, S. and 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.
146. Vieira, C., Waniek, P., Mattos, D., Castro, D., Mello, C., Ratcliffe, N., Garcia, E., 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.
147. 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.
148. Vilcinskas, A. 2013. Evolutionary plasticity of insect immunity. *Journal of Insect Physiology*, 59: 123–129.

149. Vinaouger, C., Lahondère, C., Cohuet, A., Lazzari, C. and Riffell, J. 2017. Learning and memory in disease vector insects. *Trends Parasitol*, 32: 761-771.
150. Waniek, P., Castro, H., Sathler, P., Miceli, L., Jansen, A. and Araújo, C. 2009. Two novel defensin-encoding genes of the Chagas disease vector *Triatoma brasiliensis* (Reduviidae, Triatominae): Gene expression and peptide-structure modeling. *J Insect Physiol*, 55: 840–848.
151. Waniek, P., Jansen, A. and Araújo, C. 2011. *Trypanosoma cruzi* infection modulates the expression of *Triatoma brasiliensis* def1 in the midgut. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 11: 845-847.
152. World Bank. 1993. World development report 1993: investing in health - executive summary (English). World Development Report. Washington, DC: World Bank Group. <http://documents.worldbank.org/curated/en/912621468340766666/World-development-report-1993-investing-in-health-executive-summary>
153. World-Health-Organization. Neglected tropical diseases. In: World-Health- Organization, ed. Vol http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/. Geneva; 2018: Revisado: 16/1/2020.
154. Wu, Q., Patočka, J. and Kuča, K. 2018. Insect antimicrobial peptides, a Mini Review. *Toxins (Basel)*, 10: 461.
155. Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J. and Zhang, Y. 2015. The I-TASSER Suite: Protein structure and function prediction. *Nat Methods*, 12: 7-8.
156. Yi, H., Chowdhury, M., Huang, Y. and Yu, X. 2014. Insect antimicrobial peptides and their applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 98: 5807-5822.
157. Zhang, L., Falla, T., Wu, M., Fidae, S., Burian, J., Kay, W., Hancock, R. 1998. Determinants of recombinant production of antimicrobial cationic peptides and creation of peptide variants in bacteria. *Biochem Biophys Res Commun*, 247: 674-680.
158. Zhang, Y. 2008. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics*, 9 (40).
159. Zingales, B., Andrade, S., Briones, M., Campbell, D., Chiari, E., Fernandes, O., Guhl, F., Lages-Silva, E., Macedo, A., Machado, C., Miles, M., Romanha, A., Sturm, N., Tibayrenc, M. and Schijman, A. 2009. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 104: 1051-1054.
160. Zumaya-Estrada, F., Martínez-Barnetche, J., Lavore, A., Rivera-Pomar, R., Henry Rodríguez, M. 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.

XII. APÉNDICES

Apéndice 1: Genes de defensinas en *T. pallidipennis*

Alineamientos de las secuencias de defensinas presentes en *T. pallidipennis* obtenidas a partir de las clonaciones de *def1*, *def3* y *def4* en pJET alineadas con *def1*, *def3* y *def4* de *T. brasiliensis*. En verde se marcan los intrones, los asteriscos (*) representan nucleótidos iguales.

A) Secuencias de 5 clonas obtenidas a partir del gen *def1*.

KF056971.1	ATGAAGTGCCTACTCTCTTTGGTTACTCTGTTCTTAGTGGCCGCCCTGGCTTACTCATAT	60
Def1_1	ATGAAGTGCCTACTCTCTTTGGTACTCTGTTCTTAGTGGCCGCCCTGGCTTACTCATAT	60
Def1_2	ATGAAGTGCCTACTCTCTTTGGTTACTCTGTTCTTAGTGGCCGCTCTGGCTTACTCATAT	60
Def1_3	ATGAAGTGCCTACTCTCTTTGGTTACTCTGTTCTTAGTGGCCGCCCTGGCTTATTACAT	60
Def1_4	ATGAAGTGCCTACTCTCTTTGGTTACTACTATTCTTGGTGGCCGACTGGCTTATTACAA	60
Def1_5	ATGAAGTGCCTACTCTCTTTGGTTACTCTGTTCTTGGTGGCCGACTGGCTTATTACAC	60
	***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
KF056971.1	CCAGCTGACTTAGCCAGCAACCATTAGTAAACATTTCTTTGTGAATTATTATACTCTTT	120
Def1_1	CCAGCTGAATTGGCCAGCAAGAATTAGTAAATTTATCTTTGCTAATTATTATATTCCTT	120
Def1_2	CCAGCTGAATTGGCCAGCAAGAATTAGTAAATTTATCTTTACAAATTATTATATTCCTT	120
Def1_3	CCAACAGAAATGGACTCAACAACAATTAGTAAATATATAAATTTCTTATAAGTTTACATTGT	120
Def1_4	CCAGCTGAATTGGACCCAGCAACAATTAGTAAATATTTCTTTGTGCTAC-----CATTAG	115
Def1_5	GCAGTGAATTGGACCCAGCAACAATTAGTAAATATTTCTTTGTGCTAC-----CATCAG	115
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
KF056971.1	ATATCACGTAA-TCATTTGGATCTAA-----TCATTTGTTTTATTATTTTTCTGAATTC	174
Def1_1	GTTATTAATAAATCATTGGATCAATAAGCTTGATCTAATTATTTTTTTCCCTTACTTT	180
Def1_2	GTTATTAATAAATCATTGGATCAATAAGCTTGATCTAATTATTTTTTTCCCTTACTTT	180
Def1_3	TTAAGATTGTGATTATAATATTATCTAAATCAATTCTTAAT-CTAATTTTAC-----	172
Def1_4	CTAAGATG-----GTGATTATAATATAATCAATTCTTAAT-CTAATTTTAC-----	161
Def1_5	CTAAGATG-----GTGATTACAATATAATCAATTCTTAAT-CTAATTTTAC-----	161
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
KF056971.1	AATGATAAAACCAAAATTTAGATGAAACCGAATGGGAACAACCACTGGTGAAATAACTG	234
Def1_1	CTTGGTGGAAACCAAAATTTAGATGACGCCGTATGGGAACAACCACTGGTGAAATAATTG	240
Def1_2	CTTGGTGGAAACCAAAATTTAGATGACGCCGTATGGGAACAACCACTGGTGAAATAATTG	240
Def1_3	-CAAATTTTGAACATTTGTTAGATGAAGCCCTATGGGAGCCGGCTGGTGAAGTAACCG	231
Def1_4	-CAAATTTCTTGAACATTTGTTAGATGAAGCCCTATGGGAGCCGGCTGGTGAAGTAACCG	220
Def1_5	-CAAATTTCTTGAACCTTGTCTAGATGAAGCCCTATGGGAGCCGGCTGGTGAAGTAACCG	220
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
KF056971.1	AAGAACATGGAGCCCGTCTGAAGAGAGCCACCTGTGATCTGTTTCAGTTTTCGAATCAAAAT	294
Def1_1	AAGAACATGGAGCTCGTCAAGAGAGGGCCACTTGTGATCTGCTAAGTTTTCGAATCAAAAT	300
Def1_2	AAGAACATGGAGCTCGTCAAGAGAGGGCCACTTGTGATCTGCTAAGTTTTCGAATCAAAAT	300
Def1_3	AACAACATGTAGCAGCTCTGAAAGAGCCACCTGTGATCTGTTTCAGTTTTCAGTCTAAAT	291
Def1_4	AAGAACATGTAGCCCGTCTGAAGAGAGCCACCTGTGATCTGTTTCAGTTTTCAGTCTAAAT	280
Def1_5	AAGAACATGTAGCCCGTCTGAAGAGAGCCACCTGTGATCTGTTTCAGTTTTCAGTCTAAAT	280
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
KF056971.1	GGTTTACACCTAATCATGCAGCCTGTGCCGCACATTGTATACTTCTGGGTAACCGTGGCG	354
Def1_1	GGTTTGCACCTAATCATGCAGCCTGTGCCGCACATTGTATACTTCTGGGTAACCGTGGAG	360
Def1_2	GGTTTACTCCTAATCATGCAGCCTGTGCCGCACATTGTATACTTCTGGGTAACCGTGGCG	360
Def1_3	GGGTGACACCTAACCATGCAGCCTGTGCCGCTCATTGCTACTCAGAGGAAACCGAGGTG	351
Def1_4	GGGTGACACCTAACCATGCAGCCTGTGCCGCTCATTGCTACTCAGAGGAAACCGAGGTG	340
Def1_5	GGGTGACTCCTAACCATGCAGCCTGTGCCGCTCATTGCTACTCAGAGGAAACCGAGGTG	340
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
KF056971.1	GTCATTGTGTAGGAAGTGTCTGCCATTGCAGGAAGTGA	392
Def1_1	GTCATTGTGTAGGAAGTGTCTGCCATTGCAGGAAGTGA	398
Def1_2	GCCACTGTGTAGGAAGTGTCTGCCATTGCAGGAAGTGA	398
Def1_3	GCCAATGTAAGGGAACCTATCTGCCATTGCAGGAAGTGA	389
Def1_4	GCCAATGTAAGGGAACCTATCTGCCATTGCAGGAAGTGA	378
Def1_5	GCCAATGTAAGGGAACCTATCTGCCATTGCAGGAAGTGA	378
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	

B) Secuencias de 5 clonas obtenidas a partir del gen *def3*.

```

FJ655008.1    ATGAAGTGTGCACTCTCTTTGGTTACACTATTCTTGGTGGCCGCCCTGGCTTATTCACAT    60
Def3_1         ATGAAGTGTGCACTCTCTTTGGTTACACTGTTCTTGGTGGCCGCTTTGGCTTATTCACAT    60
Def3_2         ATGAAGTGTGCACTCTCTTTGGTTACACTGTTCTTGGTGGCCGCTTTGGCTTATTCACAA    60
Def3_3         ATGAAGTGTGCACTCTCTTTGGTTACACTGTTCTTGGTGGCCGCTTTGGCTTATTCACAA    60
Def3_4         ATGAAGTGTGCACTCTCTTTGGTTACACTGTTCTTGGTGGCCGCTTTGGCTTATTCACAT    60
Def3_5         ATGAAGTGTGCACTCTCTTTGGTTACATTGTTTTGGTGGCCGCCCTGGCTTATTCACAT    60
*****
FJ655008.1    CCAGCAGAAATGGACCGAACAACAATTAGGTAATAATCCT-----TTTATGTTTAAATTC    115
Def3_1         CCAGCAGAAATGGACCGAACAACAATTAGGTAACATTCATTATGCTGAACGATTTATTTAA    120
Def3_2         CCAGCAGAAATGGACCGAACAACAATTAGGTAACATTCATTATGCTGAACGATTTATTTAA    120
Def3_3         CCAGCAGAAATGGACTCAGCAACAATTAGGTAACATTCATTATGCTGAACGATTTATTTAA    120
Def3_4         CCAGCAGAAATGGACCGAACAACAATTAGGTAACATTCATTATGCTGAACGATTTATTTAA    120
Def3_5         CCAACAGAAATGGACTCAACAACAATTAGGTAATAATATAAATTCCTTATAAGTTTACATTT    120
***          *          *          *          *          *          *          *
FJ655008.1    TTATAATTGTTTATTATAATATAATC----ATGAATTCCTTGATT---TAATTTTACCAATT    168
Def3_1         -----GGGCA---TAGTAACAATTGTATCAATAATTTGACCTAATTTTCCAAATTTTC    170
Def3_2         -----GGGCA---TAGTAACAATTGTATCAATAATTTGACCTAATTTTACCAATTTTC    170
Def3_3         -----GGGCA---TAGTAACAATTGTATCAATAATTTGACCTAATTTTCCAAATTTTC    170
Def3_4         -----GGGCA---TAGTAACAATTGTATCAATAATTTGACCTAATTTTCCAAATTTTC    170
Def3_5         TTATGATTTGTGATTATAATATTCCT-AAATCAATTCCTAATTTTACCAATTTT        179
          * * * * *          *          *          *          *
FJ655008.1    TCTCGAACCTTGTTAGATGAAGACATATGGGAGCCGGCTGGTGAAGTAACCGAAGAACAT    228
Def3_1         TTGTGAACCCTGTTAGATGAAGCCTTATGGGAGCCGGCTGGTGAAGTAACCGAAGAACAT    230
Def3_2         TTGTGAACCCTGTTAGATGAAGCCTCATGGGAGCCGGCTGGTGAAGTAACGAGAAGAACAT    230
Def3_3         TTGTGAACCCTGTTAGATGAAGCCTTATGGGAGCCGGCTGGTGAAGTAACGAGAAGAACAT    230
Def3_4         TTGTGAACCCTGTTAGATGAAGCCTTATGGGAGCCGGCTGGTGAAGTAACCGAAGAACAT    230
Def3_5         CTTGAACCATTTGTTAGATGAAGCCCTATGGGAGCCGGCTGGTGAAGTAACCGAACAACAT    239
          * * * * *          *          *          *          *          *
FJ655008.1    GTAGCCAGACTGAAGAGAGCCACCTGTGATCTGTTTCAGTTTCCAGTCTCAATGGGTGACA    288
Def3_1         GTAGCTCGTCTGAAAAGAGCCACATGTGATCTGTTTCAGTTTCCAGTCTAAATGGGTGACA    290
Def3_2         GTAGCTCGTCTGAAAAGAGCCACCTGTGATCTGTTTCAGTTTCCAGTCTAAATGGGTGACA    290
Def3_3         GTAGCTCGTCTGAAAAGAGCCACATGTGATCTGTTTCAGTTTCCAGTCTAAATGGGTGACA    290
Def3_4         GTAGCTCGTCTGAAAAGAGCCACATGTGATCTGTTTCAGTTTCCAGTCTAAATGGGTGACA    290
Def3_5         GTAGCAGTCTGAAAAGAGCCACCTGTGATCTGTTTCAGTTTCCAGTCTAAATGGGTGACA    299
***** * ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****
FJ655008.1    CCTAACCATGCAGCCTGTGCCGCTCATTGCTACTCAGAGGAAACAGAGGTGGCGAATGT    348
Def3_1         CCTAACCATGCAGCCTGTGCCGCTCATTGCTGCTCAGAGGAAACCGTGGTGGCCAATGT    350
Def3_2         CCTAACCATGCAGCCTGTGCCGCTCATTGCTACTCAGAGGAAACCGAGGTGGCCAATGT    350
Def3_3         CCTAACCATGCAGCCTGTGCCGCTCATTGCTGCTCAGAGGAAACCGTGGTGGCCAATGT    350
Def3_4         CCTAACCATGCAGCCTGTGCCGCTCATTGCTGCTCAGAGGAAACCGTGGTGGCCAATGT    350
Def3_5         CCTAACCATGCAGCCTGTGCCGCTCATTGCTACTCAGAGGAAACCGAGGTGGCCAATGT    359
** ***** ***** ***** ***** ***** ***** * ***** *****
FJ655008.1    AAAGGAACTATCTGTCACTGCAGGAAGTGA    378
Def3_1         AAGGGAACATCTGTCACTGCAGGAAGTGA    380
Def3_2         AAGGGAACATCTGTCACTGCAGGAAGTGA    380
Def3_3         AAGGGAACATCTGTCACTGCAGGAAGTGA    380
Def3_4         AAGGGAACATCTGTCACTGCAGGAAGTGA    380
Def3_5         AAAGGAACTATCTGTCACTGCAGGAAGTGA    389
** ***** ***** ***** *****

```

C) Secuencias de 5 clonas obtenidas a partir del gen *def4*.

FJ655009.1	ATGAAGTGTGCACTCTCTTTGGTTACCCTGTCTTGGTGGTCGCCCTGGCTTATTCACAT	60
Def4_1	ATGAAGTGTGCACTCTCTTTGGTTACATTGTTTTTGGTGGCCGCCCTGGCTTATTCACAT	60
Def4_2	ATGAAGTGTGCACTCTCTTTGGTTACATTGTTTTTGGTGGCCGCCCTGGCTTATTCACAT	60
Def4_3	ATGAAGTGTGCACTCTCTTTGGTTACACTGTCTTAGTGGCCGCCCTGGCTTATTCACAT	60
Def4_4	ATGAAGTGTGCACTCTCTTTGGTTACATTGTTTTTGGTGGCCGCCCTGGCTTATTCACAT	60
Def4_5	ATGAAGTGTGCACTCTCTTTGGTTACATTGTTTTTGGTGGCCGCCCTGGCTTATTCACAT	60

FJ655009.1	CCAGCAGAAATGGACTCAGCAACAATTAGGTAATATTCTTTATGTTTATGTTTGATTATG	120
Def4_1	CCAACAGAAATGGACTCAACAACAATTAGGTAATATATAAAT--TCTTATAAGTTTACATT	118
Def4_2	CCAACAGAAATGGACTCAACAACAATTAGGTAATATATAAAT--TCTTATAAGTTTACATT	118
Def4_3	CCAACAGAAATGGACTCAACAACAATTAGGTAATATATAAATATACTTCTATGTTTACATT	120
Def4_4	CCAACAGAAATGGACTCAACAACAATTAGGTAATATATAAAT--TCTTATAAGTTTACATT	118
Def4_5	CCAACAGAAATGGACTCAACAACAATTAGGTAATATATAAATATACTTCTATGTTTACATT	120

FJ655009.1	GACAATTCAATT-----AATTCTAAACTGGCTCTAATTATTACCAATT	163
Def4_1	GTTTATGATTGTGATTATAATATTATCTAAATCAATTCTTAATCTAATTTTACCAAATT	178
Def4_2	GTTTATGATTGTGATTATAATATTATCTAAATCAATTCTTAATCTAATTTTACCAAATT	178
Def4_3	GTTTAAAGATTATGGTTATAATATAATCAAT-----TATTATTTTAAATTTTACCAATT	173
Def4_4	GTTTATGATTGTGATTATAATATTATCTAAATCAATTCTTAATCTAATTTTACCAAATT	178
Def4_5	GTTTAAAGATTATGGTTATAATATAATCAAT-----TGTTATTTTAAATTTTACAATTT	173
	* * * * *	
FJ655009.1	CCACTGAACCCGTGTAGATGAAGCCCTATGGGAGCCGGCTGGTGAAGTAACCGAACAACA	223
Def4_1	TCTTGAACCATGTGTAGATGAAGCCCTATGGGAGCCGGCTGGTGAAGTAACCGAACAACA	238
Def4_2	TCTTGAACCATGTGTAGATGAAGCCCTATGGGAGCCGGCTGGTGAAGTAACCGAACAACA	238
Def4_3	CTTGAACCCGTGTGTAGATGAAGCCCTATGGGTGCCGGCTGGTGAAGTAACCGAACAACA	233
Def4_4	TCTTGAACCATGTGTAGATGAAGCCCTATGGGAGCCGGCTGGTGAAGTAACCGAACAACA	238
Def4_5	TTGTGAACCATGTGTAGATGAAGCCCTATGGGAGCCGGCTGGTGAAGTAACCGAACAACA	233
	* * * * *	
FJ655009.1	TGTAACGCGTCTGAAGAGAGCCACCTGTGATCTGTTTCAGTTTCCAGTCCAAATGGGTGAC	283
Def4_1	TGTAGCACGCTCTGAAAAGAGCCACCTGTGATCTGTTTCAGTTTCCAGTCTAAATGGGTGAC	298
Def4_2	TGTAGCACGCTCTGAAAAGAGCCACCTGTGATCTGTTTCAGTTTCCAGTCTAAATGGGTGAC	298
Def4_3	TGTAGCCCGTCTGAAGAGAGCCACATGTGATCTGTTTCAGTTTCCAATCTAAATGGGTGAC	293
Def4_4	TGTAGCACGCTCTGAAAAGAGCCACCTGTGATCTGTTTCAGTTTCCAGTCTAAATGGGTGAC	298
Def4_5	TGTAGCACGCTCTGAAAAGAGCCACCTGTGATCTGTTTCAGTTTCCAGTCTAAATGGGTGAC	293

FJ655009.1	ACCTAACCATGCAGCCTGTGCCGCTCATTGTCTACTCAGAGGAAACAGAGGTGGCCAATG	343
Def4_1	ACCTAACCATGCAGCCTGTGCCGCTCATTGTCTACTCAGAGGAAACCGAGGTGGCCAATG	358
Def4_2	ACCTAACCATGCAGCCTGTGCCGCTCATTGTCTACTCAGAGGAAACCGAGGTGGCCAATG	358
Def4_3	TCCTAACCATGCAGCCTGTGCCGCTCATTGTCTACTCAGAGGAAACCGAGGTGGCCAATG	353
Def4_4	ACCTAACCATGCAGCCTGTGCCGCTCATTGTCTACTCAGAGGAAACCGAGGTGGCCAATG	358
Def4_5	ACCTAACCATGCAGCCTGTGCCGCTCATTGTCTACTCAGAGGAAACCGAGGTGGCCAATG	353

FJ655009.1	TAAAGGAACTATCTGTCACCTGCAGGAAGTGA	374
Def4_1	TAAAGGAACTATCTGCCACTGCAGGAAGTGA	389
Def4_2	TAAAGGAACTATCTGCCACTGCAGGAAGTGA	389
Def4_3	TAAAGGAACTATCTGCCACTGCAGGAAGTGA	384
Def4_4	TAAAGGAACTATCTGCCACTGCAGGAAGTGA	389
Def4_5	TAAGGAACTATCTGCCACTGCAGGAAGTGA	384

Apéndice 2: Metodologías empleadas para la clonación y sobre expresión de defensinas en sistemas bacterianos.

Tabla A1. Plásmidos, sitios de corte para enzimas de restricción y cepas de *E. coli* utilizados para la clonación y expresión de defensinas

Defensina	^a Región de la (s) defensina (s)	Plásmido	Sitio de corte	^b Sitio de corte para CNBr	Cepa de expresión	Temperatura de inducción (°C)	Resultado
Def3 y Def4	pp+mad mad	pET-28a	<i>EcoRI/SaI</i>	MET	--	37	No se logró clonar
Def3 y Def4	pp+mad	pTZ-19R	<i>EcoRI/SaI</i>	MET	--	37	Genes clonados tuvieron mutaciones
Def3 y Def4	pp+mad	pBAD-HisB	<i>HindIII/EcoRI</i>	MET	Rosetta	37	Se logró clonar pero no expresar
Def3	Mad	pET-28a	<i>NcoI/XbaI</i>	NP	Rosetta BL21 (DE3)	30	Se logró clonar pero no expresar
Def3	Mad	pET-28a	<i>NdeI/XbaI</i>	NP	Rosetta BL21 (DE3)	30	Se logró clonar pero no expresar
Def3	Mad	pET-28a	<i>NdeI/HindIII</i>	NP	Rosetta BL21 (DE3)	30	Se logró clonar pero no expresar
Def3	Mad	pET-28a	<i>EcoRI/HindIII</i>	MET	Rosetta BL21 (DE3)	30	Clonada y expresada. ^c Corte con CNBr.
Def3 y Def4	Mad	pQE-30	<i>BamHI/HindIII</i>	NP	M15(pREP4)	30	Clonadas y no expresadas
Def1	Mad	pQE-30	<i>BamHI/PstI</i>	NP	Origami	30	Clonadas y no expresadas
Def1	Mad	pQE-30	<i>BamHI/PstI</i>	NP	M15(pREP4)	30	Se logró clonar y expresar

^aRegión que se tomó para clonar. pp+mad, región propéptido y el péptido maduro; mad, péptido maduro.

^bSitio de corte (Metionina, MET) para bromuro de cianógeno (CNBr) y así liberar los péptidos sin la etiqueta de 6x-Histidinas o no presentó sitio de corte (NP).

^cDurante la reacción química del corte se perdió la proteína, debido a esta problemática se decidió ya no considerar la adición del sitio de corte para CNBr

Apéndice 3: Secuencia obtenida de rDefl.3.

Resultado de la clonación de pQE-30_defl.3.

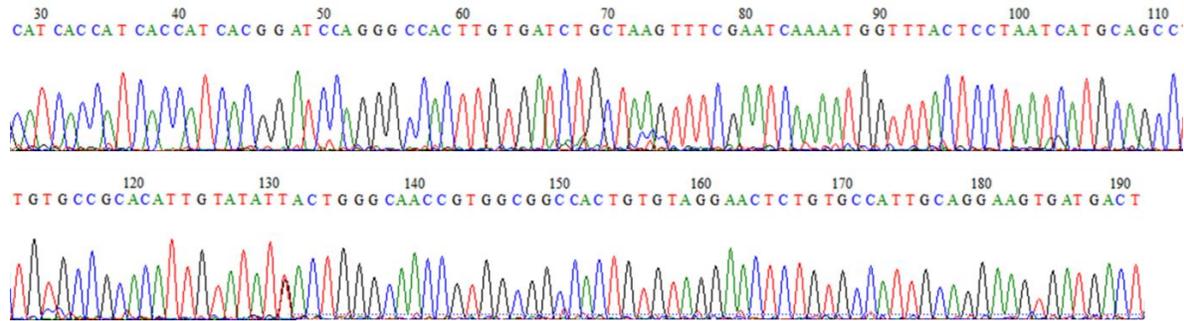


Figura A3. Electroferograma que muestra los resultados de secuenciación del plásmido pQE-30_defl.3. La secuencia está compuesta por una etiqueta de 6x-His y dos tripletes que codifican para el sitio de corte *Bam*HI en el extremo 5' y dos tripletes de paro en el extremo 3', con un total de 160 pb.

Apéndice 4: Purificación de rDefl.3 por cromatografía de afinidad (IMAC)

Purificación de rDefl.3 (5.7 kDa) por medio de cromatografía de afinidad a Níquel.

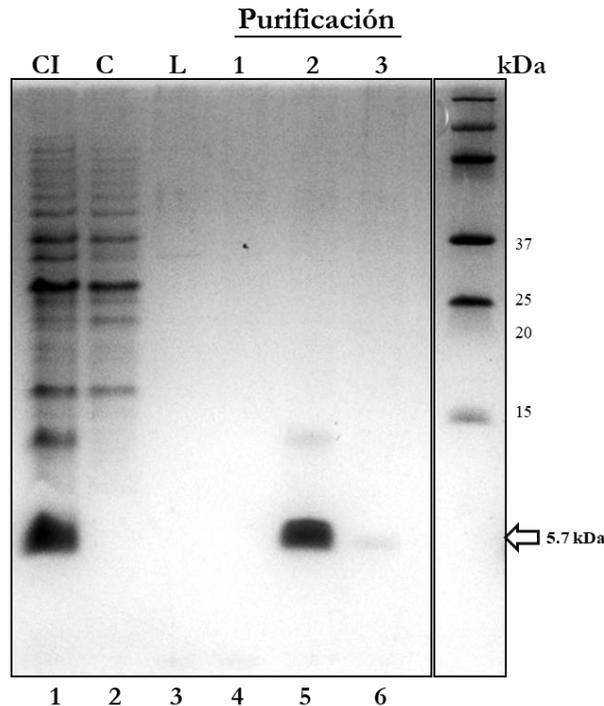


Figura A4. Purificación de rDefl.3 por columna de afinidad a Níquel (Ni-NTA). La resina cargada de Níquel para purificar rDefl por medio de su etiqueta de 6x-His, se cargó con 1.5 ml de cuerpos de inclusión solubilizados (carril 1), para eliminar contaminantes se lavó 5 veces con amortiguador de lavado (carril 2) y se eluyó con 1.6 ml de amortiguador de elución, de la cual se obtuvieron tres fracciones de elución (carriles 4-6). rDefl.3 tiene un peso molecular de 5.7 kDa. Gel SDS/PAGE-Tricina al 15 %.

Apéndice 5: Ensayos de actividad bactericida de rDefl.3

La rDefl.3 se probó contra *M. luteus* (bacteria Gram +) y *E. coli* (bacteria Gram -) por medio de ensayos de difusión en discos (Kirby-Bauer).

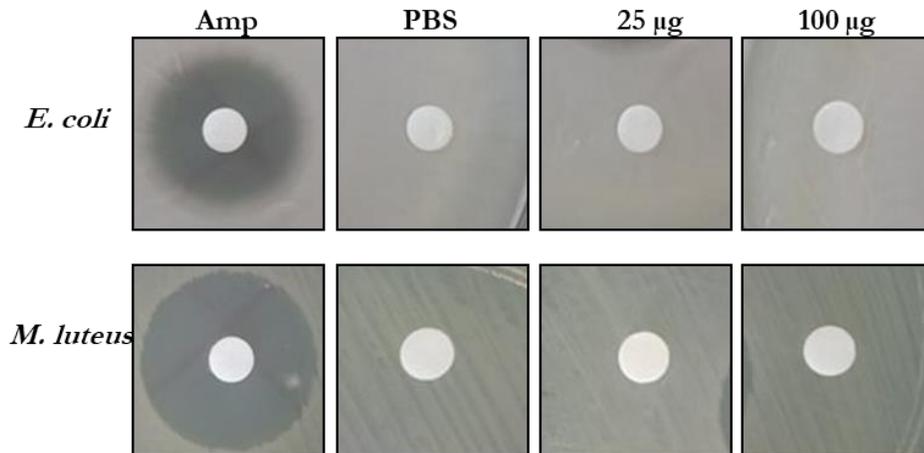


Figura A5. Ensayo de difusión en agar para la determinación de la capacidad inhibitoria de rDefl.3. Se probaron dos concentraciones de rDefl.3: 25 y 100 µg sobre *M. luteus* y *E. coli*. Como control positivo se utilizó 30 µg/ml de Ampicilina.

Apéndice 6: Ensayos de actividad sinérgica de rDefl.3 en conjunto con Peróxido de Hidrógeno (H₂O₂) contra epimastigotes de *T. cruzi*.

Tabla A2. Daño morfológico de epimastigotes de *T. cruzi* con diferentes concentraciones de H₂O₂ y en presencia/ ausencia de 21 µM de rDefl a diferentes tiempos de incubación.

Concentración de H ₂ O ₂ (µM)	rDefl.3 ^a	2 hr	4 hr	8 hr
1.5	-	20.6 ± 5.6	22.9 ± 6.9	26.9 ± 0.5
	+	18.2 ± 1.1	42 ± 11.9	26.4 ± 11
3	-	26.3 ± 1.5	20.5 ± 0.5	32.7 ± 1.8
	+	30.8 ± 1.8	41.5 ± 1.5	19.8 ± 15
10	-	31 ± 0.2	20.5 ± 2.5	34 ± 8.6
	+	33.2 ± 9.9	51 ± 5	41.3 ± 19.4
20	-	32.7 ± 8.6	17 ± 1	23.9 ± 0.3
	+	19.6 ± 3.8	52.5 ± 2.5	28.7 ± 21.2
40	-	39.8 ± 11.2	23.5 ± 2.5	29.8 ± 2.6
	+	13 ± 1.5	40 ± 2	27.5 ± 12.5

^a Presencia (+) o ausencia (-) de 21 µM rDefl ± Desviación estándar.

XIII. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

Artículos arbitrados en revistas nacionales:

- **Díaz-Garrido, P.**, Martínez-Martínez, I., Espinoza Gutiérrez, B. 2019. Presencia de péptidos en la hemolinfa de *Triatoma pallidipennis* (Hemíptera: Reduviidae) infectado con *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma rangeli* y bacterias. *Entomología Mexicana*, 6: 543 - 547. ISSN: 2448-475X.
- Martínez-Martínez, I., **Díaz-Garrido, P.**, Castro-Manreza, M. E. 2019. Filogenia y modelaje molecular de la proteína GluCl α de *Cochliomyia Hominivorax* (Coquerel, 1858, Díptera: Calliphoridae), agente causal de miasis oral. *Entomología Mexicana*, 6: 566 - 572. ISSN: 2448-475X.
- Martínez-Martínez, I., **Díaz-Garrido, P.**, Espinoza Gutiérrez, B. 2019. Análisis filogenético de una lisozima de *Triatoma (Meccus) pallidipennis* Stat, 1872 (Hemíptera: Reduviidae), vector de la enfermedad de Chagas en México. *Entomología Mexicana*, 6: 573 -579. ISSN: 2448-475X.
- **Díaz-Garrido, P.**, Santacruz-Martínez, E., Martínez-Martínez, I., De la Torre, P., Laclette, J. P., Espinoza Gutiérrez, B. 2016. Identificación de dos defensinas en el genoma de *Triatoma (Meccus) pallidipennis* (Hemíptera: Reduviidae) y una lisozima en su hemolinfa. *Entomología Mexicana*, 3: 805 – 809. ISSN: 2448-475X.

Research Article

Variability of defensin genes from a Mexican endemic Triatominae: *Triatoma (Meccus) pallidipennis* (Hemiptera: Reduviidae)

Paulina Diaz-Garrido¹, Omar Sepúlveda-Robles², Ignacio Martínez-Martínez¹ and Bertha Espinoza¹

¹Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM 04510, Ciudad de México, México; ²Catedrático CONACYT – Unidad de Investigación Médica en Epidemiología Clínica UMAE-Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Ciudad de México

Correspondence: Bertha Espinoza (bertha@biomedicas.unam.mx)



Chagas disease remains a serious health problem for countries where the most common mode of transmission is infection contracted from the feces of a Triatominae insect vector. In México, 32 species of *Triatoma* have been identified; amongst them, *Triatoma (Meccus) pallidipennis* is an endemic species reported to have high percentages of infection with *T. cruzi*. Defensins, cysteine-rich cationic peptides, are a family of antimicrobial peptides (AMPs); the synthesis of these molecules is crucial for insect's immune defense. In the present study, the genes encoding defensins in *T. pallidipennis* were sequenced with the purpose of identifying the variability of these genes in a Mexican vector of *T. cruzi*. We found 12 different genes encoding three mature peptides, all of which had the typical folding of a functional insect defensin. In this work two Defensins type 1 and one type 4 were identified. The pro-peptide domain was highly variable and the mature peptide was not. This is the first report focus on variability of defensins from an epidemiologically important *Triatoma* in México.

Introduction

Chagas disease, one of the neglected tropical diseases, is caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, the main transmission is through the feces of hematophagous insects of the Triatominae subfamily (Hemiptera: Reduviidae). It is estimated that this disease causes more than 10000 deaths per year and that 8 million people are infected with this parasite [1]. In México, this disease is spread by many species of *Triatoma*. Ramsey et al. (2015) [2] reported 31 different species in the country, including the endemic *Triatoma (Meccus) pallidipennis* (*T. pallidipennis*) that forms part of the Phyllosoma complex and colonizes extensive areas in the center of the country, living in domestic and peridomestic environments and more importantly with a natural infection index of 50% in some regions [3,4].

To control the parasite and pathogen proliferation, insect immune defense includes cellular and humoral responses. Humoral immunity consists of the generation of prophenoloxidase (PPO), hemolymph coagulation cascades, reactive oxygen species (ROS), reactive nitrogen species (RNS), and antimicrobial peptides (AMPs). Most AMPs are synthesized as inactive precursor proteins or propeptides, and active peptides or mature peptides are generated by proteolysis; these molecules have a broad spectrum of targeted organisms ranging from viruses to parasites and are produced by several species other than insects, including species of bacteria, plants, and vertebrates [5,6].

Most insect AMPs are small cationic/basic peptides with activities against bacteria and/or fungi, some AMPs also show activities against several parasites and viruses [7,8]. The fat body of insects is the main organ responsible for the production of AMPs, which can diffuse into the hemolymph and circulates throughout the entire insect body [9]. They can also be secreted by the gut epithelial cells, where parasites

Received: 23 June 2018
 Revised: 16 August 2018
 Accepted: 30 August 2018

Accepted Manuscript Online:
 04 September 2018
 Version of Record published:
 28 September 2018

such as *T. cruzi* might interact directly with them, in addition to other potential pathogens acquired during feeding [10,11].

Insect defensins are a family of AMPs, distinguished for having six conserved cysteine residues that are linked in three pairs of disulphide bridges (Cys^I-Cys^{IV}, Cys^{II}-Cys^V, and Cys^{III}-Cys^{VI}) and form a consensus folding pattern consisting of the cysteine-stabilized α -helix β -sheet (CS $\alpha\beta$) motif that is the active site of the domain for antimicrobial activity [12–16]. These cationic peptides have a molecular mass of approximately 4 kDa, are typically 33–46 amino acid residues long and show activity mainly against Gram-positive bacteria through a channel-forming mechanism [5,17,18].

Several AMPs have already been found in different species of Triatominae such as *Rhodnius prolixus*, *T. brasiliensis* and *T. infestans*. The only sequenced genome of a hemipteran is that of *R. prolixus*, where 11 genes of defensins were identified [19]. Two transcriptomic analyses of *T. pallidipennis* have been reported, including one of the salivary glands, where no AMPs were found [20]. The other transcriptomic analysis reported eight transcripts of defensins and three transcripts of lysozymes [21].

These facts and their importance for immune response are reasons to explore in detail the variability of the defensin-encoding genes in other important Triatominae vectors of Chagas disease.

Most of the published studies on this topic focus on the expression of mRNA of South American species such as *T. infestans* and some members of the *T. brasiliensis* complex (*T. brasiliensis*, *T. sherlocki*, or *T. juaqueirensis*), where the expression of these molecules in different organs has been analyzed [22–26].

Information on other important vectors of Chagas disease from the northern part of the continent is missing, for this reason the aim of the present study was to analyze the variability of defensin genes in the genome of the Mexican endemic bug *T. pallidipennis*. We present a comparative analysis with other defensins previously described and the predicted structures of the mature peptides using two different computational tools for the modeling of the molecules. The presented results offer the possibility of interpreting the phylogenetic relationships of hemipteran defensins, and the predicted mature peptide sequences could provide information for the development of novel drug targets.

Materials and methods

Insect origin and maintenance

For this work, we used adult females of *T. pallidipennis*. The insects were maintained in a colony at the Laboratorio de Estudios sobre la Tripanosomiasis Americana, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, under controlled temperature and humidity. The insects were fed with rabbit blood, and all the procedures were carried out according to the Ethic Code of the Instituto de Investigaciones Biomédicas for animal care.

Genomic DNA isolation

Genomic DNA was isolated from both the fat body and digestive tract (washed several times with saline solution to eliminate intestinal contents) and combined; the organs were macerated in 1 ml of lysis solution (50 mM Tris/HCl, pH 8; 100 mM EDTA, pH 8; 100 mM NaCl; 1% SDS, and 20 μ g/ml RNase) and incubated at 37°C overnight. The phenol chloroform technique was used to extract DNA [27]. Nucleic acid integrity and concentration were quantitated using a NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) and checked by gel electrophoresis. The DNA was kept at 4°C until used.

Gene amplification cloning and sequencing

The specific forward and reverse primers used to amplify defensin genes of *T. pallidipennis* were designed using the sequences encoding Def1, Def3, and Def4 of *T. brasiliensis* reported by Aratjo et al. (2006) [22] and Witek et al. (2009) [25]: [Def1 – Fwd (5'-GGCGCCATGAAGTGGCCACTCTCTTTG-3'), Def1 – Rev (5'-CATTGCAGGAAGTGAATTGATGCTTGGG-3'), Def3 – Fwd (5'-GGCGCCATGAAGTGGCCACTCTCTTTG-3'), Def3 – Rev (5'-CTATCTGTCACTGCAGGAAGTGAAGTGGG-3'), Def4 – Fwd (5'-GGCGCCATCATGAAGTGGCCACTCTCT-3') and Def4 – Rev (5'-CACTGCAGGAAGTGAAGAGTGGCTTGGG-3')]. PCRs were performed in a T100 thermal cycler (Bio-Rad, Inc); after one initial cycle of 95°C for 5 min, PCR was carried out for 30 cycles (1 min at 94°C, 1 min at 70°C (Def1-oligos) or 70°C (Def3/Def4-oligos), and 1 min at 72°C), followed by a final elongation step of 10 min at 72°C. The putative defensin genes that were amplified (~400 bp) were purified by cutting the gel band and cloning into pJET using a CloneJet PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific, Inc) following the manufacturer's instructions. Finally, plasmids were isolated from 15 randomly selected clones and sequenced (five sequences per gene: Def1, Def3, and Def4) using a pJET1.2 forward sequencing primer (5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC-3'). The sequencing was done with the Sanger technique, using ABI PRISM 3100 equipment.

Analysis of sequences and identities

T. pallidipennis intron and mRNA sequence identification was performed by alignment using the data from the GenBank Def1 (AY641574.1), Def3 (EU694177.1), and Def4 (EU694178.1) mRNA nucleotide sequences of *T. brasiliensis*. The amino acid sequences were deduced with the translate tool from ExPASy and aligned with the MultAlin server <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html> [28]. Predicted signal peptide cleavage sites and propeptide cleavage sites were calculated using the ProP 1.0 Server of Technical University of Denmark (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ProP/>). Molecular masses, isoelectric points, and other protein parameters were determined with the ExPASy Bioinformatics Resource Portal web server.

Phylogenetic analysis

Molecular phylogenetic analyses were conducted with the maximum likelihood (ML) method in MEGA6 software, based on the Tamura 3-parameter model. A discrete γ distribution was used to model evolutionary rate differences amongst sites (five categories (+G, parameter = 2.2566)). The rate variation model allowed some sites to be evolutionarily invariable. The best model was established from a set of 465 nts. There was a total of 465 positions in the final dataset. The analysis involved 32 nucleotide sequences. The codon positions included were 1st+2nd+3rd+noncoding. Ten thousand replicates were used for the analyses. Bayesian inferences (BIs) of *T. pallidipennis* defensin relationships were performed using MrBayes software. Support node values were obtained from 1000000 generations and are shown next to the branches. The evolutionary distances were computed using the GTR substitution model with γ -distributed rate variation across sites and a proportion of invariable sites. The analysis involved a final dataset of 32 nucleotide sequences and a total of 465 positions (gaps included). The analysis was terminated when the S.D. of split frequencies = 0.0091. A matrix of genetic distances was calculated with MEGA6 software with the data used for the ML analysis.

Structure prediction of mature peptides

The three sequences coding for the mature peptides were sent to the I-TASSER server for tertiary structure prediction [29–31], which is available at <http://zhanglab.cmb.med.umich.edu/I-TASSER/>. The models were refined by energy minimization using YASARA (15097).

Results

Characteristics of the defensin genes from *T. pallidipennis*

Oligonucleotides that comprised the 5' and 3' UTR regions were generated using the previously reported sequences of *T. brasiliensis* Def1, Def3, and Def4. Using genomic DNA as a template and PCR amplification, we obtained amplicons of 400 bp for each gene. The PCR products were cloned into the pJET plasmid to obtain complete gene sequences.

The 15 sequences of *T. pallidipennis* defensins obtained (five for each gene) were aligned with the defensin sequences reported for *T. brasiliensis* to identify the intron position (Figure 1). From these 15 sequences obtained initially, 12 different genes were identified (GenBank accession numbers: MH000324, MH000325, MH000326, MH000327, MH000328, MH000329, MH000330, MH000331, MH000332, MH000333, MH000334, and MH000335).

The sequences obtained with the Def1 oligos present more variability in both the position and the size of the intron as well as in its composition. The introns begin between positions 88 and 93, while the sizes of the introns oscillate between 95 and 112 bp (Figure 1A). The sequences obtained from the amplicons generated with the Def3 oligos are more homogeneous; 3.1 and 3.4 have the same sequence, and in all the sequences, the intron begins at position 89 and ends at position 186. Therefore, the sequences have a size of 97 bp. However, Def3.5 has 106 bp, since it ends at position 195 (Figure 1B). Finally, the sequences obtained with the Def4 oligos, Def4.1, Def4.2, and Def4.4, are the same; the intron begins at position 61 and ends at nucleotide 167, for a length of 106 bp. In the case of Def4.3 and Def4.5, the intron ends at position 162 and consists of 101 bp (Figure 1C).

Characterization of amino acids of defensin genes from *T. pallidipennis*

The genes were edited *in silico*, and bioinformatics analysis was performed to identify the signal peptide, propeptide, and mature peptide (Figure 2). Of the 12 sequences, 10 had 93 aa, and two had 94 aa, with those in the latter category having an extra Glutamine (Q) at position 36 (Def1.1 and Def1.2). The signal peptide is the same for almost all the sequences [MKCALSLVTLFLVAALAYS], however Def1.1 have Alanine (A) on the 8th position unlike the others sequences that have Valine (V) in this position; nevertheless, the propeptide is the most variable region, since eight

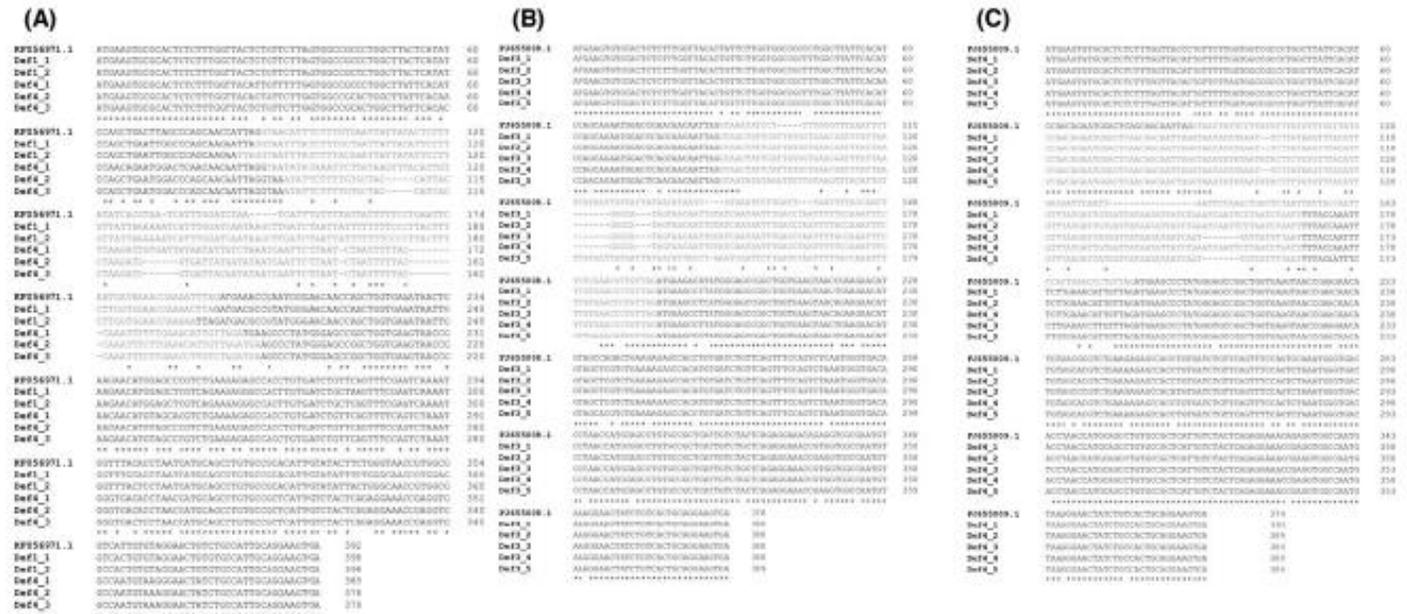


Figure 1. Defensin gene sequences of *Triatoma (Meccus) pallidipennis*
 Each alignment consists of five sequences per gene: Def1, Def2, Def3, and Def4. The sequences consist of two exons and one intron. Each set of sequences was aligned with Def1 (KF056971.1), Def3 (FJ655008.1), and Def4 (FJ655009.1) from *T. brasiliensis*. (A) The set from Def1, varies both in size and position and all the sequences are different. (B) From Def3, the position of the intron is the same for all the sequences, also Def3.1 and Def3.4 are identical. (C) In the Def4 set, the position of the intron is the same, Def4.1, Def4.2, and Def4.4 are identical. The intron is presented in gray color. Identical nucleotides between the sequences is indicated by asterisks.

	Signal peptide	Propeptide	Mature peptide
Def1.1	(M8000324)	MKCALSLATLFLVVALAYSTPAELAQQLSDWYWGQPTGKIIEEISGAPGCRATCCLLSELSRHWAPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK	FLRGGGHCVGTVCHCRK
Def1.2	(M8000325)	MKCALSLATLFLVVALAYSTPAELAQQLSDWYWGQPAGEIIEEISGAPGCRATCCLLSELSRHWAPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK	FLRGGGHCVGTVCHCRK
Def4.1	(M8000320)	MKCALSLATLFLVVALAYSTPTENTDQGLDIALMR-PAGEVTEESVWFLKRVATCDLFSFGQSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK	FLRGGGHCVGTVCHCRK
Def4.2	(M8000327)	MKCALSLATLFLVVALAYDQPAEWTQQGLDIALMR-PAGEVTEESVWFLKRVATCDLFSFGQSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK	FLRGGGHCVGTVCHCRK
Def4.3	(M8000328)	MKCALSLATLFLVVALAYDQPAEWTQQGLDIALMR-PAGEVTEESVWFLKRVATCDLFSFGQSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK	FLRGGGHCVGTVCHCRK
Def4.4	(M8000329)	MKCALSLATLFLVVALAYDQPAEWTQQGLDIALMR-PAGEVTEESVWFLKRVATCDLFSFGQSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK	FLRGGGHCVGTVCHCRK
Def4.5	(M8000330)	MKCALSLATLFLVVALAYDQPAEWTQQGLDIALMR-PAGEVTEESVWFLKRVATCDLFSFGQSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK	FLRGGGHCVGTVCHCRK
Def4.6	(M8000331)	MKCALSLATLFLVVALAYDQPAEWTQQGLDIALMR-PAGEVTEESVWFLKRVATCDLFSFGQSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK	FLRGGGHCVGTVCHCRK
Def4.7	(M8000332)	MKCALSLATLFLVVALAYDQPAEWTQQGLDIALMR-PAGEVTEESVWFLKRVATCDLFSFGQSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK	FLRGGGHCVGTVCHCRK
Def4.8	(M8000333)	MKCALSLATLFLVVALAYDQPAEWTQQGLDIALMR-PAGEVTEESVWFLKRVATCDLFSFGQSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK	FLRGGGHCVGTVCHCRK
Def4.9	(M8000334)	MKCALSLATLFLVVALAYDQPAEWTQQGLDIALMR-PAGEVTEESVWFLKRVATCDLFSFGQSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK	FLRGGGHCVGTVCHCRK
Def4.10	(M8000335)	MKCALSLATLFLVVALAYDQPAEWTQQGLDIALMR-PAGEVTEESVWFLKRVATCDLFSFGQSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK	FLRGGGHCVGTVCHCRK

Figure 2. Amino acids translated from gene-coding defensins

The 12 different sequences were translated to amino acids, only two correspond to defensin type 1 (Def1.1 and Def1.2) which have an extra aa (Q). The others ten sequences, correspond to defensin type4, in which the propeptide is the more variable region. Only three different mature peptides were obtained. Identical amino acid residues between the sequences are indicated below the alignment sequences by *; (.) indicates conservation between groups of strongly similar properties and (.) indicates conservation between groups of weakly similar properties. The signal peptide, propeptide, and mature peptide are marked.

			-Sheat		α-Defin		-Sheat
			C ₁		C ₁ C ₂		C ₃ C ₄ C ₅
TpDef1.1			ATDGLLSEFSGSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK		ATDGLLSEFSGSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK		ATDGLLSEFSGSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK
TpDef1.2			ATDGLLSEFSGSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK		ATDGLLSEFSGSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK		ATDGLLSEFSGSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK
TpDef4			ATDGLLSEFSGSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK		ATDGLLSEFSGSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK		ATDGLLSEFSGSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK
ACD1180.1	<i>T. brasiliensis</i>	def2	ATDGLLSEFSGSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK		ATDGLLSEFSGSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK		ATDGLLSEFSGSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK
ARY02972.1	<i>T. brasiliensis</i>	def1	ATDGLLSEFSGSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK		ATDGLLSEFSGSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK		ATDGLLSEFSGSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK
ARY02949.1	<i>R. nasutus</i>	defB	ATDGLLSEFSGSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK		ATDGLLSEFSGSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK		ATDGLLSEFSGSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK
AAD74625.1	<i>R. prolixus</i>	defB	ATDGLLSEFSGSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK		ATDGLLSEFSGSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK		ATDGLLSEFSGSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK
AAD74624.1	<i>R. prolixus</i>	defA	ATDGLLSEFSGSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK		ATDGLLSEFSGSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK		ATDGLLSEFSGSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK
ARY02961.1	<i>T. sheelei</i>	def3aa	ATDGLLSEFSGSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK		ATDGLLSEFSGSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK		ATDGLLSEFSGSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK
ACD1181.1	<i>T. brasiliensis</i>	def4	ATDGLLSEFSGSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK		ATDGLLSEFSGSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK		ATDGLLSEFSGSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK
ARY02984.1	<i>T. b. macroleasoma</i>	def4	ATDGLLSEFSGSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK		ATDGLLSEFSGSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK		ATDGLLSEFSGSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK
ARY02953.1	<i>T. jussaraensis</i>	def4	ATDGLLSEFSGSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK		ATDGLLSEFSGSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK		ATDGLLSEFSGSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK
ARY02955.1	<i>T. sheelei</i>	def4	ATDGLLSEFSGSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK		ATDGLLSEFSGSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK		ATDGLLSEFSGSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK
ARY02954.1	<i>T. melanos</i>	def4	ATDGLLSEFSGSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK		ATDGLLSEFSGSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK		ATDGLLSEFSGSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK
ARY02939.1	<i>R. nasutus</i>	defA	ATDGLLSEFSGSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK		ATDGLLSEFSGSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK		ATDGLLSEFSGSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK
ARY02962.1	<i>T. sheelei</i>	def3aa	ATDGLLSEFSGSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK		ATDGLLSEFSGSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK		ATDGLLSEFSGSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK
ARK27891.1	<i>T. infestans</i>	def	ATDGLLSEFSGSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK		ATDGLLSEFSGSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK		ATDGLLSEFSGSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK
ARY02937.1	<i>J. megistus</i>	defB	ATDGLLSEFSGSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK		ATDGLLSEFSGSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK		ATDGLLSEFSGSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK
AL293398.1	<i>R. nasutus</i>	defC	ATDGLLSEFSGSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK		ATDGLLSEFSGSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK		ATDGLLSEFSGSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK
AAD74624.1	<i>R. prolixus</i>	defC	ATDGLLSEFSGSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK		ATDGLLSEFSGSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK		ATDGLLSEFSGSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK
ARY02938.1	<i>J. megistus</i>	defA	ATDGLLSEFSGSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK		ATDGLLSEFSGSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK		ATDGLLSEFSGSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK
ARY02981.1	<i>T. cordata</i>	def1	ATDGLLSEFSGSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK		ATDGLLSEFSGSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK		ATDGLLSEFSGSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK
ABD61804.1	<i>T. infestans</i>	def	ATDGLLSEFSGSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK		ATDGLLSEFSGSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK		ATDGLLSEFSGSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK
ARY02979.1	<i>T. sheelei</i>	def1	ATDGLLSEFSGSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK		ATDGLLSEFSGSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK		ATDGLLSEFSGSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK
ARY02473.1	<i>T. jussaraensis</i>	def1	ATDGLLSEFSGSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK		ATDGLLSEFSGSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK		ATDGLLSEFSGSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK
ARY02989.1	<i>T. b. macroleasoma</i>	def1a	ATDGLLSEFSGSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK		ATDGLLSEFSGSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK		ATDGLLSEFSGSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK
ARY02959.1	<i>T. melanos</i>	def1	ATDGLLSEFSGSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK		ATDGLLSEFSGSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK		ATDGLLSEFSGSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK
AA811504.1	<i>A. aegypti</i>	defA1	ATDGLLSEFSGSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK		ATDGLLSEFSGSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK		ATDGLLSEFSGSNVTPKAAACAAKCIFLRGGGHCVGTVCHCRK

Figure 3. Alignment of predicted *T. pallidipennis* defensins with other *Triatominae* defensins

Twenty-five defensins' sequences were alignment with TpDef1.1, TpDef1.2, and TpDef4. All the sequences showed the six cysteines in the same position and the sequences have the same size. TpDef4 from *T. pallidipennis* are in red bold. Identical and similar amino acid residues between the defensins are indicated below the alignment sequences by asterisks and dots respectively; (.) indicates conservative substitution, (.) indicate less conservative substitution. Cysteine residues forming the disulphide bridges are gray shaded. The sequence of *A. aegypti* is shown for comparison.

different sequences were obtained, and all of them present the cleavage site KR (Lysine-Arginine). Interestingly, from the 12 different sequences, only 3 different mature peptides were found. Two correspond to Def1 (named TpDef1.1 and TpDef1.2), with only one different aa Alanine (A) for Threonine (T). The other ten sequences coded for the same mature *T. pallidipennis* defensin, which was named TpDef4 (Figure 3). An alignment was made using the 3

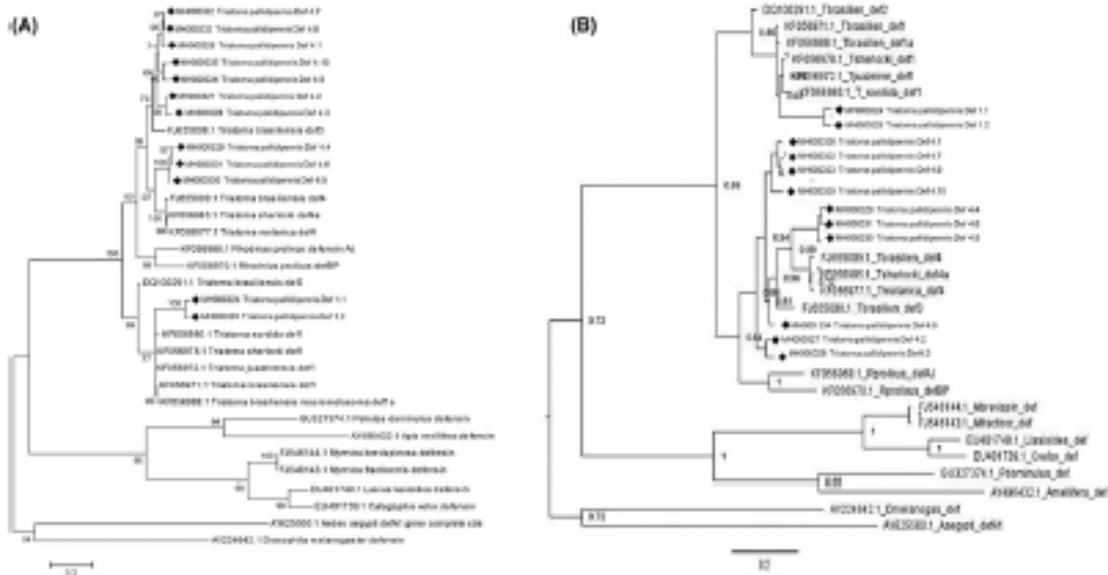


Figure 4. Phylogenetic analysis of defensins

(A) Molecular phylogenetic analysis by ML method. The evolutionary history was inferred by using the ML method based on the Tamura 3-parameter model. Initial tree(s) for the heuristic search were obtained by applying the Neighbor-Joining method to a matrix of pairwise distances estimated using the Maximum Composite Likelihood (MCL) approach. A discrete γ distribution was used to model evolutionary rate differences amongst sites. The rate variation model allowed for some sites to be evolutionarily invariable. There were a total of 465 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA6. (B) Bayesian analysis of *T. pallidipennis* defensins. Phylogenetic relationship was established using the MrBayes software. The node values were obtained from 1000000 generations and were showed next to the branches. The evolutionary distances were computed using the GTR substitution model with γ -distributed rate variation across sites and a proportion of invariable sites. The analysis involved 32 nucleotide sequences and a total of 465 positions in the final dataset (gaps including). S.D. deviation of split frequencies = 0.0001. ♦ *T. pallidipennis* defensins.

different mature peptides and 24 reported sequences of defensins in other *Triatoma* species, including one defensin from *Aedes aegypti*. All the sequences have six characteristic cysteines in the same position; furthermore, the size is the same for all the sequences, except for the dipteran defensin.

Phylogenetic analysis

ML and BI phylogenetic analyses were performed to establish the phylogeny of defensin sequences of *T. pallidipennis* with respect to other sequences of South American Triatominae. The trees from the BI and ML analyses were nearly identical in topology, since all the Def1 sequences are grouped in the same clade, and the Def4 sequences are grouped in a different clade that shows subclades and branch lengths at only a few nodes. Both methods showed Triatominae defensins as a monophyletic group with high support. In the gene tree inferred from ML and BI analyses, the TpDef1.1 and TpDef1.2 sequences are situated in the Triatominae defensin 1 clade with strong statistical support. However, in both analyses, defensin 1 sequences of *T. pallidipennis* show clear differences compared with the defensin 1 sequences of the South American Triatominae species, which form a subgroup with strong support. Additionally, the length of the branch shows that defensin 1 sequences of *T. pallidipennis* have accumulated a greater number of changes than the other sequences of the same subgroup (Figure 4).

In contrast, the sequences of defensins 4.1 to 4.10 show diversity. Some of them are more similar to the defensin 4 sequences reported in South American Triatominae species, while others form clearly separated subgroups. However, amongst them, there is similarity, which is evident when comparing their genetic distances (Table 1).

Table 1 Genetic distances between defensins

	Def1.1	Def1.2	Def4.1	Def4.2	Def4.3	Def4.4	Def4.5	Def4.6	Def4.7	Def4.8	Def4.9	Def4.10
Def1.1		0.01	0.06	0.06	0.06	0.07	0.07	0.07	0.06	0.06	0.06	0.07
Def1.2	0.03		0.05	0.05	0.05	0.06	0.06	0.06	0.05	0.05	0.05	0.06
Def4.1	0.37	0.35		0.02	0.02	0.03	0.03	0.03	0.01	0.01	0.02	0.01
Def4.2	0.37	0.34	0.07		0.01	0.03	0.03	0.03	0.02	0.02	0.02	0.02
Def4.3	0.38	0.35	0.09	0.03		0.03	0.03	0.03	0.02	0.02	0.02	0.03
Def4.4	0.45	0.40	0.17	0.18	0.20		0.01	0.01	0.03	0.03	0.03	0.03
Def4.5	0.46	0.41	0.16	0.16	0.18	0.03		0.01	0.03	0.03	0.03	0.03
Def4.6	0.45	0.40	0.17	0.17	0.19	0.01	0.01		0.03	0.03	0.03	0.03
Def4.7	0.38	0.36	0.02	0.08	0.10	0.16	0.15	0.16		0.00	0.02	0.01
Def4.8	0.38	0.35	0.01	0.08	0.10	0.17	0.16	0.17	0.00		0.02	0.01
Def4.9	0.41	0.39	0.07	0.10	0.12	0.15	0.15	0.15	0.07	0.06		0.01
Def4.10	0.45	0.42	0.04	0.11	0.13	0.17	0.16	0.17	0.04	0.04	0.05	

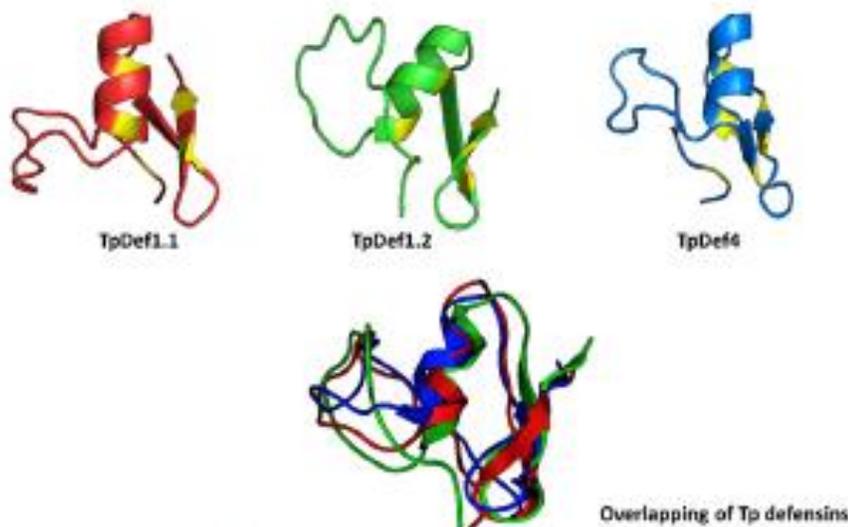


Figure 5. Molecular modeling of Tp defensins

Theoretic mature peptides were generated using I-TASSER. All exhibit the same structural topology conformed by three disulphide bonds as well as an α -helix and β -sheets, which are known as cysteine-stabilized (CS $\alpha\beta$) motif. Cysteines are marked in yellow. An overlapping of the three mature peptides is also shown.

Modeling by homology

Molecular modeling of the three theoretical mature peptides was carried out using I-TASSER. All the mature peptides exhibit the same structural topology characterized by three disulphide bonds, an α -helix and β -sheets, which are known as the cysteine-stabilized (CS $\alpha\beta$) motif. TpDef1.1 and TpDef1.2 differ only in two amino acid residues: Alanine replaced by Tryptophan (W), localized in the loop, and Phenylalanine (F) replaced by Leucine (L) in the helix. The TpDef4 sequences have eight different amino acids with respect to TpDef1.1 and TpDef1.2; these changes are located throughout the secondary structure. When overlapping the models of these peptides, it is obvious that the changes in the amino acids do not alter the final conformation of the molecules (Figure 5).

Discussion

A high degree of sequence conservation exists in invertebrate defensins [32,33], which indicates the biological importance of these molecules. In Hemipteran insects, previous studies have demonstrated that the expression of these peptides not only varies in the organ/tissue of origin but also depends on the type of pathogen to which the insect is exposed [34,35].

The immune system in the midgut of insects is one of the most exposed tissues since it is always in contact with a variety of microorganisms. *T. cruzi* is only found in the digestive tract of the Triatominae, so the production of AMPs in the insect gut is therefore vital to protect against infection and to maintain homeostasis of the intestinal microbiota [36,37]. Yet, few studies focus on the expression of the defensin-encoding genes in the presence of *T. cruzi*. One study in which *R. prolixus* was infected with different *T. cruzi* strains showed that the infection with Dm 28c induced an increase in defensin transcripts in contrast with the infection with Y strain [11,37]. It suggests that depending on the genetic lineage of the *T. cruzi* strain the defensin response could be different.

With respect to the percentage of infection by *T. cruzi* and defensin expression there are few studies, nevertheless, *T. pallidipennis* seems to have less infection than *T. dimidiata* or *T. barberti* [3,38], indicating a possible role in the diversity of defensins on the control of parasitemia. But more studies need to be done to clearly elucidate this point.

In the present study female insects were used. It will be interesting to analyze male insects in the future, but until now there are few studies that focus in the parasitemia related to the sex of the insects and they do not show a clear correlation between sex and infection mainly because the number of insects was small and difference in the number of females and males infected was not significant [3,39]. In our personal experience both females and males have similar rates of infections (data not published).

We characterized 12 genes that code for defensins in a Mexican endemic *Triatoma*, and our results indicate that the variability of the genes lies mainly in the introns (position, composition, and size). The 12 ORFs presented a signal peptide with 19 amino acid residues, and the largest difference amongst the amino acid sequences is at the propeptide level. The sequences Def1.1 and Def1.2 have 32 amino acid residues in the propeptide region, while the other sequences have 31 amino acids. Additionally, the KR cleavage site at the end of the propeptide region is conserved in all sequences and in other Triatominae defensins [34].

Three mature peptides from the 12 sequenced genes were obtained, named TpDef1.1, TpDef1.2, and TpDef4. Furthermore, the intermediate region in the signal peptide and the mature peptide is highly variable, as has been reported for *R. prolixus* [34]. The specific biological function of the intermediate region is unknown, but it can participate in the cellular trafficking of the immature peptide; this has been reported for the human BMP protein, for which changes in the sequence of this region slow the secretion of this peptide [40].

The results indicate that the mature peptide is highly conserved and similar to all Hemipteran sequences used in the comparative analysis, especially at the position of the six cysteine residues that permit the formation of three disulphide bridges. These data differ from those reported for mammalian defensins, particularly with β -defensins, where a high variability in the antimicrobial domain has been identified and the functional diversity may depend on the structural variation in the β -defensins. This may be due to the diverse and changing microbial environment in their habitats and for a better deal with of a broader range of pathogens [41].

In the phylogenetic analyses using the genomic sequences, a clear separation of the Triatominae defensins from the sequences of other arthropods was observed, as previously reported [42]. In the Triatominae branch of the phylogenetic trees, a clear separation of two groups of defensins was observed: two type-1 sequences and ten type-4 sequences. The type-1 defensin sequences of *T. pallidipennis* are clearly distant from the South American species sequences, a result of a greater accumulation of changes, reflected in a greater length of branches in the phylogenetic tree (Figure 4). Something similar has been observed when comparing other *T. pallidipennis* proteins such as trialectins and triabtns, which, despite their similarity in function and structure, are clearly separated from their South American counterparts [43]. However, despite these differences, Def 1.1 and Def 1.2 of *T. pallidipennis* show a close evolutionary relationship as members of the defensin 1 clade. The sequences of defensin type 4 of *T. pallidipennis* are grouped in the phylogenetic trees and separated from the type-1 defensin sequences.

Additionally, the defensins of the *Triatoma* genus are clearly separated from the *Rhodnius* genus sequences, as previously described [26]. Furthermore, three sequences (Def 4.4, Def 4.5, and Def 4.6) in both the ML and Bayesian analyses are closely related to type-4 defensins of *T. brasiliensis*, *T. sherlocki*, and *T. melanica*, suggesting a close evolutionary relationship amongst them. TpDef4 is coded by ten sequences (Def4.1–Def4.10). This result suggests that this defensin has experienced a duplication phenomenon for retroposition or nonallelic homologous recombination between transposable elements [44], indicating their possible relevance, as has been demonstrated with A and J defensins that are secreted in the intestine and fat body in *R. prolixus* in response to bacterial challenge [34].

This phenomenon should be explored further, since it has been shown that some families of human defensins such as DEFB4 have between 2 and 12 copies per genome [45]. Another possibility is that each of these sequences is regulated by different elements in the flanking 5' region, as has been demonstrated for other sequences of AMPs in arthropods such as *Manduca sexta* [46].

Computational modeling shows that, although the three mature peptides have some different amino acids, this does not affect the final folding of the peptide. All the mature peptides presented three disulphide bridges formed by six cysteine residues and three characteristic domains: an N-terminal flexible loop, followed by an α -helix and two C-terminal antiparallel β -sheets.

Recently, using transcriptome analysis, researchers have reported that *T. pallidipennis* expressed mRNA for eight defensin genes. One of these corresponds to Def1.6; other, to Def1.2 [21], the dataset is available at <http://201.131.57.23:8080/data/triatoma>. That report is in accordance with our finding of divergence in defensin expression on *T. pallidipennis*.

Many questions remain to be answered, such as the following: are the peptides reported here functional? Which are the stimuli that induce the secretion of these peptides? Which organs secreted them? What is the meaning of the sequence diversity in the intron region, if there is any? Furthermore, we are currently analyzing the expression of defensin in infected *T. pallidipennis* and in different stages of the insect.

The present work initiated the genetic characterization of this molecule in an important North American vector of Chagas disease, a human malady that causes thousands of deaths. Knowledge about these molecules can help in designing novel strategies for the control of Chagas disease vectors.

Acknowledgements

We thank Iris N. Sorribas, Ph.D., for her help in the generation of computational modeling by homology.

Funding

P.D.G. was supported by a Doctoral Fellowship from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (863015).

Competing interests

The authors declare that there are no competing interests associated with the manuscript.

Author contribution

P.D.G. performed most of the experiments, participated in the discussion and in the manuscript writing; O.S.R. helped with the gene cloning and sequencing; I.M.M. performed the genetic analysis and help in the writing of results and discussion; B.E. coordinated the project, designed the experiments, discussed the results and participated in the final writing of the manuscript.

Abbreviations

AMP, antimicrobial peptide; BI, Bayesian Inference; CS $\alpha\beta$, cysteine-stabilized α -helix β -sheet; ML, maximum likelihood.

References

- WHO (2017), [http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypansomiasis\)](http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypansomiasis))
- Ramsay, M.J., Peterson, A.C., Carmona-Castro, O., Miao-Lianos, D., Nakasawa, Y., Bultrick, M. et al. (2015) Atlas of Mexican Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) and vector transmission of Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **110**, 1–14, <https://doi.org/10.1590/S0074-027501400404>
- Martínez-Ibarra, J.A., Valencia-Navarro, I., León-Saucedo, S., Ibáñez-Cervantes, G., Bustos-Saldafía, R., Montañez-Valdez, O.D. et al. (2011) Distribution and infection of triatomines (Hemiptera: Reduviidae) by *Trypanosoma cruzi* in the state of Michoacán, México. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **106**, 445–450, <https://doi.org/10.1590/S0074-02752011000400010>
- Martínez-Hománder, F., Martínez-Ibarra, J.A., Caballé, S., Vilalobos, G., de la Torre, P., Lachetta, J.P. et al. (2010) Natural crossbreeding between sympatric species of the *Phyllosoma* Complex (Insecta: Hemiptera: Reduviidae) indicates the existence of only one species with morphologic and genetic variations. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **82**, 74–82, <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0272>
- Ganz, T. (2003) Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 710–720, <https://doi.org/10.1038/nri1180>
- Muszbekova, A., Daeffler, L. and Imko, J.L. (2017) Innate and intrinsic antiviral immunity in *Drosophila*. *Cell. Mol. Life Sci.* **74**, 2059–2064, <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2453-9>
- Boulanger, N., Bakel, P. and Lowenbarger, C. (2006) Antimicrobial peptides in the interactions between insects and flagellate parasites. *Trends Parasitol.* **22**, 260–268, <https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.04.003>
- Hoffman, J.A. and Reichhart, J.M. (2002) *Drosophila* innate immunity: an evolutionary perspective. *Nat. Immunol.* **3**, 121–126, <https://doi.org/10.1038/nri0202-121>
- Hahn, C., Trösel, L. and Hoffman, J.A. (2003) *Drosophila melanogaster* antimicrobial defense. *J. Infect. Dis.* **187**, S327–S334, <https://doi.org/10.1086/374758>

- 10 Ursic-Badaya, R.J., Buchhop, J., Joy, J.B., Durvasula, R. and Lowenberger, C. (2011) Proleolin: a novel antimicrobial peptide isolated from *Rhodnius prolixus* with differential activity against bacteria and *Trypanosoma cruzi*. *Insect Mol. Biol.* **20**, 775–786, <https://doi.org/10.1111/1365-2583.2011.01107.x>
- 11 Volra, C.S., Wanik, P.J., Castro, D.P., Mattos, D.P., Moreira, O.C. 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/s13071-016-1338-4>
- 12 Garz, T. and Lohrer, R. (1995) Dolanins. *Pharmacol. Ther.* **68**, 191–205, [https://doi.org/10.1016/0163-7256\(94\)00076-F](https://doi.org/10.1016/0163-7256(94)00076-F)
- 13 Bonnsain, J.M., Bonnal, J.L., Gallot, X., Vovelle, F., Plak, M., Reichhart, J.M. et al. (1992) Two-dimensional ¹H NMR study of recombinant insect dolanin A in water: Resonance assignments, secondary structure and global folding. *J. Biomol. NMR* **2**, 295–296, <https://doi.org/10.1007/BF01875319>
- 14 Bulet, P., Holza, C., Dimarog, J.-L. and Hoffman, D. (1999) Antimicrobial peptides in insects: structure and function. *Dev. Comp. Immunol.* **23**, 329–344, [https://doi.org/10.1016/S0145-3050\(99\)00015-4](https://doi.org/10.1016/S0145-3050(99)00015-4)
- 15 Thevsen, K., Wamack, D., François, I.E., Lalpôt, M., Holza, E., Ott, C. et al. (2004) Dolanins from insects and plants interact with fungal glucosylconamides. *J. Biol. Chem.* **279**, 3900–3905, <https://doi.org/10.1074/jbc.M311165200>
- 16 Dasasanyika, R.S., Gurusawadone, Y.N. and Toba, S.S. (2007) Evolutionary selective trends of insect/mosquito antimicrobial defensin peptides containing cysteine-stabilized $\alpha\beta$ -motifs. *Peptides* **28**, 62–75, <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2006.09.022>
- 17 Bulet, P. and Stöcklin, R. (2005) Insect antimicrobial peptides: structures, properties and gene regulation. *Protein Pept. Lett.* **12**, 3–11, <https://doi.org/10.2174/0929866053408011>
- 18 Zhang, L.J. and Gallo, R.L. (2016) Antimicrobial peptides. *Curr. Biol.* **26**, 4–9, <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.11.017>
- 19 Mesquita, R.D., Wonillo-Amaral, R.J., Lowenberger, C., Rivas-Pomaz, R., Monteiro, F.A., Mira, P. et al. (2016) Genome of *Rhodnius prolixus*, an insect vector of Chagas disease, reveals unique adaptations to hematology and parasite infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **113**, E1415–E1416, <https://doi.org/10.1073/pnas.1600205113>
- 20 Hománder-Vargas, M.J., Gil, J., Lozano, L., Pedrosa-Escobedo, M., Ortiz, E., Encarnación-Guerra, S. et al. (2017) Proteomic and transcriptomic analysis of saliva components from the hematophagous reduviid *Titiloma pallidipennis*. *J. Proteomics* **162**, 30–39, <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2017.04.022>
- 21 Zunaya-Estrada, F., Martínez-Barnalicha, J., Lavona, A., Rivas-Pomaz, R. and Rodríguez, M.H. (2018) Comparative genomics analysis of tritominins reveals common first line and inducible immunity-related genes and the absence of lipid canonical components among hemimetabolous arthropods. *Parasit. Vectors*, <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2561-2>
- 22 Araújo, C.A.C., Wanik, P.J., Stock, P., Mayer, C., Jansen, A.M. and Schaub, G.A. (2008) Sequences characterization and expression patterns of defensin and lysozyme encoding genes from the gut of the reduviid bug, *Titiloma brasiliense*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **38**, 547–560, <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2006.04.003>
- 23 Kölln, A.H., Fochner, S., Wanik, P.J. and Schaub, G.A. (2003) Isolation and characterization of a cDNA encoding for a lysozyme from the gut of the reduviid bug *Titiloma infestans*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **53**, 134–145, <https://doi.org/10.1002/arch.10090>
- 24 Ribeiro, J.M.C., Gonza, F.A., Sorgino, M.H.F., Logullo, R., Mesquita, R.D., Paiva-Silva, G.D. et al. (2014) An insight into the transcriptome of the digestive tract of the bloodsucking bug, *Rhodnius prolixus*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **8**, e2924, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002924>
- 25 Wanik, P.J., Castro, R.C., Sathler, P.C., Miesel, L., Jansen, A.M. and Araújo, C.A.C. (2009) Two novel defensin-encoding genes of the Chagas disease vector *Titiloma brasiliense* (Reduviidae, Tritomininae): Gene expression and peptide-structure modeling. *J. Insect Physiol.* **55**, 840–848, <https://doi.org/10.1016/j.jinphys.2008.05.015>
- 26 Araújo, C.A.C., Lima, A.C., Jansen, A.M., Galvão, C., Jurberg, J., Costa, J. et al. (2015) Genes encoding defensins of important Chagas disease vectors used for phylogenetic studies. *Parasitol. Res.* **114**, 4503–4511, <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4694-6>
- 27 Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- 28 Corpet, F. (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res.* **16**, 10881–10890, <https://doi.org/10.1093/nar/16.22.10881>
- 29 Roy, A., Kasukuri, A. and Zhang, Y. (2010) I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat. Prot.* **5**, 725–738, <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.5>
- 30 Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Pokison, J. and Zhang, Y. (2015) The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nat. Methods* **12**, 7–8, <https://doi.org/10.1038/nmeth.3213>
- 31 Zhang, Y. (2008) I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics* **9**, <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-40>
- 32 Chalk, R., Abuguanque, C.M.R., Ham, P.J. and Townson, H. (1995) Full sequence and characterization of two insect defensins: immune peptides from the mosquito *Aedes aegypti*. *Proc. Biol. Sci.* **261**, 217–221, <https://doi.org/10.1098/rspb.1995.0139>
- 33 Bulet, P., Stöcklin, R. and Manin, L. (2004) Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol. Rev.* **198**, 169–194, <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.0124.x>
- 34 Lopez, L., Morales, B., Ursic, R., Wolff, M. and Lowenberger, C. (2005) Isolation and characterization of a novel insect defensin from *Rhodnius prolixus*, a vector of Chagas disease. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **35**, 439–447, [https://doi.org/10.1016/S0065-1748\(05\)00008-0](https://doi.org/10.1016/S0065-1748(05)00008-0)
- 35 Wanik, P.J., Jansen, A.M. and Araújo, C.A.C. (2011) *Trypanosoma cruzi* infection modulates the expression of *Titiloma brasiliense* dot1 in the midgut. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **11**, 845–847, <https://doi.org/10.1089/vbz.2010.0020>
- 36 Garcia, E., Castro, D., Figueiroa, M. and Azambuja, P. (2010) Immune homeostasis to microorganisms in the guts of tritominins (Reduviidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **105**, 605–610, <https://doi.org/10.1590/S0074-02762010005300001>
- 37 Volra, C., Wanik, P., Mattos, D., Castro, D., Mello, C., Rabello, N. et al. (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>

BioScience Reports (2018) 8(8) 085F20-180988
<https://doi.org/10.1042/BSR20180988>



- 38 Vidal-Acosta, V., Ibáñez-Sarmá, S. and Martínez-Campos, C. (2000) Infección natural de chinches Triatominae con *Trypanosoma cruzi* asociada a la vivienda humana en México, Salud Pública de México [on line], <http://saludpublica.mx/index.php/spm/articulo/view/doi/627117499> (Accessed 17 September 2018)
- 39 Curtis-Robles, R., Auckland, L., Snowden, K., Hamor, G. and Hamor, S. (2018) Analysis of over 1500 triatomine vectors from across the US, predominantly *Triatoma cruzi* infection and discrete typing units. *Infect. Genet. Evol.* 58, 171–180, <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.12.016>
- 40 Daher, R., Kamangkorsak, C., Houasmi, D., Lofabera, T., Bardou-Jacquot, E., Ducrot, N. et al. (2016) Heterozygous mutations in BMP6 pro-peptide lead to inappropriate hepcidin synthesis and moderate iron overload in humans. *Gastroenterology* 150(3), 672–683, <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.10.049>
- 41 Tu, J., Li, B., Li, Q., Zhang, L., Zhu, Q., Gaur, M. et al. (2015) Molecular evolutionary analysis of β -defensin peptides in vertebrates. *Evol. Bioinform. Online* 11, 105–114, <https://doi.org/10.4137/EBO.525580>
- 42 Conrad, S.M., Drahar-Laszlek, S.M., Gillespie, J.J., Rahman, M.S. and Arad, A.F. (2007) New tick defensin isoform and antimicrobial gene expression in response to *Rickettsia montanensis* challenge. *Infect. Immun.* 75, 1973–1983, <https://doi.org/10.1128/IAI.01815-06>
- 43 Hernández-Vargas, M.J., Santibáñez-López, C.E. and Corzo, G. (2016) An insight into the Tridulin protein family of American hematophagous Reduviids: functional, structural and phylogenetic analysis. *Toxins (Base)* 8, 44, <https://doi.org/10.3390/toxins8020044>
- 44 Mohai, R.P. (2009) Repeat mediated gene duplication in the *Drosophila pseudoobscura* genome. *Gene* 438, 1–7, <https://doi.org/10.1016/j.gene.2009.02.019>
- 45 Hollox, E.J., Armour, J.A. and Barber, J.C. (2003) Extensive normal copy number variation of a beta-defensin antimicrobial-gene cluster. *Am. J. Hum. Genet.* 73, 591–600, <https://doi.org/10.1086/378152>
- 46 Rayaprolu, S., Wang, Y., Kanost, M.R., Harbison, S. and Jiang, H. (2010) Functional analysis of four processing products from multiple precursors encoded by a loboin-related gene from *Manduca sexta*. *Dev. Comp. Immunol.* 34, 63847, <https://doi.org/10.1016/j.dci.2010.01.008>

19 **Abstract**

20 Defensins are one of the major families of antimicrobial peptides (AMPs) widely distributed in
21 insects. In Triatomines (Hemiptera: Reduviidae) vectors of *Trypanosoma cruzi* (causative agent
22 of Chagas disease), two large groups of defensin isoforms have been described: type 1 and type
23 4. The aim of this study was to analyze the trypanocidal activity of a recombinant defensin type 1
24 (rDef1.3) from *Triatoma (Meccus) pallidipennis*, an endemic specie of México. The trypanocidal
25 activity of this triatomine defensin was evaluated *in vitro*, different concentrations of rDef1.3
26 were evaluated against the parasites *T. cruzi*, *T. rangeli*, and two species of *Leishmania* (*L.*
27 *mexicana* and *L. major*) both causative agents of cutaneous leishmaniasis. Our data demonstrated
28 that of the four parasites evaluated, *T. cruzi* presented damage at morphological and viability
29 level, furthermore, this parasite showed growth inhibition after the treatment. Besides, *T. rangeli*
30 (a parasite that infects a variety of mammalian species), showed higher damage to morphological
31 level than *T. cruzi*, and surprisingly the greatest damage was seen against the two species of
32 *Leishmania*. Interestingly, *L. major* was the parasite most affected by the defensin, since when
33 evaluating the viability more than 50 % of the parasites were dead or with a compromised
34 membrane, also these parasites showed a reduction in their proliferation capacity in culture.
35 These results suggest that rDef1.3 has an important antimicrobial effect against three
36 trypanosomatids that causes some of the neglected tropical diseases transmitted by insect vectors.

37 *Keywords:* *Triatoma pallidipennis*, defensin, *T. cruzi*, trypanosomatids.

38

39

40 **1. Introduction**

41 *Trypanosoma cruzi* is the protozoan parasite that causes Chagas disease, one of the main
42 neglected tropical diseases in Latin America. The migrations of infected people had taken it to
43 non-endemic countries of America and the rest of the world, resulting in a global health problem.
44 The World Health Organization (WHO) estimates that there are over 8 million people infected
45 with this parasite and more than 25 million people risk acquiring the disease (WHO, 2019).
46 Chagas disease is transmitted mainly by the feces of hematophagous insects belonging to the
47 Triatominae subfamily (Hemiptera: Reduviidae). In México, it have been reported 31 different
48 species of the genus *Triatoma*, including the endemic *Triatoma (Meccus) pallidipennis* which has
49 epidemiological importance because colonizes extensive areas in the center of the country and
50 has been reported with a natural *T. cruzi* infection of 50 % in some regions (Ramsey, et al., 2005;
51 Martínez-Ibarra, et al., 2011; Ramsey, et al., 2015). The trypanosomatid *T. rangeli* is an infective,
52 non-pathogenic parasite for humans, but pathogenic for vectors from the subfamily Triatominae,
53 mainly from the *Rhodnius* genus (Vallejo, et al., 2015).

54 Another neglected tropical diseases transmitted by insect vectors are the Leishmaniasis, a group
55 of diseases caused by protozoan parasites from more than 20 *Leishmania* species. These parasites
56 are transmitted to humans by the bite of an infected female phlebotomine sandfly (WHO, 2019;
57 Torres Guerrero, et al., 2017). Leishmaniasis is endemic in southeastern Mexico, where
58 *Leishmania (L.) mexicana* is the principal parasite species causing disease in humans (Berzunza-
59 Cruz, 2014) and still remains a serious health problem since there is no vaccine or effective drugs
60 against the parasites.

61 AMPs are small cationic polypeptides of fewer than 100 amino acids that are part of the host
62 defense system, and that have antimicrobial activity at physiological concentrations under
63 conditions prevailing in the tissues of origin (Ganz, 2003). AMPs are synthesized as inactive
64 precursor proteins or pro-proteins, containing a signal sequence. Post-translational modifications
65 include proteolytic processing to release the sequence corresponding to the active peptide or
66 mature peptide (20-50 residues), which have antimicrobial activity (Yi, et al., 2014).

67 In insects, a wide variety of AMPs have been found, of which, the family of the defensins has
68 been the most studied due to its presence in various groups of insects (Koehbach, 2017). Insect
69 defensins contain six conserved cysteines that form three intramolecular disulfide bridges. In
70 invertebrates, the cysteines bonds have a unique pattern (CysI-CysIV, CysII-CysV, and CysIII-
71 CysVI) and form a consensus folding pattern consisting of the cysteine-stabilized α -helix β -sheet
72 (CS $\alpha\beta$) motif, which is the active site of the domain for antimicrobial activity and that differs
73 from vertebrate defensins (Ganz & Lehner, 1995; Dassanayake, et al., 2007). Typically, the size
74 of these molecules ranges between 33–46 amino acid residues with a molecular weight of ~4
75 kDa. The studies of defensin antimicrobial activity in insects has been focused mainly against
76 bacteria, but also the activity against virus, fungi, and parasites have been reported (Tonk &
77 Vilcinskis, 2017). However, there are few studies related to Hemipteran defensins, which may be
78 due to the lack of information on the genomes of this type of insects. Recently, we reported the
79 genetic variability of defensins family in *T. pallidipennis*, 12 different genes were identified to
80 encode three mature defensins (two defensins type I and one defensin type 4) (Díaz-Garrido, et
81 al., 2018). This work has been one of the few that addresses the study of genes related to the
82 immune system in *T. pallidipennis* and it is important since there is little information about it in
83 North American triatomines. The limited studies are relate to the expression of defensin mRNA,

84 but proteins studies are lacking (Araújo, et al., 2006; Waniek, et al., 2009; Vieira, et al., 2014,
85 2016). Therefore, the purpose of the present study was to generate a recombinant defensin type 1
86 from *T. pallidipennis* and analyze its activity *in vitro* against *T. cruzi* and other trypanosomatids.

87 **2. Materials and Methods**

88 *2.1. Trypanosomatids cultures*

89 Epimastigotes of *T. cruzi* (TBAR/MX/0000/Querétaro) were cultured in LIT medium,
90 supplemented with 10 % FBS and 25 µg/ml of hemin, and maintained at 28 °C for 3–4 days in
91 culture to obtain the log phase of growth (Espinoza et al., 2010). Epimastigotes of *Trypanosoma*
92 *rangeli* were cultured in LIT medium, supplemented with 20 % FBS without hemin (Dos Santos
93 et al. 2013). Promastigotes (infective stage) of *Leishmania major* and *Leishmania mexicana* were
94 maintained in 199 medium (M199) (Gibco BRL, France), supplemented with 10 % FBS, 2 mM
95 L-glutamine, 25 mM HEPES, 100 U/ml penicillin, and 100 µg/ml of streptomycin (Dey, et al.,
96 2002).

97 *2.2. Insects maintenance and isolation of RNA from T. pallidipennis*

98 *T. pallidipennis* were maintained in a colony at Laboratorio de Estudios sobre Tripanosomiasis
99 Americana, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, under controlled temperature (28
100 °C) and humidity (15 %). The insects were fed with rabbit blood, and all the procedures were
101 carried out according to the Ethics Code of the Instituto de Investigaciones Biomédicas for
102 animal care ([https://www.biomedicas.unam.mx/wp-content/pdf/intranet/reglamentos/codigo-](https://www.biomedicas.unam.mx/wp-content/pdf/intranet/reglamentos/codigo-etico-iibo.pdf?x21431)
103 [etico-iibo.pdf?x21431](https://www.biomedicas.unam.mx/wp-content/pdf/intranet/reglamentos/codigo-etico-iibo.pdf?x21431)). *T. pallidipennis* (adult female) total RNA was isolated from the fat body,
104 Malpighian tubules and digestive tract (previously washed several times with DEPC water to
105 eliminate intestinal contents), the organs were macerated using TRIzol (Invitrogen-Gibco,

106 Carlsbad, CA, USA) according to the instructions from the manufacturer, followed by DNase I
107 (Invitrogen-Gibco, Carlsbad, CA, USA) treatment. Nucleic acid integrity was analyzed by
108 agarose gel electrophoresis and its concentration and purity were assessed using a NanoDrop
109 1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The RNA was kept at -20 °C until used.

110 2.3. Cloning of *def1* cDNA from *T. pallidipennis*

111 For the synthesis of cDNA, 1 µg total RNA was used as a template in a reaction containing 5.5
112 mM MgCl₂, 1x Buffer RNase, 2.5 mM each dNTPs, 2.5 mM Oligo dT, 0.4 U/µl RNase
113 (RNaseOUT) and 1.25 U/µl M-MLV Reverse transcriptase enzyme (Thermo Fisher Scientific,
114 Waltham, MA, USA). The first PCR to amplify the defensin type 1 gen (*def1*) was performed
115 using 200 ng of cDNA plus the primers and conditions reported by Araújo et al., 2006. The
116 obtained amplification was sequenced by the Sanger method using a 3500xL Genetic Analyzer
117 (Applied, USA) and from the sequence obtained, specific primers were designed to amplify the
118 region corresponding to the mature peptide: forward (5'-CAA GGATCC
119 AGGGCCACTTGTGATCTGCTAAG-3') and reverse (5'-CAA CTGCAG
120 CTCCTGCAATGGCACAG-3'). The conditions employed were one initial step of 95 °C for 5
121 min, 30 cycles (1 min at 95 °C, 1 min at 60 °C and 1 min at 72 °C), and a final elongation step
122 (10 min at 72 °C).

123 The amplicon encoding for the mature peptide from *def1* was analyzed on 1.5 % agarose gel and
124 ligated into the *Bam*HI and *Pst*I digested-pQE-30 vector (N-terminal histidine tag, T5/lac
125 promoter, ampicillin resistance) (Qiagen, Hilden, Germany) transformed by heat shock into *E.*
126 *coli* M15 [pREP 4] cells and plated on Luria-Bertani (LB) agar plates supplemented with 100
127 µg/ml ampicillin overnight. Putative colonies containing the pQE-30_*def1* construct were

128 screened by PCR with primers for pQE-30 (Fw: 5'-CGGATAACAATTTTCACACAG-3' and Rv:
129 5'GTTCTGAGGTCATTACTGG-3'). Candidate clones were sequenced in the Laboratorio de
130 Secuenciación Genómica de la Biodiversidad y de la Salud (UNAM) with the Sanger technique,
131 using a 3500XL genetic analyzer (Applied) to corroborate the correct insert.

132 2.4. *rDefl.3* expression in *E. coli* strain

133 A positive clone was grown in liquid 2xYT enriched medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO,
134 USA) with ampicillin (100 µg/ml) for 18 h at 37 °C and 180 rpm. The bacterial culture
135 (previously grown) was used to inoculate 500 ml of 2xYT medium with ampicillin (100 µg/ml)
136 and incubated at 37 °C, 180 rpm until getting an optical density (600 nm) of 0.7, the induction of
137 the 6xHis-tag recombinant protein expression was made with 1 mM IPTG (isopropyl-1-thio-β-D-
138 galactopyranoside) (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) for 18 h at 30 °C, and analyze its
139 expression by Tricine SDS-PAGE (Schägger, 2016). The biomass was treated as described by
140 Cárdenas-Guerra et al., 2015 with some modifications: briefly, the bacterial cells (1 gr) were
141 resuspended in 10 ml of lysis buffer (20 mM Tris-HCl [pH 8.0], 20 mM NaCl, 5 mM DTT, 1
142 mM PMSF) and lysed by sonication on ice with 6 cycles of 30 sec pulse on and 30 sec pulse off.
143 The insoluble and soluble fractions were separated by centrifugation (8000 × g for 30 min) and
144 analyzed in Tricine SDS-PAGE electrophoresis. Inclusion bodies were washed four times with
145 washing buffer (20 mM Tris-HCl [pH8.0], 0.5 M NaCl, 2 % Triton X-100, 2 M urea). Inclusion
146 bodies were solubilized for 16 h at room temperature (RT) in binding buffer (20 mM Tris-HCl
147 [pH 8.0], 0.5 M NaCl, 5 mM imidazole, 8 M urea). The suspension was centrifuged at 8000 × g
148 for 30 min to remove insoluble material. Tricine SDS-PAGE (15 % separator/ 4 % stacking gels)
149 stained with Coomassie brilliant blue G-250 (BioRad, CA, USA) was used during the different
150 process steps to determine the presence of the 6xHis-tag expressed peptide. Additionally, 20 µg

151 of rDef1.3 was blotted from Tricine SDS–PAGE gel to nitrocellulose membranes. Western blot
152 (WB) analysis was performed by mouse anti-Histidine antibody (Roche, Switzerland) as primary
153 antibody and rabbit anti-Mouse IgG-Peroxidase (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) as a
154 secondary antibody. The WB was revealed by chemiluminescence (RPN2232, Thermo Fisher,
155 Waltham, MA, USA).

156 *2.5. Purification and refolding of rDef1.3*

157 The recombinant protein (rDef1.3) contained in the inclusion bodies solubilized was purified
158 using immobilized metal affinity chromatography (IMAC) with Ni-Nitrilotriacetic acid (Ni–
159 NTA) by Ni Sepharose High-Performance agarose (GE Healthcare, CA, USA) under denaturing
160 conditions following the manufacturer’s instructions. Affinity-bound recombinant protein was
161 eluted with elution buffer (20 mM Tris–HCl [pH 8.0], 0.5 M NaCl, 0.5 M imidazole, 4 M urea).
162 The purified recombinant protein was dialyzed three times against PBS at 4 °C and the
163 concentration of peptide was determined by absorbance at 280 nm using their respective molar
164 extinction coefficients.

165 *2.6 Analysis of defensins sequences, structure prediction of the mature peptide and phylogenetic* 166 *analysis*

167 The molecular weight, isoelectric point, molar extinction coefficient, net charge and amino acid
168 translate sequence of the rDef1 (called from now on, rDef1.3 to differentiate it to the genes
169 previously described), were determined. Amino acids sequence was obtained using Protparam
170 from ExPASy platform (<https://www.expasy.org/>) and Pepstats software version 6.6.0 available
171 on the online platform <http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/Web>. To establish the identity of
172 rDef1.3 with other proteins, a multiple alignment was performed with the Clustal Omega server

173 (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) and with the NCBI (BLASTp) online software
174 (<http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST/>). A 3D structure model of the rDef1.3 protein and the
175 TpDef1.2 from *T. pallidipennis* (Díaz-Garrido, et al., 2018) was obtained using the I-TASSER
176 server (Roy, et al., 2010; Yang, et al., 2015; Yang & Zhang, 2015), which is available at
177 <http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>.

178 The prediction of the conserved domains for the identification of the protein family was carried
179 out using the online software SMART (Simple Modular Architecture Research Tool)
180 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>). A phylogenetic analysis was done using TpDef1.3 sequence,
181 the following sequences were included in the analysis: *Triatoma pallidipennis* defensins 1.2
182 (AXY04218.1), 1.1 (AXY04217.1), and 4.1 (AXY04219.1). *Porcellio duboscqui* (PdDef:
183 P83404.3), *Lucilia sericata* (LsDef: P86471), *Aedes aegypti* (AaDef: P81603), *Pisum sativum*
184 (PSD1: P81929/ PSD2: P81930), *Medicago sativa* (MsDef1: Q9FPM3), *Petunia hybrida* (PhD1:
185 Q8H6Q1), *Nepenthes alata* (NaD1: Q8GTM0), *Solanum lycopersicum* (TPP3: Q40128), and
186 human β -defensins (HBD2: NP_004933/ HBD3: NP_061131). For the comparative analysis of
187 defensins with bactericidal and fungicidal activity, the defensins sequences were aligned using
188 MUSCLE software (Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation) (Edgar, 2004). The
189 phylogeny was established through the Neighbor-joining analysis, by the Bootstrap statistical
190 method (10,000 replicates), using the Mega6 Software (Tamura et al., 2013). Only those
191 positions with 95% coverage were considered for the analysis. The resulting cladograms were
192 visualized using FigTree Software Ver 1.4.3 (Rambaut, 2006).

193 The prediction of the amino acids that participate in the binding to the probable molecular targets
194 was established using the software COACH (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/COACH/>)
195 and PrankWeb (<https://prankweb.cz>). In the latter case, the sequence of the human β -crystallin

196 protein was used as a template (2YGD, Protein Data Bank) (Jendele et al., 2019; Zhang et al.,
197 2017).

198 2.7. Mass spectrometry analysis

199 The sample of Tricine SDS-PAGE gel was cut and digested with trypsin according to the
200 modified protocol of Shevchenko, et al., 2006. The resulting tryptic peptides were loaded onto
201 the Symmetry C18 Trap V/M trap column (Waters, Milford, MA); and desalted using a mobile
202 phase A, 0.1 % formic acid (FA) in water and mobile phase B, 0.1 % FA in acetonitrile.
203 Subsequently, the peptides were loaded and separated on a HSS T3 C18column (Waters, Milford,
204 MA); using an UPLC ACQUITY M-Class (Waters, Milford, MA). Mass spectral data were
205 acquired in a mass spectrometer with electric spray ionization (ESI) and ion mobility separation
206 (IMS) Synpat G2-Si (Waters, Milford, MA) using data-independent acquisition (DIA) approach
207 by HDMSE mode (Waters, Milford, MA). The raw files containing the MS and MS/MS spectra
208 were deconvoluted and compared using ProteinLynx Global Server (PLGS) v3.0.3 (Waters,
209 Milford, MA) against a *Homo sapiens*, *Rhodnius prolixus* database and defensins from *T.*
210 *pallidipennis* concatenated with its reversed database. Workflow parameters included trypsin as a
211 cutting enzyme and prediction of one missed cleavage site in tryptic peptides, carbamidomethyl
212 (C) as a fixed modification and amidation (N-term), deamidation (N, Q), oxidation (M), and
213 phosphorylation (S, T, Y) were used as variable modifications. A false discovery rate (FDR) \leq 4
214 % was used. All identifications had a percentage of reliability \geq 95%.

215 2.8. Morphological changes in parasites treated with rDef1.3

216 Morphological changes were analyzed in parasites untreated (control) and treated with rDef1.3
217 for 4 h at 28 °C. In the case of *T. cruzi*, the defensin was used at different concentrations (5.2,

218 10.5, 21, 42, and 84 μM). For *T. rangeli* and *Leishmania* spp. only the highest concentration (84
219 μM) was used. Parasites were harvested by centrifugation at $2100 \times g$ for 10 min at 4 °C and
220 washed twice with PBS. Parasites (2×10^5) were fixed using methanol and stained with Wright-
221 Giemsa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) on microscopy slides. The slides were mounted
222 with Organo/limonene mount (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) and analyzed using
223 a Nikon Optiphot 2 microscope. For each treatment, 300 parasites were counted in each
224 independent experiment to determine the percentage of parasites with morphological alterations.
225 Three independent experiments were performed.

226 2.9. Viability assays

227 The viability of *T. cruzi* epimastigotes and *L. major* promastigotes was determined using
228 LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Kit from Thermo Fisher (Waltham, MA, USA) (Arroyo-
229 Olarte, et al., 2018). For this, 2×10^6 epimastigote were incubated for 4 h in the absence or
230 presence of rDef1.3 at different concentrations. After incubation, the parasites were centrifuged at
231 $3000 \times g$ for 10 min to remove the supernatant, washed twice with PBS, and the parasite pellet
232 from each treatment was re-suspended in 498 μl of PBS, 2 μl of a 50 μM solution of Calcein-AM
233 (C-AM), and 2 μL of 2 mM Ethidium Homodimer-1 (EthD-1). The samples were then incubated
234 for 45 min at RT and immediately analyzed using a flow cytometer (BD FACS Calibur flow
235 cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA) with a 530/30-nm filter (FL1-H) for C-AM (green
236 fluorescence: living cells) and a 670 nm long-pass filter (FL3-H) for EthD-1 (red fluorescence:
237 dead cells); 20,000 events per treatment were acquired. The data were analyzed using FlowJo
238 7.3.2 software and expressed as the percentage of cells per population phenotype. The
239 compensation was performed using live parasites in medium alone, stained only with C-AM, and

240 dead parasites exposed to heat shock (for 10 min at 55 °C), stained with EthD-1. Two
241 independent experiments, by triplicate, were performed.

242 *2.10. Parasites growth inhibition*

243 *T. cruzi* epimastigotes and *L. major* promastigotes (5×10^5 cells) untreated or treated with 84 μ M
244 of rDef1.3 for 4 h at 28 °C, were washed and incubated in LIT medium supplemented for *T. cruzi*
245 and M199 supplemented for *L. major* for 8 days at 28 °C. Then, the number of parasites was
246 determined by counting in a hemocytometer every two days. The number of control parasites
247 (untreated) was considered as 100 % of growth. Three independent experiments were performed
248 by duplicate.

249 *2.11. Bactericidal activity of rDef1.3*

250 The antimicrobial activity was determined using Kirby-Bauer tests. A bacterial solution was
251 prepared with *Escherichia coli* and *Micrococcus luteus* from colonies growing in LB agar,
252 adjusting the optical density of the suspension with a standard of 0.5 McFarland units of BaSO₄.
253 The bacterial suspension was added to LB agar and emptied into Petri dishes before solidifying.
254 Each of the rDef1.3 concentrations was adjusted to a volume of 20 microliters and deposited on 6
255 mm filter paper discs to allow drying at RT. Once dry, the discs were placed on the surface of the
256 agar with bacterial cultures and the plates were incubated at 37 °C for 18-24 h. The growth
257 inhibition halos were evaluated by direct observation. Ampicillin (3 μ g) was used as a positive
258 control. Three independent experiments were performed.

259 *2.12. Statistics*

260 Data from the effect of different concentrations of rDef1.3 in parasites morphology and relative
261 rate of growth between untreated and treated parasites were analyzed by 2-way ANOVA and

262 Sidak's multiple comparisons test. The data from cytometry was analyzed by one-way ANOVA
263 and Tukey analysis procedure. Statistical analyses were performed using the Prism software v.
264 6.01 (GraphPad).

265 **3. Results**

266 *3.1. Obtention and analysis of rDef1.3 from T. pallidipennis*

267 The mature region from *def1* (150 bp) was successfully cloned from cDNA of fat body and
268 digestive tract, in the cloning/expression plasmid pQE-30 (Fig 1A). The nucleotides sequence
269 obtained from the clones showed the nucleotides that encoding for a polyhistidine-tag (6xHis-tag)
270 as well as two stop codons (Fig 1B). The recombinant defensin was named rDef1.3 as mentioned
271 before, it is composed of 44 amino acid residues with a molecular weight of 4.7 kDa plus 1 kDa
272 that correspond to 6xHis-tag, the final molecular weight is 5.7 kDa with a isoelectric point of
273 8.69. The proportion of the most abundant amino acid residues is alanine-glycine 9.6 % and
274 cysteines 11.5 %. The rDef1.3 has a higher percent identity (97.67 %) with *T. pallidipennis*
275 TpDef1.2 previously reported by our group (Díaz-Garrido, et al., 2018) and only presented a
276 change at amino acid level in the C-terminal, instead of Valine (V) a Leucine (L) is present. The
277 6xHis-tag and the extra amino acid residues does not alter the final conformation of rDef1.3
278 compared with TpDef1.2 (Fig 1C). The comparative analysis of sequences shows that the change
279 of L is not present in any reported defensins from other triatomine species, and as a external
280 group we incorporate one defensin from the sandfly *Lutzomyia*, the defensin (*def1*) is smaller
281 compared to those from the Triatomines (Fig 1D).

282 *3.2. Expression and purification of rDef1.3*

283 The rDef1.3 (~5.7 kDa) was overexpressed using 1 mM IPTG for 18 h at 30 °C (Fig 2A, lane 2).
284 The soluble and insoluble fractions were analyzed by Tricine SDS–PAGE, where the rDef1.3
285 expression was obtained in the insoluble fraction (Fig. 2A, lane 4). The inclusion bodies were
286 solubilized with 8 M Urea and purified by IMAC under denaturing conditions (Fig. 2A, lane 5).
287 The purified protein was eluted in 4 M urea obtaining a yield of 9 mg per 500 ml of cell culture
288 (5 g of wet weight of biomass). The eluted fractions were dialyzed in PBS at 4 °C to promote the
289 refolding of rDef1.3 (Fig. 2A, lane 6). In WB analysis, the anti-Histidine antibody detected the
290 expected band of ~5.7 kDa corresponding to purified defensin (Fig. 2B). The identity of rDef1.3
291 was corroborated by MS, the band obtained of ~5.7 kDa was excised from a Tricine SDS-PAGE
292 gel (Fig. 2A, lane 6), digested with trypsin and analyzed using MS (ESI-LC–MS/MS). A
293 representative peptide “ATCDOLLSDESK” was obtained (Fig. 2C), this peptide matched with
294 the deduced protein sequence of rDef1.3 with a coverage of 25 % (Table 1).

295 3.3. Evaluation of morphological changes of *T. cruzi* epimastigotes after rDef1.3 treatment

296 To determine if rDef1.3 was active against different trypanosomatids, *T. cruzi* (the natural
297 intestine parasite of the vector *T. pallidipennis*) was incubated with or without different rDef1.3
298 concentrations (5.2, 10.5, 21, 42, and 84 µM) for 4 h at 28 °C to analyze changes in the
299 morphology of epimastigotes. This analysis showed that the untreated parasite (control) exhibited
300 the typical morphology with an elongated body, the terminal flagellum, the nucleus, and
301 kinetoplast in the usual position. In contrast, *T. cruzi* epimastigotes treated with rDef1.3 showed
302 an atypical morphology which included a rounded appearance, contortion of the parasite body,
303 and/or a shortened flagellum (Fig. 3A). The percentage of atypical morphology observed in *T.*
304 *cruzi* epimastigotes at concentrations 5.2 µM (2 %) and 10.5 µM (7 %) was low, both 5.2 µM and
305 10.5 µM generated no effect, the morphology was similar to the effect caused by the vehicle

306 (PBS) in control epimastigotes. At 21 μM a difference between the treated and the control begins
307 to be observed. When the concentration was increased to 42 or 84 μM the maximum percentage
308 of atypical morphology reached was 27 % for both concentrations (Fig. 3B). These results
309 suggest that rDef1.3 causes damage in the epimastigote morphology in a concentration-dependent
310 manner.

311 *3.4. Viability of T. cruzi epimastigotes after rDef1.3 treatment*

312 To corroborate the damage generated by rDef1.3 on *T. cruzi* epimastigotes, three concentrations
313 of the defensin were tested (21, 42 and 84 μM) to identify loss of membrane integrity of the cells
314 as well as dead cells. The fluorescence of EthD-1 (a membrane-impermeable fluorescent dye that
315 binds to DNA) and C-AM (a cell-permeant fluorescent probe that indicates cellular health) were
316 measured by flow cytometry (Fig. 4A). The percentages of the quadrants corresponding to living
317 cells with loss of membrane integrity (double-positive for both C-AM and EthD-1 markers) and
318 dead cells (EthD-1 positive marker) were considered to determine the cell viability. These results
319 indicated a concentration-dependent increase in damaged parasites. A significant difference was
320 observed between control and 42 μM (9 %) and 84 μM (16 %). Although in the previous assay,
321 the damage percentage in the epimastigote morphology was practically the same in the
322 concentrations 42 and 84 μM , in the viability assay at 84 μM the percentage of damaged parasites
323 increases almost at double.

324 To determine if the damage caused by rDef1.3 could affect the growth of parasites, 5×10^5
325 epimastigotes were incubated in LIT medium to analyze their growth after being treated with 84
326 μM rDef1.3. The parasites count was done every two days for 8 days, the results showed that the

327 growth of parasites treated was approximately 3 times lower respect to parasites untreated (Fig.
328 4B).

329 3.5. Effect of rDef1.3 against *T. rangeli*, *L. mexicana* and *L. major*

330 To determine if rDef1.3 could affect other trypanosomatids, *T. rangeli* an infective parasite but
331 non-pathogenic for humans and two species from the genus *Leishmania* (responsible of the
332 Leishmaniasis disease) *L. major* and *L. mexicana* were studied. Like *T. cruzi*, morphological
333 damage was first assessed. The parasites were incubated with 84 μM for 4 h at 28 °C (for this
334 analysis, only the highest concentration of rDef1.3 was used). In the case of *T. rangeli*
335 epimastigotes, 38 % of the parasites showed an atypical morphology. *L. mexicana* and *L. major*
336 showed higher percentages of morphology changes, 63 and 72 %, respectively. Interestingly, *L.*
337 *major* was the most affected trypanosomatid (Fig. 5A and B).

338 3.6. Viability of *L. major* promastigote after rDef1.3 treatment

339 Since *L. major* was the trypanosomatid that showed a higher percentage of parasites with altered
340 morphology, it was decided to evaluate the membrane damage and cell death using the
341 LIVE/DEAD Kit, three concentrations of rDef1.3 (21, 42 and 84 μM) were tested. The results
342 showed concentration-dependent damage as observed previously in *T. cruzi*, although the effect
343 in *L. major* was greater, at 21 (4.5 %), 42 (33.2 %) and 84 μM (55.5 %) (Fig. 6A). These results
344 indicated that there was a correlation between morphological damage and cell death. To
345 determine if the damage caused by rDef1.3 could affect the growth of *L. major*, 5×10^5
346 promastigote were incubated in M199 medium to analyze their growth after being treated with 84
347 μM rDef1.3 for 4 h. The parasites count was done every two days for 6 days and until this day,

348 the number of parasites previously treated with the defensin, grew 2 times less than the untreated
349 parasites (Fig. 6B).

350 Once the damage to *T. cruzi* epimastigotes was identified, rDef1.3 was tested against *E. coli* and
351 *M. luteus* by radial diffusion assays at concentrations of 25 and 100 µg/ml, however, no
352 bactericidal effect was identified against any of the bacteria tested (Fig. S1).

353 **4. Discussion**

354 Even though defensins are the family of AMPs most studied in insects, there are few studies
355 regarding the functionality of these molecules in Hemipteran insects since most of the studies
356 have focused on evaluating the expression of genes under different conditions. In triatomines,
357 two large groups of defensins have been identified and grouped as defensins type 1 and type 4
358 (Araújo, et al., 2015; Díaz-Garrido, et al., 2018). In South American triatomine, differential
359 expression of messengers of different defensin isoforms has been observed in different tissues
360 and under different immunological challenges e. g. *T. cruzi* and different bacterial infections
361 (Waniek, et al., 2011; Vieira, et al., 2014, 2016), however, in few works the function of these
362 molecules *in vitro* is reported (López, et al., 2003). With the propose to characterize the
363 antimicrobial activity of a defensin, a recombinant defensin type 1 from *T. pallidipennis* was
364 generated and its activity against different trypanosomatids was evaluated.

365 In the literature there are different protocols for the generation of recombinant defensins using
366 bacterial systems (Wang, et al., 2004; Corrales-García, et al., 2011, 2013; Li, 2011).
367 Nevertheless, due to the toxicity toward the host cell, sensitivity to peptide degradation by
368 proteolytic cell enzymes and low expression levels mainly because of the small size of these
369 proteins, the union of fusion proteins like thioredoxin (TrxA) or glutathione S transferase (GST)

370 has been reported (Fairlie, et al., 2002; Schmoldt, et al., 2005; Corrales-García, et al., 2011;
371 Costa, et al., 2014). In the present work the recombinant defensin type 1 (rDef1.3) from *T.*
372 *pallidipennis* was obtained with a 6xHis-tag at the N-terminus, as the fusion protein.
373 Interestingly, when the sequence of the mature region from *def1* gene was analyzed, we observed
374 that the sequence was different from the defensins reported in the *T. pallidipennis* transcriptome
375 (Zumaya-Estrada, et al., 2018), and from previously reported *def1.1* and *def1.2* genes (Díaz-
376 Garrido, et al., 2018). Only two substitutions of nucleotides changed in *def1* with respect to
377 *def1.2*: one was not modified the codon, but the other generated a change in one amino acid at the
378 C-terminal (V by L), not observed in others defensins type 1. Also in that position all the
379 defensins type 4 have an Isoleucine (I), which indicates a conservative replacement between
380 defensins, and makes us think that maybe that position has a relevant role in the antimicrobial
381 activity of these molecules.

382 Therefore, we decided to name this novel defensin gene type 1 as *def1.3* (GenBank accession
383 number MN557396) and given that, we generated the recombinant peptide to evaluated its
384 function, we named the recombinant defensin as rDef1.3. When comparing the tertiary structure
385 models of TpDef1.2 and rDef1.3 the homology modeling showed that the 6xHis-tag, the extra
386 amino acids and the change of V by L did not alter the typical tertiary structure of an insect
387 defensin (CS $\alpha\beta$), which indicated that the defensin could have its biological activity. Some
388 reports mention that the presence of extra amino acids does not influence on the biological
389 activity of the AMPs, still using large fusion proteins like the Trx (Fairlie, et al., 2002; Song, et
390 al., 2009).

391 Due to the great interest that insect AMPs have had in recent years, different strategies have been
392 established to obtain them including the isolation from natural sources, chemical synthesis and

393 expression using recombinant techniques. In this work, we carry out a straightforward procedure
394 to obtain an active recombinant defensin, corroborated by WB analysis using the primary
395 antibody anti-Histidine and by mass spectrometry. The rDef1.3 was obtained in inclusion bodies,
396 the methodology to solubilize and purify them that we carry out have several advantages since
397 the rDef1.3 was obtained with 95 % of purity after the IMAC, not requiring an extra step for
398 purification by HPLC, as in other reported works. Besides, the strategy we follow to refold the
399 defensin does not require oxidizing agents and we obtained a good quantity of pure defensin, also
400 the recombinant protein was stable in concentrations ≤ 0.5 mg/ml at 4° C. These conditions
401 allowed performing the functional experiments.

402 The concentration of defensins in hemolymph has been reported in different insects after
403 immunological challenges, e. g. in *Drosophila* 1 μ M has been reported after bacterial infection
404 (Lemaitre & Hoffman, 2007) and in *A. aegypti* the concentration can go up to 45 μ M at 24 h post-
405 inoculation (Lowenberger, et al., 2003). In triatomines the concentration at which the defensins
406 are synthesized is unknown, so to evaluate the effect of rDef1.3 against trypanosomatids, we
407 tested different concentrations from 5.2 μ M to 84 μ M.

408 Madison, et al., 2007 reported for the first time a defensin with trypanocidal activity, the human
409 defensin α -1. This defensin was tested against *T. cruzi* tripomastigote and amastigote, and the
410 identified mechanism of action was the membrane pore formation and the induction of nuclear
411 and mitochondrial DNA fragmentation. Trypomastigote destruction with detachment of the
412 flagellum was observed at 20 μ M.

413 Unlike human defensin α -1, rDef1.3 partially affects the *T. cruzi* epimastigotes, since the
414 percentages of parasites with morphology altered and parasites dead or with damage membrane,
415 at the highest concentration used (84 μ M), was 27 % and 16 % respectively. Though, the growth

416 of epimastigote previously treated with rDef1.3 was significantly affected after 8 days of culture,
417 so this defensin seem to produce an initial moderate damage but the induced damage was
418 sufficient to limit the proliferation of the parasite. It will be interesting to study, if this defensin is
419 synthesized naturally in the digestive tract of the insect, particularly after *T. cruzi* infection.

420 Even though, the majority of the defensins kill bacteria (Ganz, 2003; Boulanger, et al., 2006),
421 rDef1.3 did not show bactericidal activity. After a comparative and phylogenetic analysis, it was
422 identified that the sequence of TpDef1.3 (Def1.3 without the 6xHis-tag) is grouped with
423 defensins characterized as antibacterial (Fig. S2A), since the ATCDL in the N-terminal region
424 and the GFGC at the C-terminal region are sequences present in defensins with bactericidal
425 activity (Schmitt et al. 2016), this analysis showed that TpDef1.3 has the proposed structure for
426 antibacterial defensins ATCDLX₍₁₀₎CAXHCX₍₆₎GGYCX₍₅₎CVCRN (Fig. S2B). However, the
427 fact that rDef1.3 not present bactericidal activity is not strange, since defensins from different
428 organisms have not shown bactericidal activity, e. g. an isoform of human defensin (HD6)
429 (Ericksen, et al., 2005). In arthropods, the Sm2 a peptide from the centipede *Scolopendra*
430 *morsitans* with the typical tertiary structure of an insect defensin (CSαβ) with only two disulfide
431 bridges, showed no antimicrobial activity against five different bacteria and two fungi (Dash, et
432 al., 2014). Through a comparative analysis neither HD6 nor Sm2 have the sites proposed as
433 bactericidal (Data not showed).

434 The effect of rDef1.3 against *T. rangeli* epimastigote was higher than that caused on *T. cruzi*,
435 which makes sense since *T. rangeli* is reported to be a triatomine insect pathogen, mainly
436 reported in the genus *Rhodnius* (Vallejo, et al., 2015). There are no reports of *T. pallidipennis*
437 infected with this parasite in nature; however, under laboratory conditions it has been reported

438 that *T. rangeli* produced intense infections in the gut and hemolymph of *T. pallidipennis* (Tovar,
439 et al., 1989).

440 In both *Leishmania spp* (causative agents of cutaneous leishmaniasis) the change in morphology
441 generated by 84 μ M of rDef1.3 was up to three times greater than that caused to *T. cruzi* or *T.*
442 *rangeli*, this damage was corroborated in *L. major*, with a viability assay. Furthermore, our
443 results showed that the parasites that survive to the treatment proliferated 2 times less than
444 untreated parasites, this result is similar to that observed in the growing recovery curves of *T.*
445 *cruzi*.

446 In the nature, parasites should not be exposed to high concentrations of AMPs or they would
447 become tolerant to the AMP to which they normally are exposed, but they could become
448 susceptible to similar peptides from other insects (Boulanger, et al., 2006). In this study, to
449 determine lethal concentrations of rDef1.3, we use concentrations higher than the parasites will
450 encounter under normal physiological conditions. This has been an strategy in other studies,
451 Boulanger et al., 2004 showed an antiparasitic activity from a defensin present in *Phlebotomus*
452 *duboscqi* against *L. major* at 85 μ M in a natural host-parasite system.

453 Defensins from the tick *Ixodes ricinus*, have been classified in two groups: highly-specific
454 defensins (active only against apicomplexan parasites and without bactericidal activity) and
455 broad-spectrum defensins (active against bacteria, fungi and apicomplexan parasites) (Couto, et
456 al., 2018); within this classification rDef1.3 seems to be highly-specific to trypanosomatids.

457 AMPs are expressed in the midgut of *T. infestans*, specifically affecting gram-negative bacteria,
458 but not *T. cruzi*, which could facilitate the establishment of this pathogen (Buarque et al. 2016).
459 The role of rDef1.3 could be to specifically affect other microorganisms such as *T. rangeli* to

460 reduce competition with *T. cruzi*. Our data suggest that rDef1.3 activity is more effective against
461 parasites that do not transmit in nature, such as *Leishmania spp* which are transmitted by
462 phlebotomous insects.

463 The mechanism of action of rDef1.3 can be through membrane damage as demonstrated by the
464 viability assay, where ethidium bromide reached the nucleus after the membrane was disturbed.
465 In the case of *Leishmania spp.* by bioinformatic analysis, we determined that rDef1.3 could bind
466 to zinc from the active site of gp63 through amino acids A21 and C24 both present in the α -helix,
467 and block its activity (Schlagenhauf et al. 1998; Pandey et al., 2004; Rhaïem & Houïmel, 2016)
468 (Data not showed), however it will be necessary to corroborate this interaction with experimental
469 data. Another alternative mechanism of action is the internalization of rDef1.3 by *L. major* and
470 once inside the cell it could sequester intracellular zinc and affect the growth of the parasite
471 (Saini, et al., 2017).

472 The difference in the percentage of damage between trypanosomatids can also be attributed to the
473 composition of cell membranes (fluidity, negative charge density, and absence or presence of
474 cholesterol) since trypanosomatids exhibit a negatively charged surface whose value is species-
475 specific and varies according to the developmental stages (Souto-Padrón, 2002).

476 Both leishmaniasis and Chagas disease are neglected diseases that currently continue to be a
477 serious health problem in the American continent. Currently, there is not effective vaccine against
478 neither of these two parasites and the drug treatments are limited by high toxicity, therefore the
479 search for new therapeutic alternatives is decisive. Since antimicrobial peptides have been
480 considered as an alternative therapeutic option for different pathogens, this work is one of the
481 first reports where the effect of a defensin from a triatomine insect was evaluated against the

482 causative agents of these two tropical diseases, this first approach could be serve as a model to
483 optimize its activity by modifying or adding amino acids or other reactive groups to produce a
484 more powerful hybrid peptide.

485 **Conclusions**

486 Insects have been a promising source of novel AMPs. In this work, we carry out a
487 straightforward procedure to obtain a recombinant insect defensin type 1 (rDef1.3) from *T.*
488 *pallidipennis*, one of the main vectors of *T. cruzi* in México. Our data demonstrate for the first
489 time a defensin with an activity, against several trypanosomatids. Owing to the urgent search for
490 new strategies to control major human parasitic diseases, rDef1.3 is a good candidate to continue
491 with further studies to determine its mechanisms of action on the different affected
492 trypanosomatids.

493 **Competing interests**

494 The authors declare that they have no competing interests.

495 **Authors' contributions**

496 Díaz-Garrido, P., performed most of the experiments, analyzed the results and wrote the
497 manuscript; Cárdenas-Guerra, R., participated with the overexpression, purification/refolding of
498 rDef1.3, as well as functionality analysis against trypanosomatids and participated in the
499 manuscript writing; Martínez, I. assisted with trypanosomatid culture, flow cytometry,
500 bioinformatics assays and participated in the final writing of the manuscript; Poggio, S.,
501 coordinated the cloning of *def1* in pQE-30; Rodríguez-Hernández, K., performed most of the
502 flow cytometry tests; Rivera Santiago, L. assisted with flow cytometry and statistics analysis;
503 Ortega-López, J., coordinate the purification protein; Sánchez-Esquivel, S. assisted with the

504 Kirby-Bauer assays and Espinoza, B., proposed the ideas of the project, obtained the economic
505 support, coordinated the project experiments and participated in the final writing and review of
506 the manuscript.

507 **Acknowledgment**

508 Díaz-Garrido, P., a PhD student in Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad
509 Nacional Autónoma de México (UNAM), appreciates the support of CONACyT (663015
510 scholarship). We thank Dr. Gerardo Corzo (Instituto de Biotecnología, UNAM) for donating the
511 plasmid pQE-30 and the *E. coli* strain M15 [pREP4]; M. C. Patricia de la Torre (Instituto de
512 Investigaciones Biomédicas, UNAM) for sequencing the pQE-30_def1.3 construct; M. C.
513 Emmanuel Ríos Castro (Unidad de Genómica, Proteómica y Metabolómica, LaNSE, Cinvestav-
514 IPN) for the analysis of the mass spectrometry samples; Ing. Octavio Montes Flores
515 (Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, Cinvestav-IPN) for his help in expression and
516 purification techniques; M. B. Beatriz Ruiz Villafán (Instituto de Investigaciones Biomédicas,
517 UNAM) for the analysis of activity against bacteria and Dr. Mauricio Trujillo (Instituto de
518 Investigaciones Biomédicas, UNAM) for the donation of dialysis membrane and concentrating
519 filters.

520 **Ethics approval**

521 All the procedures were carried out according to the Ethic Code of the Instituto de
522 Investigaciones Biomédicas for animal care.

523 **Financial support**

524 BE acknowledge the financial support of Instituto de Investigaciones Biomedicas, UNAM. JOL
525 acknowledge the financial support of CONACYT INFR-2016-269657.

526 **References**

- 527 1. Araújo, C., Waniek, P., Stock, P., Mayer, C., Jansen, A. & Schaub, G. 2006. Sequence
528 characterization and expression patterns of defensin and lysozyme encoding genes from
529 the gut of the reduviid bug, *Triatoma brasiliensis*. *Insect Biochem Mol Biol*, 36: 547 -
530 560. doi: 10.1016/j.ibmb.2006.04.003.
- 531 2. Araújo, C., Lima A., Jansen, A., Galvão, C., Jurberg, J., Costa, J., Azambuja, P. &
532 Waniek, P. 2015. Genes encoding defensins of important Chagas disease vectors used for
533 phylogenetic studies. *Parasitol Res*, 114: 4503 - 4511. doi: 10.1007/s00436-015-4694-6.
- 534 3. Arroyo-Olarte, R., Martínez-Martínez, I., Cruz Rivera, M., Mendlovic, F. & Espinoza, B.
535 2018. Complement system contributes to modulate the infectivity of susceptible TcI
536 strains of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 113: e170332. doi:
537 10.1590/0074-02760170332.
- 538 4. Berzunza-Cruz, M., Rodríguez-Moreno, A., Gutiérrez-Granados, G., González-Salazar,
539 C., Stephens, C., Hidalgo-Mihart, M., Marina, C., Rebollar-Téllez, E., Bailón-Martínez,
540 D., Domingo, C., Ibarra-Cerdeña, C., Sánchez-Cordero, V. & Becker, I. 2015.
541 *Leishmania (L.) mexicana* Infected Bats in Mexico: Novel Potential Reservoirs. *PLoS*
542 *Negl Trop Dis*, 9: e0003438. 10.1371/journal.pntd.0003438.
- 543 5. Bou, D., Tempone, A., Pinto, É., Lago, J. & Sartorelli, P. 2014. Antiparasitic activity and
544 effect of casearins isolated from *Casearia sylvestris* on *Leishmania* and *Trypanosoma*
545 *cruzi* plasma membrane. *Phytomedicine*, 21: 676 - 81. doi:
546 10.1016/j.phymed.2014.01.004.

- 547 6. Boulanger, N., Bulet, P. & Lowenberger, C. 2006. Antimicrobial peptides in
548 the interactions between insects and flagellate parasites. *Trends Parasitol*, 22: 262 - 268.
549 doi: 10.1016/j.pt.2006.04.003.
- 550 7. Boulanger, N., Lowenberger, C., Volf, P., Ursic, R., Sigutove, L., Sabatier, L.,
551 Svobodova, M., Beverley, S., Späth, G., Brun, R., Pesson, B. & Bulet, P. 2004.
552 Characterization of a defensin from the sand fly *Phlebotomus duboscqi* induced by
553 challenge with bacteria or the protozoan parasite *Leishmania major*. *Infect Immun*, 72:
554 7140 - 7146. doi: 10.1128/IAI.72.12.7140-7146.2004.
- 555 8. Brand, G., Leite, J., Silva, L., Albuquerque, S., Prates, M., Azevedo, R., Carregaro, V.,
556 Silva, J., Sá, V., Brandão, R. & Bloch, C. 2002. Dermaseptins from *Phyllomedusa*
557 *oreades* and *Phyllomedusa distincta*. Anti-*Trypanosoma cruzi* activity without
558 cytotoxicity to mammalian cells. *J Biol Chem*, 277: 49332 - 49340. doi:
559 10.1074/jbc.M209289200.
- 560 9. Buarque, D., Gomes, C., Araújo, R., Pereira, M., Ferreira, R., Guarneri, A. & Tanaka, A.
561 2016. A new antimicrobial protein from the anterior midgut of *Triatoma infestans*
562 mediates *Trypanosoma cruzi* establishment by controlling the microbiota. *Biochimie*,
563 123: 138 - 143. doi: 10.1016/j.biochi.2016.02.009.
- 564 10. Cárdenas-Guerra, R., Ortega-López, J., Flores-Pucheta, C., Benítez-Cardoza, C. &
565 Arroyo, R. 2015. The recombinant prepro region of TvCP4 is an inhibitor of cathepsin L-
566 like cysteine proteinases of *Trichomonas vaginalis* that inhibits trichomonal haemolysis.
567 *Int J Biochem Cell Biol*, 59: 73 - 83. doi: 10.1016/j.biocel.2014.12.001.
- 568 11. Corrales-Garcia, L., Possani, L. & Corzo, G. 2011. Expression systems of human b-
569 defensins: vectors, purification and biological activities. *Amino Acids*, 40: 5 - 13. doi:
570 10.1007/s00726-010-0493-7.

- 571 12. Corrales-García, L., Ortíz, E., Castañeda-Delgado, J., Rivas-Santiago, B. & Corzo, G.
572 2013. Bacterial expression and antibiotic activities of recombinant variants of human b-
573 defensins on pathogenic bacteria and *M. tuberculosis*. *Protein Expr Purif*, 89: 33 - 43. doi:
574 10.1016/j.pep.2013.02.007.
- 575 13. Costa, S., Almeida, A., Castro, A. & Domingues, L. 2014. Fusion tags for protein
576 solubility, purification and immunogenicity in *Escherichia coli*: the novel Fh8 system.
577 *Front Microbiol*, 5: 1 - 20. doi: 10.3389/fmicb.2014.00063.
- 578 14. Couto, J., Tonk, M., Ferrolho, J., Antunes, S., Vilcinskis, A., De la Fuente, J., Domingos,
579 A. & Cabezas-Cruz, A. 2018. Antiplasmodial activity of tick defensins in a mouse model
580 of malaria. *Ticks Tick Borne Dis*, 9: 844 - 849. doi: 10.1016/j.ttbdis.2018.03.011.
- 581 15. Dash, T., Shafee, T., Harvey, P., Zhang, C., Peigneur, S., Deuis, J., Tytgat, J., Anderson,
582 M., Craik, D., Durek, T. & Undheim, E. 2014. A centipede toxin family defines an
583 ancient class of CS $\alpha\beta$ defensins. *Structure*, 5: 315 - 326.e7. doi:
584 10.1016/j.str.2018.10.022.
- 585 16. Dassanayake, R., Gunawardene, Y. & Tobe, S. 2007. Evolutionary selective trends of
586 insect/mosquito antimicrobial defensin peptides containing cysteine-stabilized α/β motifs.
587 *Peptides*, 28: 62 - 75. doi: 10.1016/j.peptides.2006.09.022.
- 588 17. Dey, T., Afrin, F., Anam, K. & Ali, N. 2002. Infectivity and virulence of *Leishmania*
589 *donovani* promastigotes: a role for media, source, and strain of parasite. *J Eukaryot*
590 *Microbiol*, 49: 270 - 274. doi: 10.1111/j.1550-7408.2002.tb00369.x.
- 591 18. Díaz-Garrido, P., Sepúlveda-Robles, O., Martínez-Martínez, I. & Espinoza, B. 2018.
592 Variability of defensin genes from a Mexican endemic Triatominae: *Triatoma (Meccus)*
593 *pallidipennis* (Hemiptera: Reduviidae). *Biosci Rep*, 38: 1 - 11. doi:
594 10.1042/BSR20180988.

- 595 19. Dos-Santos, A., Dick C., Silveira, T., Fonseca-de-Souza, A. & Meyer-Fernandes, J. 2013.
596 *Trypanosoma rangeli*: an alkaline ecto-phosphatase activity is involved with survival and
597 growth of the parasite. *Exp Parasitol*, 135: 459 - 465. doi: 10.1016/j.exppara.2013.08.014.
- 598 20. Eaton, P., Bittencourt, C., Costa Silva, V., Vêras, L., Costa, C., Feio, M. & Leite, J. 2014.
599 Anti-leishmanial activity of the antimicrobial peptide DRS 01 observed in *Leishmania*
600 *infantum* (syn. *Leishmania chagasi*) cells. *Nanomedicine*, 10: 483 - 90. doi:
601 10.1016/j.nano.2013.09.003.
- 602 21. Edgar, R.. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high
603 throughput. *Nucleic Acids Res*, 32:1792 - 1797. doi: 10.1093/nar/gkh340
- 604 22. Ericksen, B., Wu, Z., Lu, W. & Lehrer, R. 2005. Antibacterial activity and specificity of
605 the six human {alpha}-defensins. *Antimicrob Agents Chemother*, 49: 269 - 275. doi:
606 10.1128/AAC.49.1.269-275.2005.
- 607 23. Espinoza, B., Rico, T., Sosa, S., Oaxaca, E., Vizcaino-Castillo, A., Caballero, M. &
608 Martínez, I. 2010. Mexican *Trypanosoma cruzi* *T. cruzi*-I strains with different degrees of
609 virulence induce diverse humoral and cellular immune responses in a murine
610 experimental infection model. *J Biomed Biotechnol*, 890672: 1 - 10. doi:
611 10.1155/2010/890672.
- 612 24. Farlei, W., Uboldi, A., De Souza, D., Gemmings, H., Nicola, N. & Baca, M. 2002. A
613 fusion protein system for the recombinant production of short disulfide-containing
614 peptides. *Protein Expr Purif*, 26: 171 - 178. doi: 10.1016/s1046-5928(02)00521-1.
- 615 25. Ganz, T. 2003. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol*,
616 3: 710 - 720. doi: 10.1038/nri1180.

- 617 26. Ganz, T. & Lehrer, R. 1995. Defensins. *Pharmacol Ther*, 66: 191 - 205. doi:
618 10.1016/0952-7915(94)90145-7.
- 619 27. Hernández C., Mor. A., Dagger, F., Nicolas, P., Hernandez, A., Benedetti, EL. & Dunia,
620 I. 1992. Functional and structural damage in *Leishmania mexicana* exposed to the cationic
621 peptide dermaseptin. *Eur J Cell Biol*, 59: 414 - 424.
- 622 28. Jendele, L., Krivak, R., Skoda, P., Novotny, M., & Hoksza, D. 2019. PrankWeb: a web
623 server for ligand binding site prediction and visualization. *Nucleic Acids Res*, 47: W345 -
624 W349. doi: 10.1093/nar/gkz424.
- 625 29. Koehbach, J. 2017. Structure-activity relationships of insect defensins. *Front Chem*, 5: 1 –
626 10. doi: 10.3389/fchem.2017.00045.
- 627 30. Lemaitre B. & Hoffman, J. 2007. The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu.*
628 *Rev. Immunol*, 25: 697 - 743. doi: 10.1146/annurev.immunol.25.022106.141615.
- 629 31. Li, Y. 2011. Recombinant production of antimicrobial peptides in *Escherichia coli*: A
630 review. *Protein Expr Purif*, 80: 260 - 267. doi: 10.1016/j.pep.2011.08.001.
- 631 32. López, L., Morales, G., Ursic, R., Wolff, M. & Lowemberger, C. 2003. Isolation and
632 characterization of a novel insect defensin from *Rhodnius prolixus*, a vector of Chagas
633 disease. *Insect Biochem Mol Biol*, 33: 439 - 447. doi: 10.1016/s0965-1748(03)00008-0.
- 634 33. Lowemberger, C., Smartt, T., Bulet, M., Severson, D., Hoffmann, J. & Christensen B.
635 2003. Insect immunity: molecular cloning, expression, and characterization of cDNAs
636 and genomic DNA encoding three isoforms of insect defensin in *Aedes aegypti*. *Insect*
637 *Mol Biol*, 8: 107 - 118. doi: 10.1046/j.1365-2583.1999.810107.x.
- 638 34. Martínez-Ibarra, J., Valencia-Navarro, I., León-Saucedo, S., Ibáñez-Cervantes, G.,
639 Bustos-Saldaña, R., Montañez-Valdez, O., Cervantes Díaz, O. & Noguera-Torres, B.
640 2011. Distribution and infection of triatomines (Hemiptera: Reduviidae) by *Trypanosoma*

- 641 *cruzi* in the state of Michoacán, México. Mem Inst Oswaldo Cruz, 106: 445 - 450. doi:
642 10.1590/s0074-02762011000400010.
- 643 35. Nicolas, P. & El Amri, C. 2009. The dermaseptin superfamily: A gene-based
644 combinatorial library of antimicrobial peptides. Biochimica et Biophysica Acta, 1788:
645 1537 - 1550. doi: 10.1016/j.bbamem.2008.09.006.
- 646 36. Pandey, S., Chakraborti, P., Sharma, R., Bandyopadhyay, S., Sarkar, D. & Adhya, S.
647 2004. Involvement of *Leishmania donovani* major surface glycoprotein gp63 in
648 promastigote multiplication. J Biosci, 29:15 - 22. doi: 10.1007/BF02702557.
- 649 37. Rambaut, A. 2006. FigTree: tree figure drawing tool. In FigTree, Ed. Edinburg, TX,
650 USA: Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburg, USA
- 651 38. Ramsey, J., Peterson, A., Carmona-Castro, O., Moo-Llanes, D., Naksawa, Y., Butrick,
652 M., Tun-Ku, A., Cruz-Félix, K. & Ibarra-Cerdeño, C. 2015. Atlas of Mexican
653 Triatominae (Reduviidae: Hemiptera) and vector transmission of Chagas disease.
654 Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 110: 339 - 352. doi. 10.1590/0074-02760140404.
- 655 39. Rhaïem, R. & Houïmel, M. 2016. Targeting *Leishmania major* parasite with peptides
656 derived from a combinatorial phage display library. Acta Trop, 159: 11 - 19. doi:
657 10.1016/j.actatropica.2016.03.018.
- 658 40. Roy, A., Kucukural, A. & Zhang, Y. 2010. I-TASSER: a unified platform for automated
659 protein structure and function prediction. Nat Prot, 5: 725 - 738. doi:
660 10.1038/nprot.2010.5.
- 661 41. Saini, S., Bharati, K., Shaha, C. & Mukhopadhyay, C. 2017. Zinc depletion promotes
662 apoptosislike death in drug-sensitive and antimony-resistance *Leishmania donovani*. Sci
663 Rep, 7: 10488. doi: 10.1038/s41598-017-10041-6.

- 664 42. Schägger, H. 2006. Tricine–SDS-PAGE. *Nat Protoc*, 1: 16 - 22. doi:
665 10.1038/nprot.2006.4.
- 666 43. Schlagenhauf, E., Etagens, R. & Metcalf, P. 1998. The crystal structure of the *Leishmania*
667 *major* surface proteinase leishmanolysin (gp63). *Structure*, 6: 1035 - 1046. doi:
668 10.1016/s0969-2126(98)00104-x.
- 669 44. Schmitt, P., Rosa, R. & Destoumieux-Garzón, D. 2016. An intimate link between
670 antimicrobial peptide sequence diversity and binding to essential components of bacterial
671 membranes. *Biochim Biophys Acta*, 1858: 958 - 970. doi:
672 10.1016/j.bbamem.2015.10.011.
- 673 45. Schmoldt, H., Wentzel, A., Becker, S. & Kolmar, H. 2005. A fusion protein system for
674 the recombinant production of short disulfide bond rich cystine knot peptides using
675 barnase as a purification handle. *Protein Expr Purif*, 39: 82 - 89. doi:
676 10.1016/j.pep.2004.09.016.
- 677 46. Shevchenko, A., Tomas, H., Havlis, J., Olsen, J. & Mann, M. 2006, In-gel digestion for
678 mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc*, 1: 2856 -
679 2860. doi: 10.1038/nprot.2006.468.
- 680 47. Song, W., Shi, Y., Xiao, M., Lu, H., Qu, T., Li, P., Wu, W. & Tian, Y. 2009. *In vitro*
681 bactericidal activity of recombinant human beta-defensin-3 against pathogenic bacterial
682 strains in human tooth root canal. *Int J Antimicrob Agents*, 33: 237 - 243. doi:
683 10.1016/j.ijantimicag.2008.05.022.
- 684 48. Souto-Padrón, T. 2002. The surface charge of trypanosomatids. *An Acad Bras Cienc.*, 74:
685 649 - 675. doi: 10.1590/s0001-37652002000400007.

- 686 49. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. & Kumar, S. 2013. MEGA6:
687 Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol*, 30: 2725 - 2729.
688 doi: 10.1093/molbev/mst197.
- 689 50. Tonk, M. & Vilcinskas, A. 2017. The medical potential of antimicrobial peptides from
690 insects. *Curr Top Med Chem*, 17: 554 - 575. doi: 10.2174/1568026616666160713123654.
- 691 51. Torres-Guerrero, E., Quintanilla-Cedillo, M., Ruiz-Esmenjaud, J. & Arenas, R. 2017.
692 Leishmaniasis: a review. *F1000Res*, 6: 1 – 15. doi: 10.12688/f1000research.11120.1.
- 693 52. Tovar, D., Urdaneta-Morales, S. & Tejero, F. 1989. *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli*
694 Tejera, 1920: study of the effects of the parasite on the vector. *Acta Cient Venez*, 40: 208
695 - 214.
- 696 53. Vallejo, G., Suárez, Y., Olaya, J., Gutiérrez, S., & Carranza, J. 2015. *Trypanosoma*
697 *rangeli*: un protozoo infectivo y no patógeno para el humano que contribuye al
698 entendimiento de la transmisión vectorial y la infección por *Trypanosoma cruzi*, agente
699 causal de la enfermedad de Chagas. *Rev. Acad. Colomb. Cienc. Ex. Fis. Nat*, 39: 111-
700 122.
- 701 54. Vieira, C., Waniek, P., Castro, D., Mattos, D., Moreira, O. & Azambuja, P. 2016. Impact
702 of *Trypanosoma cruzi* on antimicrobial peptide gene expression and activity in the fat
703 body and midgut of *Rhodnius prolixus*. *Parasit Vectors*, 9: 1 – 12. doi 10.1186/s13071-
704 016-1398-4.
- 705 55. Vieira, C., Waniek, P., Mattos, D., Castro, D., Mello, C., Ratcliffe, N., Garcia, E. &
706 Azambuja, P. 2014. Humoral responses in *Rhodnius prolixus*: bacterial feeding induces
707 differential patterns of antibacterial activity and enhances mRNA levels of antimicrobial
708 peptides in the midgut. *Parasit Vectors*, 7: 1 - 13. doi: 10.1186/1756-3305-7-232.

- 709 56. Wang, F., Fang, X., Xu, Z., Peng, L. & Cen, P. 2004. Fusion expression of human b-
710 defensin-2 from multiple joined genes in *Escherichia coli*. *Prep Biochem Biotechnol*, 34:
711 215 - 225. doi: 10.1081/PB-200026797.
- 712 57. Waniek, P., Castro, H., Sathler, P., Miceli, L., Jansen, A. & Araújo, C. 2009. Two novel
713 defensin-encoding genes of the Chagas disease vector *Triatoma brasiliensis* (Reduviidae,
714 Triatominae): Gene expression and peptide-structure modeling. *J Insect Physiol*, 55: 840
715 – 848. doi: 10.1016/j.jinsphys.2009.05.015.
- 716 58. Waniek, P., Jansen, A. & Araújo, C. 2011. *Trypanosoma cruzi* infection modulates the
717 expression of *Triatoma brasiliensis* def1 in the midgut. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 11:
718 845 - 847. doi: 10.1089/vbz.2010.0020.
- 719 59. Who (2019). [http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-](http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))
720 [\(american-trypanosomiasis\).](http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))
- 721 60. Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J. & Zhang, Y. 2015. The I-TASSER Suite:
722 Protein structure and function prediction. *Nat Methods*, 12: 7 - 8. doi:
723 10.1038/nmeth.3213.
- 724 61. Yang, J. & Zhang, Y. 2015. I-TASSER server: new development for protein structure and
725 function predictions. *Nucleic Acids Res*, 43: W174 - W181. doi: 10.1093/nar/gkv342.
- 726 62. Yi, H., Chowdhury, M., Huang, Y. & Yu, X. 2014. Insect antimicrobial peptides and their
727 applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 98: 5807 - 5822. doi: 10.1007/s00253-014-
728 5792-6.
- 729 63. Zhang, C., Freddolino, P. L. & Zhang, Y. 2017. COFACTOR: improved protein function
730 prediction by combining structure, sequence and protein-protein interaction information.
731 *Nucleic Acids Res*, 45(W1), W291-W299. doi: 10.1093/nar/gkx366.

- 732 64. Zumaya-Estrada, F., Martínez-Barnette, J., Lavore, A., Rivera-Pomar, R. & Henry
733 Rodríguez, M. 2018. Comparative genomics analysis of Triatomines reveals common
734 first line and inducible immunity-related genes and the absence of Imd canonical
735 components among hemimetabolous arthropods. *Parasit Vectors*, 11:48. doi:
736 10.1186/s13071-017-2561-2.
737

738 **Legends Figures**739 **Figure 1. Plasmid construct of pQE-30_def1, molecular modeling of rDef1.3 and alignment**740 **of triatomine defensins.** (A) Schematic representation of the expression vector pQE-30 with741 *def1*, between restriction sites of *Bam*HI and *Pst*I. (B) The cDNA sequence of *def1* mature

742 region. The stop codon is indicated by asterisks. The deduced amino acid sequence includes the

743 6xHis-tag in de N-terminal and the sequence corresponding to the mature defensin is marked in

744 bold. (C) Molecular modeling of rDef1.3 compared to TpDef1.2 generated using I-TASSER.

745 Both exhibit the same structural topology conformed by three disulfide bonds as well as an α -746 helix and β -sheets, which is known as cysteine-stabilized (CS $\alpha\beta$) motif. The 6 cysteines are

747 marked in yellow; the different amino acid between both sequences is marked in blue (V by L)

748 and the 6xHis-tag in red. (D) Alignment of different triatomine defensins, as an external group a

749 *Lutzomyia* defensin was introduced. The only amino acid different from rDef1.3 with respect to

750 TpDef1.2 is marked in red and indicated with an arrow. The mating of the cysteines are indicated

751 at the top of the alignment, as well as the position of the two β -sheets and one α -helix. (*)

752 Identical amino acid residues between the sequences, (:) indicates conservation between groups

753 of strongly similar properties and (.) indicates conservation between groups of weakly similar

754 properties.

755 **Figure 2. Expression, purification, and dialysis of rDef1.3.** (A) Tricine SDS-PAGE (15%)756 analysis of the rDef1.3 expressed in *E. coli* M15. Lane 1, correspond to non-induced (NI)

757 extracts; lane 2, IPTG-induced (I) extracts; lane 3, soluble fraction (SF); lane 4, insoluble fraction

758 (IF); lane 5, IMAC purification in denaturing conditions (P); lane 6, dialysis (D). (B) Western-

759 blot analysis of rDef1.3. Detection of the recombinant peptide was performed with anti-His tag

760 antibody. (C) Representative spectrum of the ATCDLLSFESK peptide sequencing obtained
761 using MS/MS to the identification of protein rDef1.3.

762 **Figure 3. rDef1.3 generates morphological changes in *T. cruzi* epimastigote.** (A)
763 Representative micrographs showing the cellular shape of *T. cruzi* epimastigotes subjected to
764 different concentrations of rDef1.3. In PBS, control epimastigotes showing a typical elongated
765 cell shape. Parasites exposed to rDef1.3 showed rounded shape (arrowhead) and some of them
766 lack flagellum (enclosed in a circle). Parasites stained with Giemsa. (B) Percentage of
767 epimastigote with morphological alterations at different concentrations of rDef1.3. The error bars
768 indicate the average of three experiments, the significant difference with respect to the control
769 group is indicated by * $p < 0.01$ or ** $p < 0.0001$.

770 **Figure 4. Analysis of viability (death and damage to the cell membrane) of *T. cruzi***
771 **epimastigote and growth inhibition by rDef1.3.** (A) Death and damage to the membrane were
772 analyzed by the flow cytometry technique, the concentrations of 21, 42, and 84 μM of rDef1.3
773 were used. Flow cytometric dot plots of *T. cruzi* epimastigote, cells stained only with C-AM (LIT
774 medium), heat-killed cells (55 °C), and cells incubated with the rDef1.3 vehicle (PBS). Cells in
775 the lower right quadrant were positive only for C-AM and cells in the upper left quadrant were
776 positive only for EthD-1. Events in the upper right quadrant were double-positive for both
777 markers, whereas the lower left quadrant corresponds to the cells negative for both dyes. The dot
778 plots are representative of triplicate experiments with similar results. There were 20,000 recorded
779 events/experimental condition (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.005$). (B) Recovery of epimastigote growth
780 rate after the treatment or no treatment with 84 μM rDef1.3. The number of parasites was counted
781 every two days. The error bars indicate the average of three experiments, asterisk represents a
782 significant difference with respect to the control group PBS, * $p < 0.0001$.

783 **Figure 5. rDef1.3 generates morphological changes in *T. rangeli*, *L. major*, and *L. mexicana*.**

784 (A) Representative micrographs showing the cellular shape of *T. rangeli* epimastigotes, *L. major*
785 and *L. mexicana* promastigote subjected to 84 μM rDef1.3. In PBS, control parasites showing a
786 typical cell shape. Parasites exposed to rDef1 showed rounded shape (closed in a circle), lysed
787 cells (arrow) and some of them with a short flagellum (arrowhead). Parasites stained with
788 Giemsa. (B) Percentage of cells with atypical morphology. The error bars indicate the average of
789 three experiments, the asterisk represents a significant difference with respect to the control
790 group PBS (* $p < 0.01$, ** $p < 0.001$).

791 **Figure 6. Analysis of death and damage to the cell membrane of *L. major* promastigote and**

792 **growth inhibition by rDef1.3.** (A) Death and damage to the membrane were analyzed by the
793 flow cytometry technique, the concentrations of 21, 42, and 84 μM of rDef1.3 were used. Flow
794 cytometric, dot plots of cell population separation from *L. major*, cells stained only with C-AM
795 (M199 medium), heat-killed cells stained with EthD-1 (55 °C), and cells incubated with the
796 rDef1 vehicle (PBS). Cells in the lower right quadrant were positive only for C-AM, cells in the
797 upper left quadrant were positive only for EthD-1. Events in the upper right quadrant were
798 double-positive for both markers, whereas the lower left quadrant corresponds to the cells
799 negative for both dyes. The dot plots are representative of triplicate experiments with similar
800 results. There were 20,000 recorded events/experimental conditions, the significant differences
801 with respect to the control group is indicated * $p < 0.0001$. (B) Recovery of promastigote growth
802 rate after the treatment or no treatment with 84 μM rDef1.3. The number of parasites was counted
803 every two days. The recovery observed in the growth of treated promastigotes was twice less than
804 untreated parasites. The error bars indicate the average of a duplicate experiment and the asterisks
805 represents significant differences with respect to the control group PBS * $p < 0.001$.

806 **Figure S1. Antibacterial activity of rDef1.3 against *E. coli* and *M. luteus*.** The antibacterial
 807 activity of recombinant defensin was determined by inhibition zone assay. Ampicillin (Amp, 3
 808 μg) and PBS were used as controls in the inhibition zone assay; 25 and 100 μg of the rDef1 were
 809 tested. The plates were incubated at 37 °C overnight, and the diameters of inhibition zones were
 810 measured and recorded.

811 **Figure S2. Comparative analysis of defensins with bactericidal and fungicidal activity.** (A)
 812 Phylogenetic tree of TpDef1.3, bactericidal and antifungal CS $\alpha\beta$ defensins were aligned by
 813 MUSCLE and generate a Neighbor-joining analysis. Values in nodes are Bootstrap (10, 000
 814 replicates). (B) Comparison of TpDef1.3 (arrowhead) with antibacterial and antifungal CS $\alpha\beta$
 815 defensins. Typical cysteines are marked in red, the sequences of antibacterial defensins are shown
 816 in yellow and the GXCX₍₃₋₉₎ in gray. The amino acids important for its function is marked in bold
 817 and the amino acids important for the ionic interactions with phospholipids in blue boxes.

818

819

820 **Table 1.** Peptides identified by ESI-LC–MS/MS analysis of rDef1.3.

Accession number	Name	Molecular Weight (kDa)	Score	Sequence Coverage (%)	Peptide sequence (aa)
MN557396	def1.3 ^a	5.7	1553.646	25	ATC SFESK DLLSFESK DLLSFESKWTPN

821
 822 65. ^a Gene name uploaded to GeneBank

823 **Legends Figures**824 **Figure 1. Plasmid construct of pQE-30_def1, molecular modeling of rDef1 and alignment of**825 **triatomine defensins.** (A) Schematic representation of the expression vector pQE-30 with *def1*,826 between restriction sites of *Bam*HI and *Pst*I. (B) The cDNA sequence of *def1* mature region. The

827 stop codon is indicated by asterisks. The deduced amino acid sequence includes the 6xHis-tag in

828 de N-terminal and the sequence corresponding to the mature defensin is marked in bold. (C)

829 Molecular modeling of rDef1 compared to TpDef1.2 generated using I-TASSER. Both exhibit

830 the same structural topology conformed by three disulfide bonds as well as an α -helix and β -831 sheets, which is known as cysteine-stabilized (CS $\alpha\beta$) motif. The 6 cysteines are marked in

832 yellow; the different amino acid between both sequences is marked in blue (V by L) and the

833 6xHis-tag in red. (D) Alignment of different triatomine defensins, as an external group a

834 *Lutzomyia* defensin was introduced. The only amino acid different from rDef1 with respect to

835 TpDef1.2 is marked in red and indicated with an arrow. The mating of the cysteines are indicated

836 at the top of the alignment, as well as the position of the two β -sheets and one α -helix. (*)

837 Identical amino acid residues between the sequences, (:) indicates conservation between groups

838 of strongly similar properties and (.) indicates conservation between groups of weakly similar

839 properties.

840 **Figure 2. Expression, purification, and dialysis of rDef1.** (A) Tricine SDS-PAGE (15%)841 analysis of the rDef1 expressed in *E. coli* M15. Lane 1, correspond to non-induced (NI) extracts;

842 lane 2, IPTG-induced (I) extracts; lane 3, soluble fraction (SF); lane 4, insoluble fraction (IF);

843 lane 5, IMAC purification in denaturing conditions (P); lane 6, dialysis (D). (B) Western-blot

844 analysis of rDef1. Detection of the recombinant peptide was performed with anti-His tag

845 antibody. (C) Representative spectrum of the ATCDLLSFESK peptide sequencing obtained
846 using MS/MS to the identification of protein rDef1.

847 **Figure 3. rDef1 generates morphological changes in *T. cruzi* epimastigote.** (A) Representative
848 micrographs showing the cellular shape of *T. cruzi* epimastigotes subjected to different
849 concentrations of rDef1. In PBS, control epimastigotes showing a typical elongated cell shape.
850 Parasites exposed to rDef1 showed rounded shape (arrowhead) and some of them lack flagellum
851 (enclosed in a circle). Parasites stained with Giemsa. (B) Percentage of epimastigote with
852 morphological alterations at different concentrations of rDef1. The error bars indicate the average
853 of three experiments, the significant difference with respect to the control group is indicated by
854 * $p < 0.01$ or ** $p < 0.0001$.

855 **Figure 4. Analysis of viability (death and damage to the cell membrane) of *T. cruzi***
856 **epimastigote and growth inhibition by rDef1.** (A) Death and damage to the membrane were
857 analyzed by the flow cytometry technique, the concentrations of 21, 42, and 84 μM of rDef1 were
858 used. Flow cytometric dot plots of *T. cruzi* epimastigote, cells stained only with C-AM (LIT
859 medium), heat-killed cells (55 °C), and cells incubated with the rDef1 vehicle (PBS). Cells in the
860 lower right quadrant were positive only for C-AM and cells in the upper left quadrant were
861 positive only for EthD-1. Events in the upper right quadrant were double-positive for both
862 markers, whereas the lower left quadrant corresponds to the cells negative for both dyes. The dot
863 plots are representative of triplicate experiments with similar results. There were 20,000 recorded
864 events/experimental condition (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.005$). (B) Recovery of epimastigote growth
865 rate after the treatment or no treatment with 84 μM rDef1. The number of parasites was counted
866 every two days. The error bars indicate the average of three experiments, asterisk represents a
867 significant difference with respect to the control group PBS, * $p < 0.0001$.

868 **Figure 5. rDef1 generates morphological changes in *T. rangeli*, *L. major*, and *L. mexicana*.**

869 (A) Representative micrographs showing the cellular shape of *T. rangeli* epimastigotes, *L. major*
870 and *L. mexicana* promastigote subjected to 84 μ M rDef1. In PBS, control parasites showing a
871 typical cell shape. Parasites exposed to rDef1 showed rounded shape (closed in a circle), lysed
872 cells (arrow) and some of them with a short flagellum (arrowhead). Parasites stained with
873 Giemsa. (B) Percentage of cells with atypical morphology. The error bars indicate the average of
874 three experiments, the asterisk represents a significant difference with respect to the control
875 group PBS (* p <0.01, ** p <0.001).

876 **Figure 6. Analysis of death and damage to the cell membrane of *L. major* promastigote and**

877 **growth inhibition by rDef1.** (A) Death and damage to the membrane were analyzed by the flow
878 cytometry technique, the concentrations of 21, 42, and 84 μ M of rDef1 were used. Flow
879 cytometric, dot plots of cell population separation from *L. major*, cells stained only with C-AM
880 (M199 medium), heat-killed cells stained with EthD-1 (55 °C), and cells incubated with the
881 rDef1 vehicle (PBS). Cells in the lower right quadrant were positive only for C-AM, cells in the
882 upper left quadrant were positive only for EthD-1. Events in the upper right quadrant were
883 double-positive for both markers, whereas the lower left quadrant corresponds to the cells
884 negative for both dyes. The dot plots are representative of triplicate experiments with similar
885 results. There were 20,000 recorded events/experimental conditions, the significant differences
886 with respect to the control group is indicated * p <0.0001. (B) Recovery of promastigote growth
887 rate after the treatment or no treatment with 84 μ M rDef1. The number of parasites was counted
888 every two days. The recovery observed in the growth of treated promastigotes was twice less than
889 untreated parasites. The error bars indicate the average of a duplicate experiment and the asterisks
890 represents significant differences with respect to the control group PBS * p <0.001.

891 **Figure S1. Antibacterial activity of rDef1 against *E. coli* and *M. luteus*.** The antibacterial
 892 activity of recombinant defensin was determined by inhibition zone assay. Ampicillin (Amp, 3
 893 μg) and PBS were used as controls in the inhibition zone assay; 25 and 100 μg of the rDef1 were
 894 tested. The plates were incubated at 37 °C overnight, and the diameters of inhibition zones were
 895 measured and recorded.

896 **Figure S2. Comparative analysis of defensins with bactericidal and fungicidal activity.** (A)
 897 Phylogenetic tree of TpDef1.3, bactericidal and antifungal CS $\alpha\beta$ defensins were aligned by
 898 MUSCLE and generate a Neighbor-joining analysis. Values in nodes are Bootstrap (10, 000
 899 replicates). (B) Comparison of TpDef1.3 (arrowhead) with antibacterial and antifungal CS $\alpha\beta$
 900 defensins. Typical cysteines are marked in red, the sequences of antibacterial defensins are shown
 901 in yellow and the GXCX₍₃₋₉₎ in gray. The amino acids important for its function is marked in bold
 902 and the amino acids important for the ioninc interactions with phospholipids in blue boxes.

903

904

905 **Table 1.** Peptides identified by ESI-LC–MS/MS analysis of rDef1.

Accession number	Name	Molecular Weight (kDa)	Score	Sequence Coverage (%)	Peptide sequence (aa)
MN557396	def1.3 ^a	5.7	1553.646	25	ATC SFESK DLLSFESK DLLSFESKWTPN

906

907 ^a Gene name uploaded to GeneBank

908