



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
ESCUELA DE POSTGRADO

**Aislamiento y caracterización de péptidos
con actividad anti-*Helicobacter pylori* a
partir de la hemolinfa de larvas de mosca**

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRO EN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR

ALVAREZ CALDERÓN, DANIELA

LIMA – PERÚ

2017

ASESOR DE TESIS

PhD. MICHEL SAUVAIN

Director del Laboratorio Mixto Internacional LAVI “Laboratorio Andino
Amazónico de Química de la Vida”. UPCH

Director de Investigación en el IRD

A mi hijita, Luciana, por darle un nuevo motivo a mi vida. Por inspirarme a seguir adelante y enseñarme que todo lo que se hace con esfuerzo se disfruta el doble.

A mi mamá, por darme las herramientas para trazarme un camino, por enseñarme a ser fuerte, constante, y a asumir los retos con un “Yo puedo”.

Gracias por todo tu esfuerzo mamá.

A ti, por cada palabra de aliento, por todo tu apoyo, y porque comprendí que si camino sola quizá iré más rápido, pero si camino acompañada llegaré más lejos.

Agradecimientos

Al Dr. Michel Sauvain, por su permanente apoyo, por compartir su experiencia, por su guía en la ejecución de este trabajo de tesis; y por creer que lo iba lograr.

Al Dr. Kevin Wilkinson del LABINM-UPAO por compartir sus conocimientos y la tecnología disponible, por su paciencia y por sus consejos plasmados en este trabajo.

A mis compañeros del Laboratorio Andino Amazónico de Química de la Vida, Inés, Jesús, Yesenia, Milagros, Romina, Maricruz, Denis, Daniel, Carlos, Kevin, Manuel, por todo su apoyo, sus consejos, por compartir siempre su entusiasmo y ánimos.

A mis colegas-amigos, por estar siempre dispuestos a darme la mano, compartir sus conocimientos y experiencia profesional. A mis amigas, Kathy, Elisa y María, por su apoyo incondicional y aquellos momentos y risas compartidas.

Fuentes de Financiamiento

El presente proyecto de investigación fue financiado con fondos provenientes del Instituto de Investigación para el Desarrollo (Institut de recherche pour le développement-IRD) de Francia y por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYTEC) del Perú, a través de concurso público y como parte del programa de subvención de becas de postgrado.

CONTENIDO

| | |
|--|----|
| I. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| II. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN..... | 4 |
| 2.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA..... | 4 |
| III. MARCO TEÓRICO..... | 6 |
| 3.1 Mosca Soldado Negra, <i>Hermetia illucens</i> | 6 |
| 3.1.1 Ciclo de vida..... | 7 |
| 3.1.1.1 Estadio Huevo..... | 7 |
| 3.1.1.2 Estadio de Larva..... | 7 |
| 3.1.1.3 Estadio de Pupa..... | 8 |
| 3.1.1.4 Estadio Adulto..... | 8 |
| 3.1.2 Condiciones de crianza..... | 10 |
| 3.2 Inmunidad innata en insectos..... | 11 |
| 3.2.1 El cuerpo graso y la respuesta humoral..... | 13 |
| 3.2.2 Péptidos antimicrobianos de Insectos..... | 15 |
| 3.3 Mecanismo de acción de los AMPs..... | 17 |
| 3.4 Estudios previos sobre el aislamiento de sustancias antimicrobianas a partir de las larvas de la Mosca Soldado Negra | 21 |
| 3.5 Generalidades sobre la infección causada por <i>Helicobacter pylori</i> | 22 |

| | |
|---|----|
| 3.5.1 Características estructurales de la pared celular de <i>Helicobacter pylori</i> | 24 |
| 3.6 Tratamiento antibiótico convencional contra <i>Helicobacter pylori</i> | 24 |
| 3.7 Compuestos alternativos con actividad anti- <i>H.pylori</i> | 26 |
| 3.8 Drogas de naturaleza peptídica..... | 27 |
| IV. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO..... | 29 |
| V. HIPÓTESIS..... | 31 |
| VI. OBJETIVOS..... | 31 |
| 6.1 Objetivo General..... | 31 |
| 6.2 Objetivos Específicos..... | 31 |
| VII. METODOLOGÍA..... | 32 |
| 7.1 Diseño del estudio..... | 32 |
| 7.1.1 Diagrama de Flujo para el aislamiento y caracterización de péptidos con actividad anti- <i>Helicobacter pylori</i> a partir de la hemolinfa pre-estimulada de larvas de la mosca <i>Hermetia illucens</i> | 34 |
| 7.2 Procedimientos y técnicas..... | 35 |
| 7.2.1 Crianza y mantenimiento de las larvas de la Mosca Soldado Negra..... | 35 |
| 7.2.2 Estimulación de la síntesis de péptidos antimicrobianos y colección de hemolinfa | 36 |

| | |
|--|----|
| 7.2.2.1 Infección de larvas..... | 36 |
| 7.2.2.2 Extracción y colección de la hemolinfa..... | 37 |
| 7.2.3 Análisis de la complejidad y diversidad estructural del peptidoma de la hemolinfa..... | 39 |
| 7.2.3.1 Análisis de la composición por HPLC-MS..... | 39 |
| 7.2.3.2 Reducción química y alquilación para la identificación de péptidos unidos por puentes disulfuro..... | 39 |
| 7.2.4 Purificación de el/los péptidos activos..... | 40 |
| 7.2.4.1 Pre-purificación de hemolinfa con columnas de Extracción en Fase Sólida (SPE) Sep-Pak C-18..... | 40 |
| 7.2.4.2 Separación de fracciones según peso molecular nominal..... | 41 |
| 7.2.4.3 Fraccionamiento del pool 3-10 kDa por cromatografía líquida de ultra alta eficiencia semipreparativa (HPLC)..... | 44 |
| 7.2.5 Caracterización bioquímica de las fracciones activas..... | 46 |
| 7.2.5.1 Cuantificación de proteínas..... | 46 |
| 7.2.5.1.1 Por Ensayo de Bradford..... | 46 |
| 7.2.5.1.2 Por Kit “Non-Interfering Protein Assay™” | 46 |
| 7.2.5.1.3 Por absorbancia en UV a 215 nm | 47 |

| | |
|---|----|
| 7.2.5.2 Visualización de péptidos pequeños <10kDa por electroforesis en gel de poliacrilamida bajo condiciones denaturantes..... | 48 |
| 7.2.5.2.2 Laemmli SDS-PAGE | 49 |
| 7.2.5.2.3 Electroforesis 2D-SDS-PAGE | 49 |
| 7.2.5.3 Análisis de fracción peptídica 3-10kDa por Ultra Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry quadrupole Time of flight (UPLC-MSqTof)..... | 50 |
| 7.2.6 Ensayos de actividad anti- <i>Helicobacter pylori</i> | 52 |
| 7.2.6.1 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) por ensayo de microdilución en placa..... | 52 |
| 7.2.6.2 Ensayo de Zona de Inhibición..... | 53 |
| 7.2.7 LC-MS/MS e identificación de secuencias de péptidos activos en un espectrómetro de masa Orbitrap de alta resolución..... | 53 |
| 7.3 Consideraciones éticas..... | 54 |
| VIII. RESULTADOS..... | 55 |
| 8.1 Comparación entre la hemolinfa de larvas pre-estimuladas y sin estimular..... | 57 |

| | |
|---|----|
| 8.2 Purificación de péptidos con actividad anti- <i>Helicobacter pylori</i> a partir de la hemolinfa pre-estimulada de la Mosca Soldado Negra (<i>Hermetia illucens</i>)..... | 62 |
| 8.2.1 Purificación cruda empleando columnas Sep-Pak® C18. | |
| Verificación de la presencia de actividad anti- <i>Helicobacter pylori</i> en la hemolinfa pre-estimulada..... | 62 |
| 8.2.1.1 Evaluación de las fracciones crudas por ensayo de microdilución..... | 67 |
| 8.2.1.2 Evaluación de fracciones crudas por ensayo de Zona de Inhibición..... | 70 |
| 8.2.2 Purificación por filtración molecular con filtros Amicon (Merck-Millipore®) 10kDa y 3kDa..... | 72 |
| 8.2.3 Análisis mediante UHPLC-espectrometría de masa de la composición y la diversidad estructural del peptidoma de la hemolinfa estimulada (Fracción <10kDa)..... | 75 |
| 8.2.4 Análisis de la fracción 3-10kDa por UPLC-ESI-MSqTOF..... | 81 |
| 8.2.5 Análisis de la pureza y complejidad de la fracción activa (3-10kDa) por electroforesis de una y doble dimensión..... | 85 |
| 8.2.5.1 Electroforesis 1D: SDS-PAGE y Tricina-SDS-PAGE..... | 85 |
| 8.2.5.2 Electroforesis 2D: 2D-SDS-PAGE..... | 87 |

| | |
|---|-----|
| 8.2.6. Purificación de péptidos activos a partir del pool 3-10 kDa por cromatografía líquida de ultra alta eficiencia (UHPLC-UV)..... | 89 |
| 8.2.6.1 Purificación de la fracción 3-10kDa e identificación de la fracción activa..... | 89 |
| 8.2.6.1.1 Comparación de la fracción activa 3-10kDa procedente de hemolinfa estimulada y sin estimular..... | 92 |
| 8.2.6.2 Purificación de la fracción activa N° 5 por UHPLC..... | 95 |
| 8.2.6.3 Análisis por ESI-MSQTof de la fracción activa N° 5.8.... | 97 |
| 8.2.7. LC-MS/MS e identificación de secuencias de péptidos activos en un espectrómetro de masa Orbitrap de alta resolución..... | 99 |
| IX. DISCUSIÓN..... | 103 |
| X. CONCLUSIONES..... | 119 |
| XI. RECOMENDACIONES..... | 120 |
| XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 121 |

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-------------------|--|----|
| Figura 1. | Ciclo de vida de la Mosca Soldado Negro, <i>Hermetia illucens</i> | 09 |
| Figura 2. | Mecanismos de defensa antimicrobiana en <i>Drosophila</i> . | 12 |
| Figura 3. | Cascadas de señalización para inducción de síntesis de AMPs en el cuerpo graso de <i>Drosophila</i> . | 14 |
| Figura. 4 | Representación esquemática de los mecanismos de formación de poros en membrana. | 20 |
| Figura. 5 | Proceso de inoculación y colecta de hemolinfa | 38 |
| Figura. 6 | Esquema del proceso de ultrafiltración con Amicon Ultra-2 10kDa (Merck- Millipore®) | 43 |
| Figura. 7 | Rendimiento de hemolinfa extraída por larva pre-estimulada. | 56 |
| Figura. 8 | Comparación entre los espectros de absorbancia UV de la hemolinfa pre-estimulada y sin estimular. | 59 |
| Figura. 9 | Comparación de tasas de crecimiento (periodo entre 7-9 días), expresado en peso, entre el grupo de larvas estimuladas y sin estimular. | 61 |
| Figura. 10 | Control de calidad <i>Helicobacter pylori</i> ATCC 43504 (CIP 103995) | 64 |
| Figura. 11 | Evaluación de fracciones crudas por ensayo de zona de inhibición | 71 |
| Figura. 12 | Evaluación de la actividad anti- <i>H. pylori</i> de las fracciones separadas según peso molecular nominal. | 74 |

| | | |
|-------------------|--|-----|
| Figura. 13 | Esquema de Reducción y alquilación de puentes disulfuro con ditioneitol y iodoacetato, respectivamente | 78 |
| Figura. 14 | Peptidoma de la fracción activa de hemolinfa pre-estimulada | 80 |
| Figura. 15 | Análisis de la fracción 3-10kDa por ESI-MSqTOF. | 83 |
| Figura. 16 | Patrón de péptidos en geles de poliacrilamida-SDS presentes en las fracciones purificadas con filtros de 3-10 kDa. | 86 |
| Figura. 17 | Gel 2D-SDS-PAGE.- Patrón de distribución en doble dimensión de péptidos en el pool purificado con filtros 3-10kDa | 88 |
| Figura. 18 | Separación del pool concentrado de péptidos de 3-10 kDa e identificación de la fracción activa anti- <i>H. pylori</i> | 91 |
| Figura. 19 | Comparación cromatograma UHPLC de fracción peptídica 3-10kDa de hemolinfa sin estimular y estimulada | 94 |
| Figura. 20 | Purificación de la fracción F. 5 e identificación de la subfracción activa (F 5.1 - F. 5.9). | 96 |
| Figura. 21 | Análisis por ESI-MSqTOF de la fracción activa 5.8. | 98 |
| Figura. 22 | Espectro nLC-MS/MS de la fracción activa F5.8 empleando un LTQ-Velos Orbitrap Pro de alta resolución para el secuenciamiento parcial péptidos. | 101 |

LISTA DE TABLAS

| | | |
|-------------------|--|-----|
| Tabla N° 1 | Perfil de susceptibilidad <i>Helicobacter pylori</i> ATCC 43504* | 64 |
| Tabla N° 2 | Ensayo Zona de Inhibición con Amoxicilina <i>H. pylori</i> 43504 | 66 |
| Tabla N° 3 | Valores MIC para fracciones crudas provenientes de hemolinfa pre-estimulada y sin estimular | 69 |
| Tabla N° 4 | Listado de moléculas que componen el peptidoma activo de la hemolinfa estimulada de <i>Hermetia illucens</i> identificadas por LC-ESI-IT | 77 |
| Tabla N° 5 | Péptidos Mayoritarios en el pool 3-10kDa identificados por UPLC-ESImsQtof | 84 |
| Tabla N° 6 | Ensayo de Zona de Inhibición: Medida de halos de inhibición de fracciones activas seleccionadas | 108 |
| Tabla N° 7 | Péptidos antimicrobianos con actividad anti- <i>H. pylori</i> reportados previamente | 110 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-------------|---|
| AMP | Péptido antimicrobiano |
| MIC | Minimal Inhibitory Concentration |
| BSF | Black Soldier Fly (Mosca Soldado Negra) |
| TFA | Trifluoroacetic acid (Ácido Trifluoroacético) |
| ACN | Acetonitrilo |
| FA | Formic Acid (Ácido fórmico) |
| NMWL | Nominal Molecular Weight Limit |
| ESI | Electrospray Ionization |
| MS | Mass Spectrometry |
| QTof | Quadrupole Time of Flight |
| TIC | Total Ion Current |
| HPLC | High Performance Liquid Chromatography |

RESUMEN

El patógeno gástrico *Helicobacter pylori* infecta a más de la mitad de la población mundial. Ésta bacteria es causante de gastritis, úlceras, y predispone a la aparición de adenocarcinoma gástrico. Su erradicación del hospedero permite la eliminación de éstos síntomas y los desórdenes provocados. Los índices de resistencia a los antibióticos de primera línea están en aumento, especialmente a claritromicina (17.5%) y metronidazol (34.9%). Para hacer frente a esto se propone hallar fuentes de tratamiento alternativas, como los péptidos antimicrobianos (AMPs). Estas moléculas del sistema inmune innato están presentes en todos los organismos vivos y pueden lidiar con bacterias multidrogo-resistentes.

Se empleó la hemolinfa pre-estimulada de las larvas de la Mosca Soldado Negra, un díptero de interés para el sector productivo por sus características saprófagas y su resistencia a condiciones ambientales hostiles. Mediante técnicas de purificación con base en el peso molecular y una separación secuencial por HPLC RP-18, acompañado de ensayos de zona-de-inhibición para la selección de fracciones activas contra *H. pylori*, se logró aislar una fracción con actividad biológica frente a éste patógeno conteniendo 4 AMPs de 4.2kDa, policatiónicos, sin cisteínas. Luego del análisis del peptidoma por MS se descartó la presencia de defensinas activas en esta fracción. Se comprobó que es indispensable estimular el sistema inmune para obtener la actividad antibiótica, aunque esto afecte el desempeño biológico.

Palabras Clave: Resistencia a antibióticos, Péptidos antimicrobianos, Mosca Soldado Negra, Helicobacter pylori, fraccionamiento guiado por bioensayo, espectrometría de masa.

ABSTRACT

More than half of world's population may be infected by the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. This bacteria can cause gastritis, ulcers, and it seems to be a predisposing factor for the development of gastric adenocarcinome. Eradication from its host could cure both the infection and the accompanying disorder. Resistance levels to first line treatment antibiotics had been rising up, especially for clarithromycin (17.5%) and metronidazole (34.9%). We proposed evaluating alternative sources of compounds for treatment, like antimicrobial peptides (AMPs). These immune system molecules are present in every living organism and have reported activity against multidrug resistant bacteria.

For this purpose, pre-stimulated hemolymph from Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) larvae was isolated. *H. illucens* is a dipteran of interest to agriculture because of its saprophytic characteristics and its ability to survive to hostile environments. Employing purification techniques based on molecular weight and a sequential fractionation by HPLC RP-18, accompanied by inhibition zone assays for the selection of active fractions, an anti-*H. pylori* fraction was obtain, containing 4 polycationic peptides around 4.2 kDa, without cysteines in its sequence. After peptidome analysis by MS, the presence of previously reported active defensins in this fraction was discarded. Stimulation of antimicrobial peptides synthesis is necessary, in order to obtain antibiotic activity of hemolymph, although this affects the biological performance of larvae.

Keywords: Antimicrobial Peptides (AMPs), Black Soldier Fly, Helicobacter pylori, bioassay-guided fractionation, antibiotics resistance, mass spectrometry.

I. INTRODUCCIÓN

Helicobacter pylori es uno de los patógenos más exitosos de la historia; capaz de colonizar la mucosa gástrica de más de la mitad de la población a nivel mundial (1) coevolución con el ser humano. Su infección está relacionada con enfermedades gastrointestinales, gastritis, ulceración gastroduodenal, pero lo más preocupante es que ésta bacteria es un factor de riesgo muy fuerte para la aparición de tumores, linfoma tipo MALT y adenocarcinoma de estómago.

Se ha visto que la erradicación del microorganismo cura la infección y con ello todas las enfermedades derivadas de la misma. Por esto se ha puesto bastante énfasis en la implementación de una terapia efectiva. Actualmente, el régimen de primera línea mejor validado consiste de un inhibidor de la bomba de protones + claritromicina + amoxicilina por 7 a 14 días (2). Aunque también se suele emplear metronidazol y levofloxacino.

Sin embargo, el reto de la erradicación es difícil, y el uso de antibióticos se ve limitado por la resistencia emergente de *H. pylori*, especialmente a claritromicina y metronidazol. En el grupo de pacientes tratados estudiados por Boyanova en el 2009, se encontró índices mayores al 28% de cepas resistentes tanto para metronidazol como para claritromicina, mientras que para pacientes multidrogo resistentes, amoxicilina + metronidazol + claritromicina fue de 2 a 4% (3).

En general, el incremento de infecciones resistentes a drogas es un problema de salud crítico a nivel global según la Organización Mundial de la Salud. Es por ello, que tanto para *H. pylori* como para otras bacterias que han desarrollado resistencia urge encontrar nuevos agentes antimicrobianos (4).

Para resolver este problema y buscar alternativas a las drogas convencionales, hoy en día se ha vuelto la mirada a las fuentes naturales (ejm. Insectos) y entender cómo los organismos son capaces de combatir sus propias infecciones. Los insectos son particularmente exitosos en la evolución (5). Este éxito, entre otros aspectos, puede atribuirse a sus potentes reacciones de defensa antibacterianas. En éste afán se ha puesto bastante interés en estudiar los llamados péptidos antimicrobianos ó AMPs por sus siglas en inglés. Éstas son moléculas evolutivamente antiguas propias del sistema innune innato de todos los seres vivos (6) y poseen un amplio espectro de actividad contra virus, bacterias, hongos y parásitos. Hasta el momento se han descubierto y sintetizado más de 5000 AMPs (4).

Existe varios péptidos antimicrobianos en fase clínica: el Omeganan ligado a la prevención de infecciones relacionadas al uso de catéter, el Pexiganan para la prevención de pie diabético, la plectasina, una defensina de origen fúngico con acción bactericida sobre bacterias multidrogo resistentes, el Opebacan una proteína bactericida usada para endotoxemia (7, 8).

Se eligió utilizar como fuente natural para la extracción de péptidos antimicrobianos las larvas de la Mosca Soldado Negra, *Hermetia illucens*, un díptero cosmopolita originario de América. Estos dípteros suelen habitar áreas con materia en descomposición, tales como el estiércol, lo cual sugiere una alta capacidad para generar AMPs y otras sustancias con actividad antimicrobiana (9).

La estructura y las secuencias de los AMPs son diversas, sin embargo existe varios rasgos compartidos por la mayoría de ellos y de los que se puede tomar provecho para realizar una purificación óptima. Ejm. Carga neta positiva, pequeño tamaño, estructura secundaria anfipática, suelen tener como blanco las membranas celulares. Previo a la purificación de AMPs, había que comprobar la presencia de actividad anti-*Helicobacter pylori* en la hemolinfa de estas larvas. Como segundo desafío estaba la implementación de la metodología de purificación y como tercer desafío la identificación de los péptidos aislados a través del manejo de la data genómica disponible.

II. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN

2.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Es ampliamente aceptado que la infección por *H. pylori* causa úlceras gástricas y duodenales y predispone hacia la aparición de adenocarcinoma gástrico y linfoma MALT. La OMS ha clasificado a éste patógeno como un carcinógeno de clase I, siendo este tipo de cáncer el segundo más común en el mundo (10).

Las cifras de infección por *Helicobacter pylori* son alarmantes. Ramírez Ramos et al, (2002) (11) afirmaron que el 60% de la población mundial está infectada por este patógeno. Algunos de ellos no evidencian síntomas agudos de la enfermedad pero son potenciales portadores. En un estudio realizado por el mismo autor, se afirma que en el Perú la infección se adquiere a temprana edad y su expansión se agrava por la falta de condiciones sanitarias adecuadas, la falta de cloración del agua y el hacinamiento. En el Perú, la transmisión a través del agua es la vía más importante, incluso hay estudios que señalan la presencia de DNA de *H. pylori* en el agua procedente de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales *La Atarjea* (12, 13) para consumo humano.

Otro aspecto a considerar es la complejidad del esquema de tratamiento para el cual se suele administrar 3 drogas: dos antibióticos y un inhibidor de la bomba de protones. El costo es alto, la duración extensa del tratamiento muchas veces provoca síntomas colaterales. Adicionalmente, se han reportado altos porcentajes de pacientes reinfectados, un 73% vuelven a infectarse en un periodo corto tras la erradicación de la enfermedad (11).

Aún más preocupante, son las tasas de resistencia que se vienen encontrando para los antibióticos convencionales claritromicina (17.5%), levofloxacino (14.1%) y metronidazol (34.9%). Smith *et al.* (14) afirma que la tasa de resistencia a claritromicina se ha duplicado desde el último estudio. Malfertheiner *et al.* (2) afirman que el tratamiento de erradicación siguiendo la primera línea de tratamiento (Inhibidor de la bomba de protones, amoxicilina, claritromicina) produce tasas de curación menores al 80%, también por problemas de resistencia a estos fármacos.

Ante éste escenario urgía hallar moléculas con actividad anti-*Helicobacter pylori* que emplearan rutas alternativas de ataque. Los péptidos antimicrobianos se perfilaron como una atractiva opción, a propósito de sus propiedades, y se planteó hacer el aislamiento de los mismos a partir de una mosca cosmopolita saprófaga, la Mosca Soldado Negra o *Hermetia illucens*.

III. MARCO TEÓRICO

3.1 Mosca Soldado Negra, *Hermetia illucens* (15).

Clasificación taxonómica

Orden: Diptera

Infraorden: Stratiomyomorpha

Familia: Stratiomyidae

Subfamilia: Hermetiinae

Género: *Hermetia*

Especie: *illucens* (Black Soldier Fly)

La Mosca Soldado Negra (BSF, por sus siglas en inglés), *Hermetia illucens*, es una especie de díptero braquícero muy similar en apariencia a una avispa (16). Es originaria de América, pero actualmente está ampliamente distribuida en distintas áreas tropicales del mundo (17). Son inofensivas y no transmiten patógenos ya que su estadio adulto es corto y en su estadio adulto solo se alimentan de agua.

Las larvas son terrestres y saprófagas, consumen materia orgánica en descomposición, por lo que suelen ser utilizadas en la industria avícola para convertir los desechos de estiércol en masa larvaria y reducir los niveles de nitrógeno y fósforo contaminantes del medio ambiente (18). En cuanto a contenido larvario, el 42% representa proteínas y otro 35% son grasas (19), por lo que son atractivas como alimento para peces, aves, reptiles y/o anfibios.

3.1.1 Ciclo de vida

La mosca Soldado Negra, al igual que otros dípteros, posee una transformación completa u holometábola, repartida en 4 estadios (Fig, 1):

3.1.1.1 Estadio Huevo

Cada hembra adulto es capaz de poner hasta 500 huevos en grupos o “clusters” de 75 a 150 huevos cada uno, en un periodo de 3 a 4 días tras el apareamiento (20). El número de huevos ovipositados dependerá del tamaño de la mosca y la calidad de nutrición durante el estadio larvario.

3.1.1.2 Estadio de Larva

El estadio de larva se considera desde el primer día de la eclosión (microlarvas) hasta el día en que la larva se convierte en prepupa. Son de color opaco, blanco con una pequeña cabeza que se proyecta y contiene las piezas bucales para masticar, y es que en su estadio larvario comen insaciablemente y a gran velocidad. Requieren aproximadamente 14 días para completar su desarrollo, atravesando por 6 mudas (ó instar). Según Gobbi 2012 (21), los criterios para definir el número de muda son: la longitud de la cápsula cefálica, el número de aberturas espiraculares y el tamaño del espiráculo posterior. Pueden llegar a medir 27 mm de largo y 6 mm de ancho. Al alcanzar el estadio de prepupa dejan la comida y buscan un lugar oscuro, seco y fresco para el periodo de “post-feeding”, entrar en estadio de pupa y completar la metamorfosis (22).

3.1.1.3 Estadio de Pupa

El estadio de pupa dura 8 días. En los dípteros de la familia Stratiomyidae la pupa es formada dentro de la última piel de la larva, la cual es usada como capullo compuesto por cristales de carbonato de calcio incluidos en la quitina, ofreciéndole rigidez (23).

El proceso de pupación *per se* ocurre en las primeras seis horas, mientras que la extroversión de la cabeza y los apéndices torácicos ocurre entre la 9na y la 21ra horas. Finalizada la metamorfosis la mosca escapa del capullo a través de una hinchazón y encogimiento del saco (*ptilinum*) que se localiza al frente de su cabeza, actuando como un martillo neumático.

3.1.1.4 Estadio Adulto

Las Moscas Soldado Negra en su estadio adulto son de color negro y tienen una apariencia similar a la de una avispa. A su vez tienen dos “ventanas” traslúcidas localizadas en el primer segmento del abdomen. Miden de 15 a 20 mm de largo, siendo la hembra más larga que el macho (24). Sus antenas son elongadas, con 3 segmentos, y sus patas son de color blanco al extremo distal. Durante éste estadio no necesitan ser alimentados y sobreviven de las grasas almacenadas durante el estadio larvario.

Dos días después de que el adulto emerge de la funda de la pupa puede ocurrir el apareamiento. Un macho intercepta una hembra en el aire y ambos descienden y copulan. La oviposición recién comenzará 2 a 4 días después, y para ello las hembras buscan materiales en descomposición como fruta, carroña y estiércol (24) (23).



Fig. 1 Ciclo de vida de la Mosca Soldado Negra, *Hermetia illucens*. El estadio larvario está constituido por 6 mudas

3.1.2 Condiciones de crianza

Para una óptima crianza de la Mosca Soldado Negra, la temperatura y la humedad son dos variables fundamentales. Tomberlin *et al.* (17) ensayaron diferentes temperaturas de crianza, 27, 30 y 36°C, encontrando que las larvas macho y hembra criadas a 30°C requerían menor tiempo para alcanzar el estadio de prepupa que aquellas criadas a 27°C. Por el contrario, aquellas prepupas criadas a 36°C requirieron 30% más tiempo para su desarrollo. No se encontró efecto de la temperatura sobre la definición del sexo y tampoco hubo relación entre el peso y la esperanza de vida del adulto.

En referencia a la humedad, Holmes *et al.* (22) comprobaron que el éxito de la eclosión de los huevos y la emergencia de los adultos es mayor al incrementar la humedad relativa del ambiente, teniendo como óptimo un 70% de humedad.

Por otro lado, los insectos adultos requieren tener luz visible para completar con éxito la etapa de apareamiento y oviposición. La luz del sol directa promueve el apareamiento en *H. illucens* (25), especialmente a longitudes de onda de 450 a 700 nm (26). Según Briscoe & Chittka (27), los insectos no son capaces de percibir longitudes de onda mayores a los 700 nm.

Otro aspecto importante de la crianza es el alimento que se les proporciona. Tomberlin *et al.* (17) sugirió que las larvas alimentadas con dietas más ricas en calorías derivan en adultos más longevos.

Es importante que las larvas que entran en estadio de “post-feeding” ó prepupas, sean trasladadas a un lugar fresco, oscuro y seco. De preferencia hacia sustratos de mediana densidad y humedad, que permitan a la pupa penetrar y enterrarse (23).

3.2 Inmunidad innata en insectos

Los insectos dependen únicamente de su sistema inmune innato para combatir los agentes infecciosos (28). Al infringir una herida en el tegumento del insecto se produce una serie de eventos, tales como la coagulación localizada de la hemolinfa y la melanización, la fagocitosis de las bacterias y el encapsulamiento de parásitos. A su vez, se inducen genes en el cuerpo graso para la síntesis de una batería de potenciales péptidos antimicrobianos que son secretados a la hemolinfa y actúan de manera sinérgica para opsonizar y formar poros en la membrana de las bacterias invasoras (29) (30) (31). En *Drosophila*, las células de la epidermis producen péptidos antimicrobianos. Sin embargo, los microorganismos que ingresan a la cavidad corporal son contrarrestados tanto por la defensa humoral como por la celular (32) (Fig. 2).

Como parte de la defensa celular, existen tres clases de hemocitos: los plasmatocitos que cumplen funciones fagocíticas e interceden en la secreción de péptidos antimicrobianos, los lamelocitos que se encargan de la encapsulación de microorganismos, y las células cristal que contienen componentes de la cascada oxidasa profenol responsable de la melanización de patógenos encapsulados. La melanización genera quinonas e intermediarios tóxicos de oxígeno para los microorganismos (33); a su vez la melanina producida actúa como un recogedor de radicales libres, previniendo el daño al tejido aledaño (34). Junto con la cascada de melanización se da una cascada de coagulación en la que se forma una matriz fibrosa que lleva incrustados granulocitos o plasmatocitos. También actúa una cascada similar al complemento que puede contribuir a la opsonización de microorganismos (35).

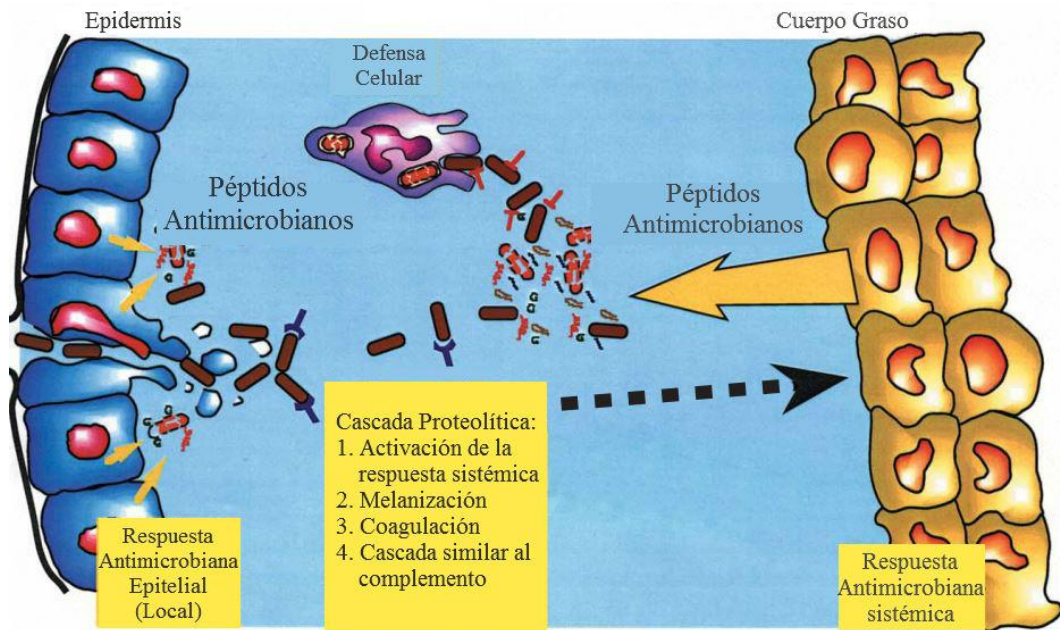


Fig. 2 Mecanismos de defensa antimicrobiana en *Drosophila*. Las bacterias están ilustradas como bacilos marrones, las proteínas de reconocimiento de patrones son de color morado y las proteínas putativas opsonizantes están ilustradas en forma de T de color rojo (32)

3.2.1 El cuerpo graso y la respuesta humoral

El cuerpo graso tiene un rol similar al hígado en mamíferos, éste se origina del mesodermo y se vuelve inmunocompetente cuando se establece el estado larvario. Éste órgano codifica y permite la secreción a la hemolinfa de péptidos antimicrobianos catiónicos (AMPs) (32) con especificidades distintas pero sobrelapantes, asegurando que alcancen rápidamente las concentraciones efectivas (36).

Se sabe que a nivel celular la inducción de genes para la síntesis de AMPs ocurre por la activación del receptor-Toll o por la vía de inmunodeficiencia (IMD) (Fig. 3).

- Activación del receptor Toll: Es activado principalmente por bacterias Gram-positivas y hongos. Los determinantes microbianos no interactúan directamente con el receptor, sino vía una cascada de reacciones proteolíticas. El producto final de estas reacciones, es la proteína *Spaetzle*, que sirve como un ligando del receptor Toll que media a través del factor de transcripción NF-kB la activación de genes de inmunidad.
- Activación de la vía IMD: Responde principalmente a la infección con bacterias Gram negativas (32). El blanco final de esta vía es Relish, un transactivador rel/NF-kB. Ésta proteína necesita ser procesada para ser translocada al núcleo. Para lo cual su clivaje es dependiente tanto de la caspasa Dredd como del complejo quinasa Ik-B. Se ha visto que la proteína de transmembrana putativa, PGRP-LC actúa upstream de Imd y probablemente actúa como un sensor de la infección microbiana (37)

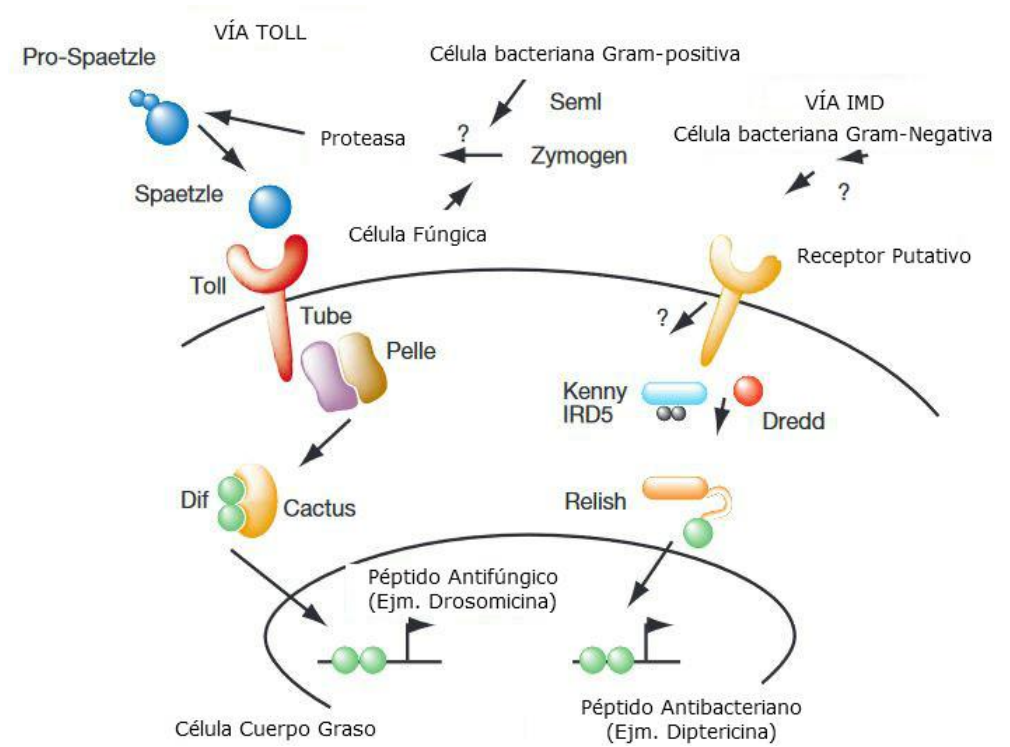


Fig. 3 Cascadas de señalización para inducción de síntesis de AMPs en el cuerpo graso de *Drosophila* (38)

Se han encontrado motivos homólogos a los *Toll* humanos en *Drosophila*. Y justamente la activación de estas *hToll* conlleva a la expresión del receptor de superficie B7.1 que se sabe que es esencial para la coactivación de células T resting. Esto posiciona a la respuesta inmune innata en el centro de la estimulación inmune de vertebrados (39).

Los insectos poseen la particularidad como clase taxonómica de producir AMPs tras la exposición bacteriana (40), a diferencia de los crustáceos que los expresan de manera constitutiva. La inyección de bacterias u hongos, o sus determinantes en la pared bacteriana, pueden inducir la expresión de los genes de AMPs, arribando al pico de mayor intensidad de transcripción entre las 12 a 48 horas de recibido el estímulo. Cabe mencionar que la síntesis de péptidos antimicrobianos también se ha visto inducida al realizar una lesión en el tegumento de las larvas bajo condiciones de esterilidad (41).

3.2.2 Péptidos antimicrobianos de Insectos

La actividad antibacteriana en insectos fue observada por primera vez en pupas pre-estimuladas de la polilla de seda gigante *Samia cynthia* y *Hyalophora cecropia* (42, 43). Hasta el momento se han encontrado y aislado más de 1200 AMPs, el 70% de ellos provenientes de animales, en su mayoría anfibios e insectos. Un solo insecto es capaz de producir aproximadamente 10-15 péptidos antibióticos, los cuales suelen ser muy potentes, teniendo un IC_{50} que oscila en el rango submicromolar y bajo micromolar.

Por lo general son pequeños (3 a 14 kDa) y contienen de 12 a 100 aminoácidos catiónicos anfipáticos (44). Es decir, consisten de residuos cargados positivamente en ambientes ácidos, predominantemente arginina y lisina o histidina, y de una proporción sustancial de aminoácidos hidrofóbicos, casi el 50% (45, 46). Los AMPs suelen sintetizarse como proteínas precursoras inactivas más grandes o pro-proteínas (47, 48).

Según su estructura, se puede definir cuatro familias de péptidos antimicrobianos: los péptidos α -hélice lineales, los péptidos cíclicos con estructuras hoja- β acopladas gracias a la presencia de puentes disulfuro, los péptidos con hairpin β formado por la presencia de un solo puente disulfuro y los péptidos lineales con sesgo por algún aminoácido en particular (45), como la indolicidina rica en triptófano (49) y la histatina rica en histidina (50).

Entre los AMPs más comunes en insectos están las cecropinas, estos son péptidos de 3-4kDa, con 35-40 residuos de aminoácidos. Primero fueron aisladas de la pupa de *Hyalophora cecropia*, aunque también se han encontrado luego en algunos lepidópteros, dípteros y coleópteros. Contienen regiones N-terminales hidrofílicas y C-terminales amidadas hidrofóbicas y poseen segmentos alfa-hélices unidos por un pequeño puente. En *Drosophila melanogaster*, las cecropinas son identificadas en la sangre a una concentración de 25 a 50 μ M (51). Por otro lado, las cecropinas aisladas de insectos y cerdos, exhiben una estructura random en solución pero adquieren una estructura de hélice alfa anfipática tras la interacción con una superficie de membrana (52) (53).

Otra familia de péptidos comunes son las dipterocinas. En *Phormia terranova* se ha encontrado tres tipos de dipterocinas, siendo la dipterocina A la que se encuentra en mayor cantidad. El péptido maduro posee 82 residuos, sin embargo su precursor posee una secuencia señal de 18 residuos. En la hemolinfa de este mismo organismo se encontraron dos tipos de defensinas, otra clase de AMP, que son activas contra bacterias Gram positivas, pero a diferencia de las dipterocinas éstas no son modificadas post-transcripcionalmente.

Un AMP de insecto por sí mismo puede que no tenga una fuerte actividad contra los microorganismos; sin embargo, la actividad en conjunto de todos los AMPs en la hemolinfa puede ser bastante fuerte y significativa (47). Rahnamaeian et al (54) pusieron a prueba la hipótesis de la acción sinérgica de los AMPs y evaluó la acción de la abaecina aislada de la hemolinfa del abejorro *B. pascuorum* en conjunto con la hymenoptaecina aislada de *B. terrestris*, otro AMP que se cree forma poros en la envoltura bacteriana; observando que a 20 μM y 1.3 μM se suprimía por completo el crecimiento de *Escherichia coli* D31, efecto que no se apreció empleando hymenoptaecina sola.

3.3 Mecanismo de acción de los AMPs

Los AMPs nativos tienen distintos efectos dependiendo de la naturaleza del organismo con el que interactúan. De manera general, en hongos pueden promover la permeabilización de la membrana, inducir la formación de ROS, interferir con la síntesis de quitina de la membrana celular; en plantas pueden promover la expresión de genes, inducir la muerte celular en otras plantas; mientras que en mamíferos

pueden alterar el ciclo celular, bloquear los canales de calcio, inducir la producción de quimioquinas, o modular la respuesta inmune adaptativa (45).

En bacterias son varias las potenciales dianas de ataque, los AMPs pueden unirse a los fosfolípidos de la membrana celular poniendo en peligro la homeostasis vital de las bacterias, pueden interactuar con moléculas intracelulares como DnaK, GroEL resultando en la inhibición de la actividad ATPasa o el folding asistido por chaperonas, y/o con el ribosoma inhibiendo la síntesis proteica (Ejm. Pyrrolicorina, batenecina-7, apidaecina, drosocina) (55).

La membrana celular es el blanco clásico y más frecuente de los AMPs. La membrana bacteriana está organizada de tal forma que la cara externa de la bicapa está poblada por gran cantidad de lípidos con cabezas de fosfolípidos cargados negativamente, tales como la cardiolipina (CLP), el fosfatidilglicerol (PG). Además, las bacterias poseen en su pared celular lipopolisacáridos en especies Gram negativas y los ácidos teicoicos en especies Gram positivas.

Por el contrario, la capa externa de la membrana de plantas y animales está compuesta principalmente de lípidos sin carga neta, como la fosfatidilcolina (PC), fosfatidilserina (PS) y fosfatidiletanolamina (PE); la mayoría de lípidos con cabezas cargadas negativamente están segregados hacia la capa interna, mirando hacia el citoplasma. Ésta diferencia en las cargas netas de cada tipo de membrana las hace más o menos susceptibles a la unión de AMPs catiónicos (56).

Dicho carácter catiónico, asociado con su tendencia a adoptar una estructura anfipática, facilita su interacción e inserción en la pared celular aniónica y membranas fosfolipídicas de los microorganismos bacterianos, destruyendo la

integridad de la membrana, irrumpiendo en su función, conllevando a la lisis y gatillando el eflujo de los fluidos celulares (57). Las diferencias en la composición lipídica de la membrana de las bacterias o la incapacidad de penetrar la membrana externa de ciertos microorganismos Gram negativos podrían explicar el espectro antimicrobiano que se observa al evaluar un mismo AMP contra diferentes bacterias. Para Gutschmann et al, 2005 (58) la composición del LPS de la bacteria y la magnitud de la carga neta negativa del AMP es responsable de la sensibilidad o resistencia de ciertas especies o cepas de bacterias Gram Negativas.

Luego que los AMPs interactúan estrechamente con las moléculas de la membrana externa celular, se crean poros que causan la filtración del contenido celular por formación de canales no selectivos de iones, toxinas y metabolitos. Se han propuesto 3 modelos para la formación de poros (Fig. 4):

- **Modelo Tablas de Barril (“*Barrel-stave*”)**: Los péptidos se insertan en el área hidrofóbica de manera perpendicular a la membrana y crean un poro formando un manojo de hélices transmembrana (59).
- **Modelo Poro Toroidal**: La monocapa lipídica se dobla hacia el interior formando un hueco toroidal, los péptidos entran en contacto con los grupos de cabeza de los lípidos (60).
- **Modelo similar a tapete (“*Carpet-like*”)**: Se refiere a la destrucción del arreglo de la membrana mediante la acción colaborativa de los péptidos. Los péptidos se asocian por sí mismos en las regiones ricas en fosfolípidos ácidos de la bicapa lipídica y una vez que sus concentraciones alcanzan cierto umbral forman una especie de alfombra capaz de debilitar la membrana y causar su colapso en una configuración de micela (61).

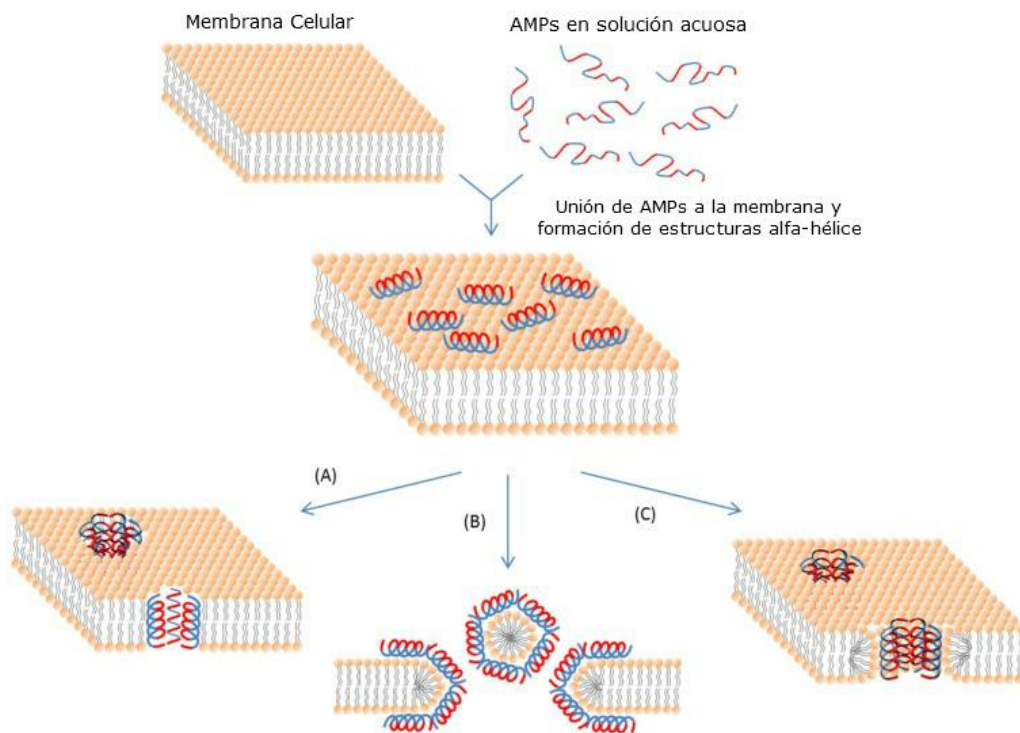


Fig. 4 Representación esquemática de los mecanismos de formación de poros en membrana (a) Modelo Tablas de Barril, (b) Modelo similar a tapete, (c) Modelo Poro Toroidal (4)

Además de la eliminación de microbios, los AMPs han demostrado poseer muchas funciones inmunomodulatorias: la modificación de la expresión de genes del hospedero, la inducción de la muerte celular en plantas, tolerancia al zinc, función de quimioquinas, inhibición de la producción de citoquinas proinflamatorias, promoción de la cicatrización de heridas (45). Ejm. PR-39 aislado de intestino de cerdo puede inducir la síntesis de sindecanos involucrados en la promoción de la cicatrización celular (62). Además son capaces de neutralizar los LPS que son liberados por las bacterias al morir. Estos LPS son capaces de activar a células inmunocompetentes, si esto llegara a pasar de manera no controlada puede conllevar a un shock séptico.

3.4 Estudios previos sobre el aislamiento de sustancias antimicrobianas a partir de las larvas de la Mosca Soldado Negra

En el 2014, Park *et al.* (9) evaluó la actividad de diferentes extractos preparados a partir de larvas de *H. illucens* previamente estimuladas con *Staphylococcus aureus*. El extracto soluble en agua presentó un valor de concentración mínima inhibitoria MIC de 25 mg/ml tanto para *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (MRSA) como para *Micrococcus luteus*, mientras que la actividad fue mejor en *Bacillus subtilis* (MIC 12.5 mg/ml). Los valores MIC del extracto etil-acetato fueron similares al extracto soluble en agua. El mismo autor en el 2011 ya había reportado que la hemolinfa de *Hermetia illucens* pre-estimulada con *Staphylococcus aureus* tenía una potente actividad de amplio espectro, tanto para bacterias Gram positivas (incluyendo la cepa *S. aureus* meticilina resistente) y Gram negativas.

Otro estudio evaluó la actividad del ácido hexanodioico presente en las larvas de *Hermetia illucens*. Los MIC reportados fueron los siguientes: *S. aureus* (140.377 µg/ml), MRSA (137.4 µg/ml), *Klebsiella pneumoniae* (139.2 µg/ml) y *Shigella dysenteriae* (139.7 µg/ml) (63).

Un estudio de Park *et al.* en el 2015 ha logrado purificar el primer péptido antimicrobiano reportado en esta especie, el péptido similar a la defensina 4 (DLP4) empleando cromatografía en fase sólida y cromatografía de fase reversa (HPLC-MALDI-TOF). Ésta defensina posee efecto antibacteriano contra bacterias Gram-positivas, incluyendo *Staphylococcus aureus* meticilina-resistente. Los valores MIC para DLP4: *S. aureus* meticilina resistente son de 0.59-1.17 µM, *S. epidermidis* 0.59-1-17 µM, y *B. subtilis* 0.02-0.04 µM.

3.5 Generalidades sobre la infección causada por *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori es un bacilo Gram negativo, espiralado, microaerobio. Es el agente causal de la gastritis crónica activa y uno de los factores predisponentes a la adquisición de adenocarcinoma gástrico y linfoma tipo MALT (tejido linfoide asociado a mucosa) (10).

La infección se adquiere a temprana edad, ya sea por vía oral-fecal y/o por el agua (11), situación favorecida por las pobres condiciones sanitarias, la falta de cloración del agua y el hacinamiento.

El proceso de colonización de la mucosa gástrica por parte de *Helicobacter pylori* (entiéndase como colonización a los mecanismos usados por la bacteria para persistir en el estómago) consiste de 4 pasos:

1. Transmisión a un nuevo hospedero
2. Adherencia bacteriana a un nicho específico dentro del hospedero
3. Evasión, subversión, y explotación de mecanismos de defensa del hospedero
4. Adquisición de nutrientes para lograr la replicación satisfactoria.

H. pylori se adhiere a la superficie de la célula hospedera a través de adhesinas que interactúan con los receptores de la célula hospedera. Luego de la unión, despoja a las células de sus microvellosidades, rompe las uniones estrechas entre células y forma pedestales en las células gástricas del hospedero. En esta ruptura intervienen VacA y la ureasa bacteriana. No se conoce mucho sobre los genes involucrados luego de la adherencia, pero se sabe que la isla de patogenicidad *cag* tiene un rol clave, involucrada en una serie de activaciones de cascadas de señalización: vía NF- κ B, inducción de la IL-8, infiltración de neutrófilos, inducción de ciclooxigenasas y apoptosis (64). La ocurrencia incrementada de la muerte celular o apoptosis probablemente juegue un rol importante en la aparición de gastritis atrófica, una condición pre-neoplásica establecida.

Como se ha visto, la bacteria ha desarrollado un set único de factores de virulencia para sobrevivir al nicho ecológico extremo del estómago humano (65). Por ejemplo, la proteína activadora de neutrófilos (HP-NAP) recluta y favorece la adhesión de neutrófilos a la células endoteliales del estómago, estimulando la producción de Intermediarios Reactivos de Oxígeno (ROI) exacerbando así el

proceso inflamatorio, otro factor clave es la enzima ureasa que permite amortiguar el pH estomacal, ya que hidroliza la urea y genera amonio, amortiguando así el pH del citosol y el periplasma bacteriano, además de favorecer la formación de una capa neutra alrededor de la superficie bacteriana.

3.5.1 Características estructurales de la pared celular de *Helicobacter pylori*

La bacteria *H. pylori in vivo* o bajo condiciones de cultivo óptimas posee forma de “S” con 1 a 3 vueltas, 0.5 x 5 micras de largo, con un penacho de 5 a 7 flagelos polares (66). El flagelo es el responsable de actuar como un hélice para viajar por la capa mucosa viscosa asemejando un tornillo en un corcho (67).

Respecto a su superficie es relativamente hidrofílica y está cargada negativamente (68). La composición de su membrana externa es única en su contenido proteico y su estructura de lipopolisacáridos o LPS. Sin embargo, la organización física de su pared celular es similar a la de la mayoría de bacterias gram-negativas.

3.6 Tratamiento antibiótico convencional contra *Helicobacter pylori*

Respecto al tratamiento de la infección por *H. pylori*, los esquemas triples producen erradicación 80%, la tasa de recaída post-tratamiento es alta, con infección frecuente por una cepa diferente. En pacientes peruanos los esquemas con erradicación mayor a 80% son los siguientes, por lo general comprenden un inhibidor de la bomba de protones acompañado de antibióticos: Tetraciclinas +

furozolidonas + Bismuto (94.7%), Omeprazol + amoxicilina + claritromicina (93.0%), amoxicilina + furozolidona + bismuto (84%) (11).

En el 2015, una recopilación de varios reportes sobre ensayos de resistencia a antibióticos contra *H. pylori* a nivel mundial arrojaron tasas de 47.22% (30.5-75.02%) para metronidazol, 19.74% (5.46-30.8%) para claritromicina, 18.94% (14.19-25.28%) para levofloxacino, 14.67% (2-40.87%) para amoxicilina, 11.70% (0-50%) para tetraciclina, 11.5% (0-23%) para furazolidona, y 6.75% (1-12.45%) para rifabutina. En particular, las tasas de resistencia para claritromicina y levofloxacino se han incrementado durante los últimos 6 años (69). Las cepas multidrogo resistentes (MDR) de *Helicobacter pylori* también vienen siendo una preocupación a nivel global (70).

Como parte de los mecanismos de resistencia hacia las drogas más importante de lucha contra *H. pylori* se tiene al metronidazol, este pertenece a la familia de los 5-nitroimidazoles. La reducción del grupo nitro conlleva a la generación de productos reactivos, principalmente radicales libres, los cuales dañan las estructuras subcelulares y causan daño y mutaciones letales en el DNA.

Por otro lado, la claritromicina es el antibiótico más poderoso disponible actualmente contra *H. pylori* (71), pertenece a la familia de los macrólidos. El target es un dominio del rRNA 23S, conlleva a un error en la elongación de la proteína. Se ha visto que la resistencia se origina tras mutaciones puntuales A →G, en dos posiciones distintas, A2142G y A2143G.

La amoxicilina es un antibiótico β-lactámico incluido en todos los regímenes terapéuticos actuales para la erradicación de *H. pylori* (2). Éste antibiótico actúa

interfiriendo en la síntesis de peptidoglicanos, especialmente bloqueando las proteínas de unión a penicilina (PBP) (2). Las múltiples mutaciones puntuales en el gen *pbp1* son el mecanismo principal de resistencia, conllevando a una pérdida de la afinidad entre el antibiótico y la transpeptidasa PBP (71).

3.7 Compuestos alternativos con actividad anti-*H. pylori*

Son numerosos los compuestos hallados en plantas con efecto anti-*H. pylori*. Por mencionar algunos, se aisló el isotiocianato sulforafano abundante en las coles de brócoli hallando un efecto bacteriostático sobre la bacteria y valores de concentración mínima inhibitoria (MIC) de 2µg/ml. Este compuesto fue efectivo en erradicar *H. pylori* de xenoinjertos humanos en ratones nude (72).

Las catequinas del té verde, aparte de su actividad antioxidante también muestra actividad antibacteriana contra *H. pylori*, el *Epigallocatequin galato* posee la mayor actividad con un MIC de 8µg/ml para el 50% de las cepas que fueron evaluadas (73). Otros productos naturales hallados con actividad han sido el vino tinto y el resveratrol responsable de su actividad (MIC 6.5-25µg/ml), la miel y el propóleo.

En cuanto a compuestos procedentes de microorganismos, se ha visto actividad anti-*H. pylori* de parte de actinomicetos como *Pseudonocardia* sp. CL38489 (MIC 0.1 ng/ml), basidomicetos como *Phanerochaete velutina* CL6387 (MIC 5 ng/ml) (74) y de la bacteria *Streptomyces* se logró aislar la indolmicina con un MIC90 de 31 ng/ml.

3.8 Drogas de naturaleza peptídica

Las drogas convencionales tienen la desventaja de poseer una baja selectividad por su blanco, lo cual provoca efectos colaterales, por el contrario, la terapia proteica tiende a ser más específica. Sin embargo, esta terapia puede tener una baja disponibilidad, baja permeabilidad de la membrana e inestabilidad metabólica (75).

Actualmente, se encuentran circulando en el mercado más de 100 drogas basadas en péptidos; la mayoría posee entre 8 a 10 aminoácidos. Por ejemplo, el Exenatide es usado en el tratamiento de la diabetes tipo 2 y originalmente derivó de la saliva de un lagarto, el Gila Monster. Otro péptido natural es la ciclosporina A (CSA), originalmente descubierto por sus propiedades antifúngicas pero se utiliza como inmunosupresor. Posee una estructura primaria cíclica que lo protege de la degradación proteolítica, y oculta los grupos polares en el interior de la molécula y cuatro puentes de hidrógeno intramoleculares que amarran el NH amida restante para reducir su potencial de enlace de hidrógeno para solvatación con agua.

La producción de éste tipo de drogas se puede hacer por síntesis química o recombinante. Ésta última es efectiva para secuencias largas, sin embargo el proceso puede ser costoso e involucrar pasos de producción complejos. La síntesis química es más flexible y fácil de escalar, a su vez es costo-efectiva dependiendo de la cantidad que se requiere producir.

Hoy en día existen alrededor de 40 péptidos sintetizados químicamente en el mercado. A lo largo de los años la síntesis de estos péptidos se ha ido automatizando, aportando así un mayor interés a la inclusión de nuevos fármacos peptídicos en el mercado, entre los retos que se tuvo que superar estuvo la

construcción de moléculas a partir de aminoácidos no estándar. El incorporar aminoácidos no naturales requiere incluir ingredientes activos extraídos de células crecidas en el laboratorio aumentando el costo de producción. A su vez, cuidar la quiralidad de los aminoácidos también es importante, lo que puede involucrar mayor número de pasos en la síntesis. En el caso de los péptidos cíclicos se pueden formar instalando puentes disulfuro internos entre los residuos cisteína o creando enlaces de hidrocarbonos entre los grupos funcionales.

IV. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Dado los altos índices de prevalencia de la infección por *Helicobacter pylori*, la estrecha relación que guarda con el desarrollo de enfermedades altamente mortales como el adenocarcinoma gástrico y el linfoma MALT, los altos índices de recurrencia de la enfermedad, el amplio espectro de resistencia a fármacos que presenta éste patógeno, entre otros factores; se ha visto la necesidad de hallar nuevos compuestos, con mecanismos de acción alternativos, que ayuden a combatirlo.

En los últimos años la generación de nuevos antibióticos se ha centrado en modificaciones de drogas ya existentes, exponiendo a las bacterias a un arsenal limitado de estrategias antibacterianas y por ende facilitando la aparición de nuevos mecanismos de resistencia. Al respecto, los AMPs proveerían de maneras alternativas de eliminar a los patógenos invasores (28).

Los péptidos antimicrobianos AMPs tienen como mecanismo de acción la desestabilización de la membrana celular, por tanto se cree que es muy difícil para las bacterias desarrollar resistencia contra estos péptidos. Un mecanismo para la generación de resistencia implicaría una reestructuración total de la membrana celular la cual sería una adaptación demasiado costosa para la bacteria y que tomaría largos periodos de evolución (76),

Las larvas de las que se propone extraer los péptidos antimicrobianos fueron elegidas debido a que - entre otras zonas de América, Nueva Zelanda y Australia - habitan la Amazonía peruana, lo que sustenta su fácil obtención y contribuye a la valorización de la biodiversidad, y por otro lado, su alta capacidad de generación

de AMPs. Ya existen estudios que han logrado aislar AMPs con actividad anti-*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* MRSA y *Micrococcus luteus*, a partir de las Moscas Soldado Negra.

La diversidad de las secuencias de los AMPs es tan amplia que es poco probable aislar el mismo péptido en dos especies distintas. Si se logra obtener péptidos activos a partir de ésta mosca, es muy probable que estos representen una contribución a la base de datos de AMPs..

Otro punto a favor de los AMPs es que estos pueden actuar en sinergia con los antibióticos convencionales actualmente utilizados contra bacterias multidrogo resistentes. Se postula que los AMPs pueden actuar desestabilizando la pared de la membrana de las bacterias, favoreciendo la entrada de la molécula antibiótica, permitiendo así su llegada al target dentro del patógeno y favoreciendo la reducción de la dosis y acortando la duración del esquema de tratamiento (76).

De lograr aislar el o los péptidos con actividad anti-*Helicobacter pylori* éste se podría emplear como base para la síntesis de un potencial fármaco, con la posibilidad de realizar alguna modificación química adicional que permita incrementar su actividad y estabilidad. Está de más decir que un resultado positivo daría pie a la búsqueda de péptidos activos contra otros patógenos de importancia clínica para el Perú.

V. HIPÓTESIS

La mosca *Hermetia illucens* sintetiza péptidos antimicrobianos con actividad anti-*Helicobacter pylori*.

VI. OBJETIVOS

6.1 Objetivo General

Emplear la técnica de fraccionamiento guiado-por-bioensayo para la purificación e identificación de péptidos con actividad anti-*Helicobacter pylori*, obtenidos a partir de la hemolinfa pre-estimulada de las larvas de *Hermetia illucens* (Black Soldier Fly o Mosca Soldado Negra).

6.2 Objetivos Específicos

- Comprobar la presencia de actividad anti-*Helicobacter pylori* en la hemolinfa de las larvas de *Hermetia illucens*.
- Comparar diferencias en la actividad antimicrobiana de hemolinfa con y sin previa estimulación.
- Purificar péptidos antimicrobianos con actividad en cultivos *in vitro* de *Helicobacter pylori* ATCC 43504, por técnicas cromatográficas adecuadas según las propiedades bioquímicas de los mismos.
- Caracterizar bioquímicamente los péptidos aislados: pureza, pI, peso molecular, presencia de puentes disulfuro en su estructura secundaria.
- Identificar la secuencia primaria de los péptidos activos purificados mediante análisis por espectrometría de masa.

VII. METODOLOGÍA

7.1 Diseño del estudio

El presente es un estudio de carácter descriptivo puesto que el objetivo es aprovechar la capacidad de síntesis de AMPs de la Mosca Soldado Negra y probar su actividad anti-*Helicobacter pylori*. Acorde a ésta característica, el trabajo de investigación servirá como base para posteriores investigaciones sobre el mecanismo de acción de los AMPs aislados, el mejoramiento de su actividad, actividad contra otras bacterias patógenas, etc.

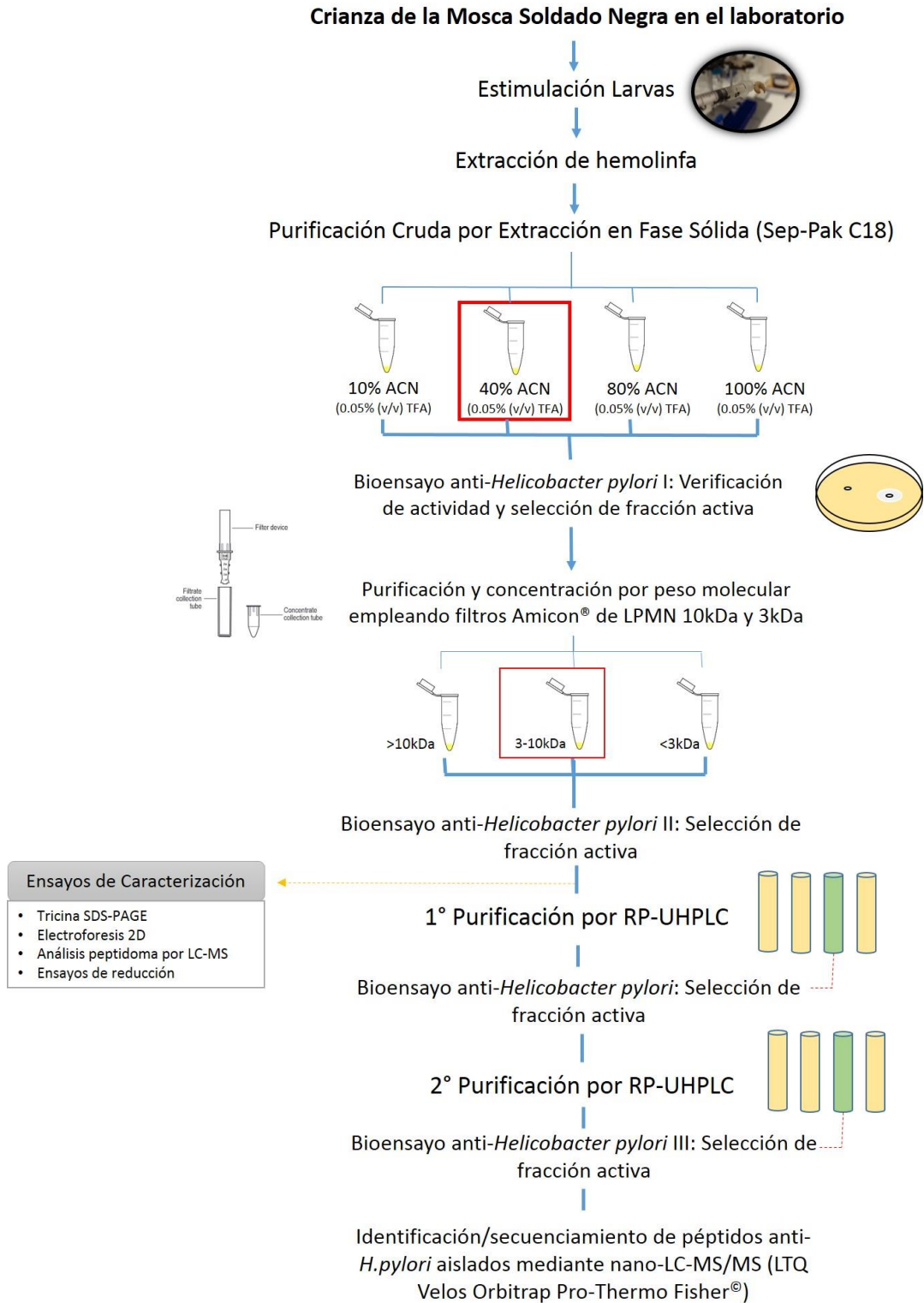
La metodología empleada se basa en las propiedades bioquímicas de los AMPs tales como peso molecular, carga neta, estructura secundaria, formación de puentes disulfuro. La ruta utilizada para la purificación estuvo guiada por bioensayos contra la bacteria de interés. Debido al escaso rendimiento de las moléculas de interés se tuvo que optar por un flujo de aislamiento de mediana complejidad con la intención de optimizar la pérdida de las fracciones aisladas en el proceso, también se utilizaron columnas cromatográficas de pequeño diámetro.

Como primer paso se tuvo que implementar la crianza de las Moscas Soldado Negra en el laboratorio, simulando las condiciones de su hábitat natural y asegurando el suministro permanente de las larvas para los experimentos. Se procedió con la estimulación de la síntesis de AMPs a cada una de las larvas con un cultivo overnight de *Escherichia coli* ATCC 25922 y el posterior aislamiento de la hemolinfa de las larvas (77). A partir del extracto crudo, se hizo una limpieza del mismo empleando columnas C18 de extracción en fase sólida (Sep-Pak®), luego se utilizaron filtros de centrifugación para separar las proteínas mayores a 10kDa, y

proceder con la purificación a través de dos series de separación por HPLC empleando una columna Aeris™ Peptides XB-C18 (Phenomenex®). A la par se hicieron análisis de las fracciones por espectrometría de masa, electroforesis en doble dimensión, y ensayos de reducción de enlaces disulfuro para los péptidos.

La cantidad de larvas que se utilizó por lote de extracción para cada una de las repeticiones de los pasos de purificación fue variable (un total de casi 8000 larvas fueron extraídas al finalizar la experimentación) y dependió de los rendimientos de extracción de hemolinfa (en promedio 10 µl/ml) y la cantidad de muestra que se consumió en cada paso estandarizado. En el siguiente esquema explica la ruta seguida para la purificación de la fracción de péptidos activos.

7.1.1 Diagrama de Flujo para el aislamiento y caracterización de péptidos con actividad anti-*Helicobacter pylori* a partir de la hemolinfa pre-estimulada de larvas de la mosca *Hermetia illucens*



7.2 Procedimientos y técnicas

7.2.1 Crianza y mantenimiento de las larvas de la Mosca Soldado Negra

Para la crianza de las Moscas Soldado Negra se tuvo que mantener constante las variables de temperatura y humedad del ambiente. A través de calefactores se mantuvo la temperatura a $28\pm 1^{\circ}\text{C}$, y con humidificadores a vapor se pudo tener una humedad relativa estable de 70%.

La luz dentro de las jaulas (dimensiones 120 x 70 x 70 cm) es una variable determinante para el éxito del apareamiento y la oviposición. Se utilizaron 4 lámparas fluorescentes compactas en espiral por cada jaula, dos de las cuales eran de luz cálida (temperatura del color 2700K) y dos de luz fría (temperatura del color 6500K), consumo 60W, 2x100W, 1x40W, una frecuencia de 50/60Hz, 450mA y flujo luminoso de 3500 lúmenes. El periodo de luz empleado fue 12:12h (6 am a 6 pm).

Las larvas fueron criadas con alimento balanceado para pollos (PuriCarne®) en dos variedades, se probó uno estándar y otro enriquecido con vitaminas y minerales, sin embargo no hubo mayor diferencia visible en el desarrollo de las larvas. Se optó por el suministro permanente de alimento balanceado enriquecido (Proteína 16.5% min, grasa 3% min, fibra 6% max, humedad 14% max, ceniza 10% max)

El mantenimiento del ciclo de vida de la mosca BSF en el laboratorio se hizo de la siguiente manera: Los huevos fueron colectados en nidos de cartón corrugado, estos recipientes tenían alimento en la parte inferior actuando como cebo para la oviposición de las hembras. Los cluster de huevos ovipositados eclosionaron entre 2-3 días y fueron llevados a pequeños recipientes con comida humedecida (1.4 ml

de agua por gramo de comida), donde se esperó a que se adapten, se alimenten y aumenten de tamaño. Luego de 4 días con un tamaño aproximado de 0.5 cm fueron trasladados a contenedores más grandes donde el alimento fue proporcionado a saciedad y donde pasaron 5 de los 6 estadios larvarios (tiempo aproximado: 10 días). Las larvas en estadio de prepupa (6to estadio larvario) fueron trasladadas a recipientes con tierra negra puesto que requieren de un ambiente seco para su metamorfosis que dura alrededor de 7 días. En periodo de pupa tardaron un lapso de 1 semana hasta eclosionar. Los adultos fueron colocados en jaulas con luz, recipientes con agua, y nidos para depositar sus huevos.

7.2.2 Estimulación de la síntesis de péptidos antimicrobianos y colección de hemolinfa

7.2.2.1 Infección de larvas

Se seleccionaron larvas de 4to estadio: tegumento color crema claro, tamaño ≥ 1.5 cm y longitud de la cápsula cefálica de 1.5mm (21). Se lavaron con agua de grifo para retirar todo resto de comida y se enjuagaron reiteradas veces con agua destilada a temperatura ambiente; se retiró el exceso de agua utilizando papel absorbente. No se aplicó el protocolo convencional para anestésiar las larvas a 4°C, puesto que ésta especie de larvas almacena demasiada grasa en su interior dificultando la extracción de la hemolinfa.

Cada larva fue punzada e inoculada con 10 μ l de cultivo *overnight* de *Escherichia coli* ATCC 25922 (1×10^3 cel/ μ l) con ayuda de una jeringa de tuberculina (BD Ultra-Fine®II). Se utilizó *E. coli* por su fácil mantenimiento y rápida propagación,

además se ha visto que la inducción de genes que codifican para AMPs que tengan como blanco Gram+ y/o Gram- es independiente de la naturaleza del estímulo, e incluso si éstas están vivas o muertas (78).

Las larvas infectadas fueron colocadas nuevamente en comida humedecida y llevadas al ambiente de crianza (28°C, 70% H) por 36 horas para su incubación.

7.2.2.2 Extracción y colección de la hemolinfa

Se dejaron incubando las larvas por 36 horas tras la infección. Para coleccionar la hemolinfa pre-estimulada se utilizó aprotinina (inhibidor de proteasas, Sigma-Aldrich®) a una concentración de 10 µg/ml de hemolinfa coleccionada y 1 µg de feniltioúrea (Sigma-Aldrich, PTU, solución stock 20mM en etanol) por ml de hemolinfa (77). Se vio por conveniente coleccionar microtubos con 500 µl de hemolinfa cada uno. Mantener la cadena de frío fue importante para evitar la melanización de la hemolinfa, pudiendo afectar los pasos de purificación posteriores.

A las larvas infectadas se les hizo una pequeña incisión con un bisturí N°12, evitando dañar los órganos internos, y se coleccionó la hemolinfa con una micropipeta P20. Al completar los 500 µl en el microtubo, la hemolinfa se centrifugó a 15,000g por 3 min a 4°C para remover los hemocitos y el debris celular, recuperando el sobrenadante (Fig. 5).

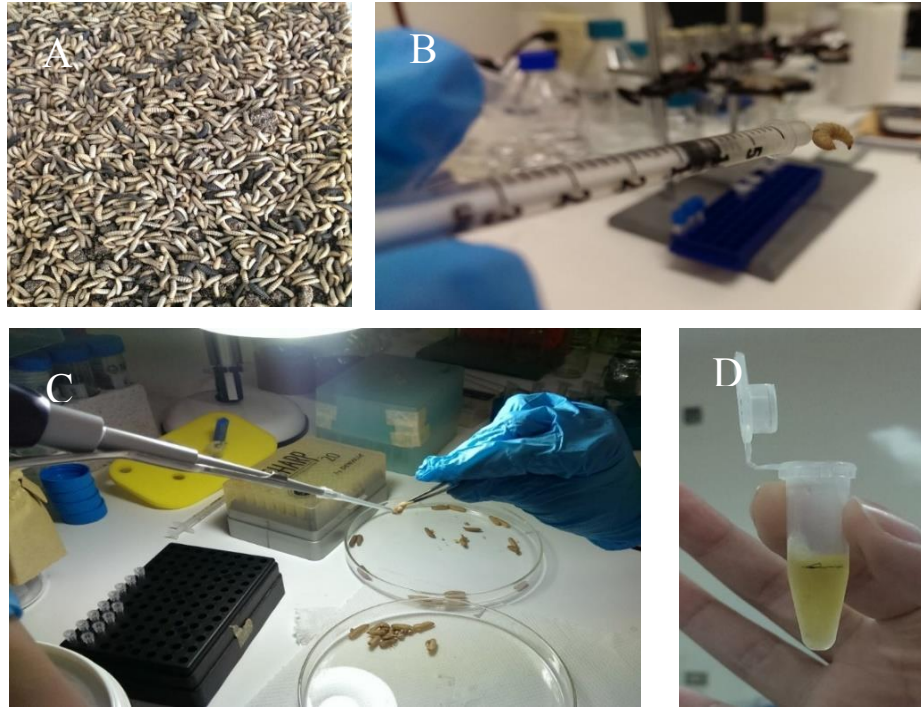


Fig. 5 Proceso de inoculación y colecta de hemolinfa. (A) Larvas seleccionadas de 4to estadio (8 días aprox), (B) Inoculación de larvas con cultivo de *Escherichia coli* 25922, (C) Incisión y colecta de hemolinfa de larvas incubadas, (D) Hemolinfa colectada

Se visualizó el espectro de absorción UV de la hemolinfa tanto inoculada como sin inocular empleando un espectrofotómetro de microvolúmenes *Nanodrop 2000c* (Thermo Scientific™) y se midió la concentración de péptidos a 215 nm.

7.2.3 Análisis de la complejidad y diversidad estructural del peptidoma de la hemolinfa

7.2.3.1 Análisis de la composición por HPLC-MS (Centre Universitaire de formation et de Recherche Jean-Francois Champollion Equipe VacBio EA4357, Albi-France, responsable laboratorio: PhD. Michel Treilhou):

Se hizo el análisis de la fracción peptídica <10kDa mediante cromatografía líquida de alta performance (HPLC) utilizando una columna Luna HPLC RP-C18 Phenomenex® (150 x 2.1 mm; 5 µm) acoplado a un LCQ Advantage Mass Spectrometer de la marca Thermo Scientific™. Se usó como eluyentes 5%ACN, 1%AF (v/v)/H₂O (A) y 1%AF (v/v)/ACN (B) a una tasa de flujo de 0.25ml/min (40°C), la gradiente utilizada fue la siguiente: solvente A 100-50% (0-45 min), 50-0% (45-55 min), para limpiar la columna 0%A por 55-60 min, y luego para la estabilización 0-100%A (60-63 min), 100%A (63-75 min).

7.2.3.2 Reducción química y alquilación para la identificación de péptidos unidos por puentes disulfuro. *Protocolo extraído de Touchard et al. (79)*

Para la reacción de reducción se incubó 5µl de la fracción <10kDa con 10µl de buffer amonio bicarbonato 100mM (pH 8) conteniendo 6M de guanidina y

ditiotreitól (DTT) 10 mM por 30 minutos a 56°C. La reacción se suspendió agregando 5µl de 0.1% v/v TFA.

Luego de la reducción con DTT se hizo la reacción de alquilación incubando la mezcla con 50 mM de ácido iodoacético (IAA) por 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. La formación del derivado S-carboximetil de cisteína resulta en un incremento de 116 Da por cada puente disulfuro (58Da por cada residuo de cisteína) presente.

7.2.4 Purificación de el/los péptidos activos

7.2.4.1 Pre-purificación de hemolinfa con columnas de Extracción en Fase Sólida (SPE) Sep-Pak C-18

Los péptidos antimicrobianos son selectivamente solubles en solventes ácidos que denaturan otras proteínas más grandes (80) por lo que la hemolinfa pre-estimulada colectada y libre del paquete celular fue diluida en un volumen igual de una solución de ácido trifluoroacético acuoso helado al 0.1% (V/V) y se centrifugó a 15,000g por 30 minutos a 4°C. La falta de estructura secundaria definida en solución de la mayoría de AMPs les permite soportar altas temperaturas, y su solubilización en solventes orgánicos sin comprometer su actividad bacteriana.

Los AMPs poseen una conformación anfipática en solución exhibiendo una región de cadenas laterales hidrofóbicas (80). Se empleó la extracción en fase sólida (SPE) con matriz C18 de fase reversa (matriz C18) para hacer una cromatografía cruda y preparar las muestras de péptidos.

Se depositó 0.5 ml de la muestra acidificada en los cartuchos Sep-Pak C18 (Chromabond® C₁₈ de flujo rápido, 60Å, 100 µm) y se eluyó de manera escalonada con 6 ml de la fase móvil 10, 40, 80 y 100% de acetonitrilo/0.05% TFA.

Una vez obtenidas las fracciones fueron concentradas primero en un evaporador rotacional al vacío (Rotavapor®) a temperatura ambiente para eliminar el solvente orgánico y luego se liofilizaron (Labconco® temperatura del colector: ≈-40 °C, presión de vacío: 0.01-0.1 mBar por 24 horas aprox.) para eliminar el remanente de agua e incrementar la estabilidad. Una vez liofilizadas, se calculó el rendimiento de cada fracción y se guardó a -20°C para continuar con su purificación.

7.2.4.2 Separación de fracciones según peso molecular nominal

Para favorecer la separación de todas aquellas proteínas grandes que tuvieran un peso molecular nominal por encima de los 10 kDa, se optó por un sistema de ultrafiltración empleando columnas Amicon Ultra-2 con límite de peso molecular nominal de 10kDa (Merck-Millipore®).

Se preparó soluciones de las fracciones liofilizadas activas a una concentración de 0.5 mg/ml en Agua Tipo 1 (MilliQ, Merck-Millipore®) y, de ser necesario, se añadió hasta 20% de acetonitrilo para facilitar la disolución.

Antes de agregar las muestras, las membranas de ultrafiltración fueron lavadas con agua tipo 1 MilliQ a 4000g, 20 min, 4°C en rotor oscilante para remover los remanentes de glicerina de los filtros.

Las muestras (2ml) fueron centrifugadas en un rotor oscilante a 4000g por 30 minutos a 4°C. Para recuperar el concentrado se da la vuelta a los filtros y se centrifuga nuevamente a 1000g por 2 minutos (Fig. 6).

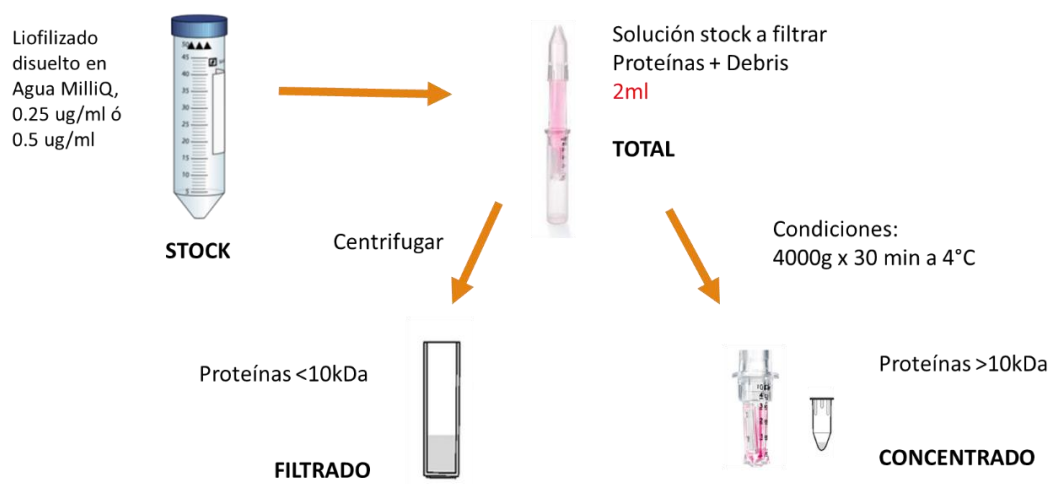


Fig. 6 Esquema del proceso de ultrafiltración con Amicon Ultra-2 NMWL 10kDa (Merck-Millipore®)

Para concentrar los péptidos de interés y separar aquellas moléculas por debajo de los 3 kDa, se centrifugó secuencialmente la fracción <10kDa utilizando filtros de límite de peso molecular nominal NMWL 3kDa a 4,000g por 60 minutos y 4°C. Del mismo modo la fracción concentrada se recuperó a 1000g por 2 minutos.

Las columnas de filtración fueron reusadas máximo en 3 oportunidades. Entre usos fueron guardadas en 20% de etanol absoluto a 4°C para su conservación.

7.2.4.3 Fraccionamiento del pool 3-10 kDa por cromatografía líquida de ultra alta eficiencia semipreparativa (HPLC)

Se hicieron varios ciclos de inyecciones de la fracción peptídica concentrada de 3-10kDa (50µl c/u a 1.2 mg/ml_{KIT} en H₂O MilliQ como solvente) en una columna Aeris™ Peptides XB-C18 Phenomenex® (150 x 2.1 mm; 2.6 µm, 100Å) empleando un equipo UHPLC Dionex Ultimate 3000 de Thermo Scientific® acoplado a un detector de diodos DAD. Se utilizó una gradiente lineal 0.1% TFA/H₂O (A), 0.1% TFA/ACN (B), ACN (C) programada de la siguiente manera: 0-45 min de 90A/10B a 55A/45B, 45-55 min 100C, a una temperatura de columna de 30°C y un flujo de 0.5 ml/min. La detección fue monitoreada a 215nm. La purificación fue realizada a través de una colecta manual en base a los tiempos de elución de los picos.

Ya que la muestra analizada constituye una mezcla compleja de compuestos, se colectó 6 grupos de picos o fracciones (F.0 – F.6), tomando como referencia los picos más abundantes:

- a. **F.0:** 0 a 3 min
- b. **F.1:** 3.1 a 13.39 min
- c. **F.2:** 13.4 a 17.97 min
- d. **F.3:** 17.98 a 24.12 min
- e. **F.4:** 24.13 a 25.97 min
- f. **F.5:** 25.98 a 32.84 min
- g. **F.6:** 32.85 a 45 min

Las fracciones colectadas fueron concentradas empleando el RapidVap N2/48 (LabConco®, V=35%, T=37°C, 75mBar) y el liofilizador para terminar de eliminar el contenido de agua de las fracciones (Labconco® Temp. colector ≈-40 °C, presión vacío: 0.01-0.1 mBar por 24 horas aprox.). Por último, las fracciones fueron resuspendidas en H₂O MilliQ estéril (filtro 0.2 µm) en el volumen necesario para ser evaluadas en bioensayo.

De manera consecutiva se hizo un nuevo ciclo de purificación para la fracción de mayor actividad. Se modificó la gradiente lineal, 25-40% ACN 0.05% TFA/ H₂O en un lapso de 35 minutos, manteniendo las demás condiciones constantes. Ésta vez se hizo la colecta de 9 fracciones (F. 5.1 – F. 5.9):

- a. **F.5.1:** 0-10 min
- b. **F.5.2:** 10.1-12.2 min
- c. **F.5.3:** 12.3-16 min
- d. **F.5.4:** 16.1-17 min
- e. **F.5.5:** 17.1-18.8 min
- f. **F.5.6:** 18.9-20 min
- g. **F.5.7:** 20.1-22 min
- h. **F.5.8:** 22.1-24 min
- i. **F.5.9:** 24.1-35 min

Nuevamente las fracciones fueron concentradas y llevadas a análisis por bioensayo.

7.2.5 Caracterización bioquímica de las fracciones activas

7.2.5.1 Cuantificación de proteínas

7.2.5.1.1 Por Ensayo de Bradford

Se empleó el Reactivo de Bradford (Bio-Rad®) conforme a las indicaciones del proveedor, con una curva estándar de albúmina sérica bovina (BSA), 2.5-100 ug/ml. Las lecturas de absorbancia se hicieron por duplicado a una longitud de onda de 595nm (VersaMax™ ELISA Microplate Reader) empleando el software SoftMax® Pro.

Se hizo un estimado de la concentración de proteínas presentes en la solución stock liofilizada disuelta en agua tipo 1 MilliQ así como de las fracciones derivadas del paso de ultrafiltración molecular: >10kDa, <10kDa, 3-10kDa, <3kDa.

7.2.5.1.2 Por Kit “Non-Interfering Protein Assay™ (Calbiochem®)”

Este kit (“Non-Interfering Protein Assay™ (Calbiochem® EMD Biosciences, Inc.)”) es capaz de remover todos aquellos contaminantes que interfieran con la medición de la concentración proteica. Utiliza iones de cobre que se unen a la cadena principal del péptido con la ventaja que las lecturas se dan sin sesgo por las absorbancias de los residuos de la cadena lateral de los aminoácidos que lo componen, permitiendo mediciones más exactas. La exactitud en las lecturas de este kit fue comprobada al hacer mediciones de un péptido puro liofilizado de peso conocido que se tenía en el laboratorio.

La cuantificación se hizo según el protocolo del proveedor. Se utilizó una curva estándar de BSA que iba de 0 a 50 ug. La absorbancia es medida a 490 nm en un lector de microplacas *iMark* de BioRad®.

Éste método de cuantificación se empleó para las fracciones activas concentradas que iban a ser sometidas a bioensayo.

7.2.5.1.3 Por absorbancia en UV a 215 nm

La lectura de absorbancia UV a 215nm se hizo en un espectrómetro Nanodrop *2000c* (Thermo Scientific®), para ello se preparó una curva estándar con el péptido sintético Bicarinalina de 20aa de longitud, aislado de *Tretamorium bicarinatum* (KIKIPWGKVKDFLVGGMKAV-NH₂), en un rango de 62.5-1000 µg/ml. También se evaluó la concordancia entre las lecturas por kit y por UV de las mismas muestras. Este método tenía como ventaja las bajas cantidades de muestra requeridas para efectuar la medición. En este método de cuantificación se utilizó 2µl de las fracciones de menor concentración obtenidas de la separación por UHPLC.

7.2.5.2 Visualización de péptidos pequeños <10kDa por electroforesis en gel de poliacrilamida bajo condiciones denaturantes

7.2.5.2.1 Tricina-SDS-PAGE modificado Adaptado Schägger (81).

Se hizo un PAGE (“Polyacrilamide gel Electrophoresis”) con tricina para conocer el grado de pureza de las fracciones activas y calcular los pesos moleculares aproximados de los péptidos presentes. Ésta modificación del tradicional Glicina-SDS PAGE permite resolver proteínas y péptidos que están en el rango de 5 a 20kDa de manera más precisa y con mayor resolución.

Se utilizó un gel al 15% de poliacrilamida (30% acrilamida/bis-acrilamida, 29:1, 3.3% crosslinker). Las muestras fueron corridas bajo condiciones denaturantes (5% SDS (p/V), 20% glicerol, 0.002% azul de bromofenol, 50 mM Tris/HCl pH 7.0, 5% BME) previamente incubadas a 95°C x 5 minutos. Se emplearon dos buffers para los electrodos: un buffer ánodo (10X: 1M Tris, 0.225M HCl, pH 8.9) y un buffer cátodo (10X: 1M Tris, 1M tricina, 1%SDS, pH 8.25) ambos diluidos a 1X al momento de la corrida. Se inició a 50V hasta que las proteínas ingresaron por completo en el gel de apilamiento, luego se aumentó a 200V y se dejó corriendo por 1 hora aproximadamente. La tinción de las proteínas para su visualización se hizo con Azul de Coomassie G-250.

7.2.5.2.2 Laemmli SDS-PAGE

Se preparó un gel de apilamiento al 15% (8.3 x 6.4 cm) bajo condiciones denaturantes. Las muestras fueron previamente incubadas en 5% SDS, 20% glicerol, 0.002% azul de bromofenol, 50 mM Tris/HCl (pH 7.0), 5% BME a 95°C por 10 minutos. Se dejó correr las muestras a 200V por 90 minutos en buffer SDS-Tris Glicina 1X.

7.2.5.2.3 Electroforesis 2D-SDS-PAGE

Luego de hacer correr los péptidos en una dimensión se confirmó la pureza de las bandas, separándolas respecto a su punto isoelectrico y su masa molecular en una electroforesis de doble dimensión.

Se hizo la separación según su punto isoelectrico (pI) por isoelectroenfoque (IEF), se empleó tiras IPG de 11 cm de longitud que abarcaban un pH de 3-10 no lineal en un Isoelectric Focusing System de BioRad®. Para cada gel se emplea 100 µg de muestra (péptidos) que es solubilizada en el Reactivo "Protein Extraction Reagent Type 4" (C0356 Sigma-Aldrich®). Se denaturan y alquilan los péptidos con DTT y acrilamida 9M, respectivamente y se deja incubando con los anfolitos 3-10. Se colocó 200 µl de la mezcla en el carril de isoelectroenfoque y se cubrió con la tira IPG. El programa de isoelectroenfoque incluyó una rehidratación activa a 50V, 12 hrs y a 20°C.

Se equilibró la tira IPG en los buffer I y II por 30 minutos con ayuda de un rocker. Para la segunda dimensión se preparó un gel SDS-PAGE al 12% (14 x 28 x 0.1 cm) y se utilizó el marcador de peso molecular "Precision Plus Protein™ Dual Xtra

Standard” (161-0377, Bio-Rad®) diluido 1/20. Se dejó corriendo a 0.14 mA por 8 horas aproximadamente. Una vez finalizada la corrida electroforética, se sumergió el gel en solución de fijación (12% ácido acético, 50% etanol) y se dejó incubando overnight. Tras el periodo de incubación se realizó la tinción con nitrato de Plata estándar (para mayor detalle acerca del protocolo referirse a la sección Anexos).

7.2.5.3 Análisis de fracción peptídica 3-10kDa por *Ultra Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry quadrupole Time of flight (UPLC-MSqTof)* (Laboratorio de Investigación Multidisciplinaria-LABINM-Universidad Peruana Antenor Orrego UPAO, Trujillo Perú. Responsable laboratorio: PhD. Kevin Wilkinson).

Para el análisis se empleó un sistema UPLC Acquity de la marca Waters® acoplado a un espectrómetro de masa Xevo G2-XS con modo de ionización por Electrospray y analizador de masa tipo Qtof (StepWave, ESI), capaz de medir masas en el rango de 50 a 100.000 Da. La separación cromatográfica se hizo con una columna Acquity UPLC BEH C18 (2.1 x 50 mm, 1.7 µm, 130Å, 185 m²/g). Se requirió hacer una calibración para ajuste de masa con el péptido estándar Leucina encefalina [M+H]⁺ = 556.277. Además se emplearon compuestos de masas conocidas para la calibración de la exactitud de masa, cuyo valor experimental en ppm no debía ser >2 respecto a lo esperado.

$$\text{ppm} = \frac{(\text{Teórico} - \text{Experimental})}{\text{Teórico}} \times 1 \text{ millón}$$

Tanto el Agua Tipo 1 (MilliQ) utilizada para disolver las muestras, como el blanco metodológico fueron analizadas por infusión directa al espectrómetro de masa. A la par se hizo la inyección a la columna del UPLC para restar dicho cromatograma del cromatograma de la muestra de péptidos y poder discernir entre las señales de interés. Las muestras analizadas por infusión al espectrómetro de masa fueron diluidas en MeOH/0.5% ac. Fórmico en H₂O, en proporción 1:1 a una concentración de 25 µg/ml.

Para la inyección por UPLC, se diluyó la muestra en 0.5% de ácido fórmico a una concentración de 25 µg/ml y se inyectó 10µl a una tasa de flujo de 0.6ml/min con una gradiente lineal 0.1% ácido fórmico (A), ACN/0.5% ac. Fórmico (B) programada de la siguiente manera: 0-10 min de 100A/0 B a 60A/ 40 B. La temperatura de la columna fue de 40°C.

Se utilizó el programa *MassLynx*TM de Waters para el análisis de los cromatogramas, de los espectros de masa (m/z), y la distribución isotópica de los iones. Con estos datos se definió la carga del ión = z , y su valor m/z , para poder identificar la masa (m) de los péptidos candidatos.

7.2.6 Ensayos de actividad anti-*Helicobacter pylori*

7.2.6.1 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) por ensayo de microdilución en placa

La evaluación del MIC para *H. pylori* se hizo por microdilución en placas estériles de fondo plano, empleando como cepa de referencia *Helicobacter pylori* ATCC® 43504 (*vacA* s1a-m1, *cagA* positiva, una cepa virulenta con alta actividad de toxina vacuolante VacA y positivo para la isla de patogenicidad *cagA*). Para trabajar con esta cepa se utilizó un nivel de bioseguridad-2. La cepa de referencia fue descriopreservada y sembrada en placas de Agar Sangre (10% sangre de cordero) con base Agar Infusión cerebro-corazón (BBL™ BHI) suplementado con Skirrow 0.5% (“Campylobacter Selective Supplement”, Skirrow Oxoid® SR0069, Vancomicina 5 mg, Polimixina B 1250 UI, trimetropina 2.5 mg), anfotericina B (Sigma-Aldrich) al 0.025%, IsoVitaleX® (211875 BD™) 1%. Se incubó por 3 días a 37°C en atmósfera de microaerofilia (10% CO₂, 5% O₂, 85% N₂).

Se preparó un inóculo de 2×10^6 cel/ml en caldo BHI suplementado con 10% Suero Fetal Bovino y 1% de IsoVitaleX. Este mismo medio se utilizó para hacer las diluciones seriadas de la muestra a evaluar en la microplaca. Cada pozo contenía 50 µl de la muestra a evaluar y 50µl del inóculo bacteriano ($[\text{inóculo}]_f / \text{pozo} = 1 \times 10^6$ cel/ml). La placas se incubaron por 72 horas a 37°C en microaerofilia (10% CO₂, 5% O₂ y 85% N₂). Cada muestra se evaluó por triplicado y se consideraron controles positivos (Medio + Bacteria) y negativos en cada una de las placas. Como control interno de la calidad de la cepa se utilizó amoxicilina (A8523 Sigma-Aldrich), MIC=0.015 µg/ml (0.04 µM).

7.2.6.2 Ensayo de Zona de Inhibición (Modificado *Park et al. (6)*)

Se utilizó este método de manera alternativa para hacer un tamizaje rápido de la ubicación de la actividad antimicrobiana en el conjunto de fracciones obtenidas.

Se prepararon placas de 2 mm de espesor de Infusión Cerebro-Corazón al 0.8% de agar suplementado con 10% SFB, e Isovitalax 2%, 0.4% de cloruro de trifenil tetrazolio (TTC) como indicador de crecimiento bacteriano y anfotericina B al 0.025%, y se añadió un inóculo de *H. pylori* de 1×10^6 cel/ml de medio.

Una vez solidificado el medio agar con bacteria, se hicieron pocillos de 3 mm de diámetro donde se depositó 4-5 μ l de la muestra a evaluar. Las placas se llevaron a incubar por 72 horas a 37°C en microaerofilia (10% CO₂, 5% O₂ y 85% N₂).

7.2.7 LC-MS/MS e identificación de secuencias de péptidos activos en un espectrómetro de masa Orbitrap de alta resolución (Unidad de Proteómica y espectrometría de masa, Donald Danforth Plant Science Center, Saint Louis, Missouri-USA. Responsable: PhD. Bradley Evans).

Para la identificación de la secuencia de los péptidos contenidos en la fracción activa (F 5.8) se empleó un equipo *LTQ-Velos Pro Orbitrap* (Thermo Scientific®). Los analizadores de masa Orbitrap ofrecen la mayor resolución, precisión de masa y sensibilidad que hay actualmente en el mercado.

El espectrómetro de masa estuvo acoplado a un sistema de nano-LC-MS/MS utilizando una columna RP C18 0.075 mm x 250 mm (Thermo Scientific®) operado a un flujo de 260 nL/min (horno a 50°C) con la siguiente mezcla de solventes A: 0.1% ácido fórmico/H₂O, B: 0.1% ácido fórmico/80% acetonitrilo.

| | | | | | | | | | |
|---------------|---|---|---|----|----|----|------|----|----|
| Tiempo | 0 | 3 | 5 | 30 | 35 | 38 | 39.8 | 40 | 60 |
| %B | 2 | 2 | 8 | 25 | 40 | 98 | 98 | 2 | 2 |

Se inyectó 5 µl de la muestra diluida en 0.1%FA/80%ACN (inyección a la trampa a 5µl/min por 3 minutos). Se empleó el programa Mascot (<http://matrixscience.com>) para generar la data MS/MS teórica a partir de la base de datos de péptidos/proteínas y hacer el match con la data MS/MS experimental. Un score de probabilidad Mascot significativo ($p < 0.05$) fue considerado como una condición para una identificación del péptido satisfactoria.

7.3 Consideraciones éticas

De acuerdo al Manual de Procedimientos de la Universidad Peruana Cayetano Heredia y dadas las características del proyecto, se concluyó que éste no requiere evaluación por el Comité Institucional de ética en Humanos o en Animales de la universidad. Código constancia CAREG-ORVEI-052-015.

VIII. RESULTADOS

Antes de iniciar la búsqueda de péptidos activos hubo un periodo de adaptación y crianza de la Mosca Soldado Negra en condiciones de laboratorio. Con ésta intención se adaptaron dos áreas, una para la crianza de las larvas, en recipientes conteniendo alimento balanceado estándar para aves de corral, y otra para el estadio adulto, en jaulas donde pudieran aparearse y depositar los huevos para continuar su ciclo biológico. Se tomaron en cuenta variables importantes como la temperatura y humedad, la naturaleza de la luz empleada, su color y voltaje, la construcción de un nido adecuado a las necesidades para la oviposición de las hembras, la cantidad de individuos por jaula o por recipiente de comida, la calidad de la comida, entre otras.

Para supervisar el efecto de las distintas variables de crianza se evaluó de manera cualitativa el tiempo de desarrollo en etapa larvaria, prepupa y adulto, así como el tamaño de las larvas y la oviposición de huevos fértiles. Sin embargo, ésta data escapa al objetivo de éste trabajo. Una vez garantizada la estabilidad y sostenibilidad del ciclo biológico de la mosca se dio inicio a los experimentos de búsqueda de péptido activos contra *H. pylori*.

Como primer paso en el proceso de aislamiento y purificación AMPs se tuvo que separar la hemolinfa del resto del contenido larvario. En el estudio se hicieron 33 ensayos de extracción de hemolinfa pre-estimulada (se detallará más adelante éste procedimiento), según la necesidad de muestra para la estandarización del proceso, lográndose coleccionar cerca de 60 ml de éste fluido (Anexos). En promedio se extrajo 9 μ l de hemolinfa por larva pero este valor fue variable ($\sigma_{vol/larva}=2.2$) inter-ensayos (Fig. 7).

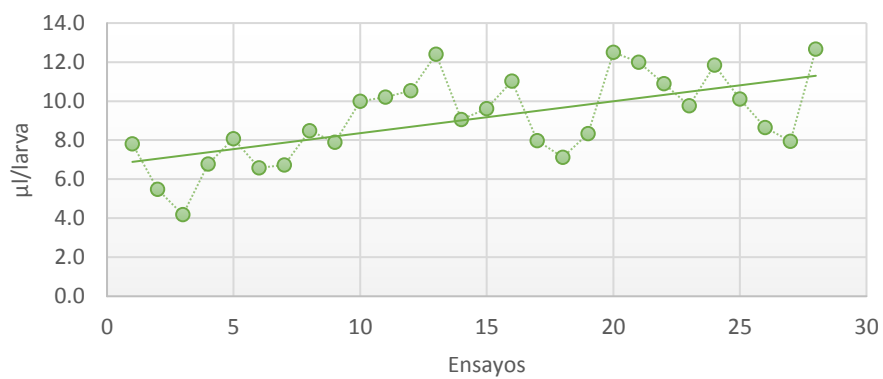


Fig. 7. Rendimiento de hemolinfa extraída por larva (pre-estimulada). Se puede observar una tendencia al incremento en el rendimiento conforme se fueron optimizando los ensayos de extracción

Se observó que la comida con mayor proporción proteica permite obtener un mayor rendimiento de hemolinfa, además es importante la constante selección de las larvas en el estadio larvario indicado:

1. Cuarto estadio larvario: longitud cuerpo ≥ 1.5 cm, cápsula cefálica ≈ 1.5 mm (Ver Anexo).
2. Tiempo de vida: 7-8 días*

(*) Para las condiciones de crianza empleadas en el estudio.

Las larvas luego de haber sido estimuladas para la producción de AMPs retornaron a su ambiente de crianza (28°C, 70%H) con alimento. Es importante dominar la técnica de extracción ya que de esta forma se minimiza el riesgo de degradación peptídica y melanización de la hemolinfa.

8.1 Comparación entre la hemolinfa de larvas pre-estimuladas y sin estimular

Los invertebrados requieren de un estímulo, herida o infección, para elicitar la síntesis de AMPs en el cuerpo graso. Las larvas de *Hermetia illucens* fueron infectadas con un cultivo de *E. coli* ATCC 25922 (1×10^3 cel/ μ l), con 36 horas de anticipación a la extracción de hemolinfa .

Se hicieron experimentos tanto con la hemolinfa pre-estimulada como sin estimular, en ambos casos se retiró el paquete de células y se analizó el sobrenadante bajo el espectro UV en un equipo Nanodrop2000c (Thermo Scientific®), empleando una dilución 1:10 del sobrenadante de hemolinfa. La absorción a las diferentes longitudes de onda UV son muy similares entre ambos grupos, sin embargo se

encontró un incremento de absorción (1.6 veces) en la muestra de hemolinfa estimulada en el rango de 214-216 nm (H. estimulada 10.6 mg/ml, sin estimular 6.4 mg/ml), longitud de onda a la que absorbe el enlace peptídico de los AMPs (Fig 8). Este experimento se hizo por duplicado con poblaciones de larvas distintas y se volvió a encontrar este notorio incremento en este rango UV. Es un resultado presuntivo de una estimulación efectiva de la producción de péptidos antimicrobianos.

En ambos espectros se observó un pico a 230 nm, que puede deberse a la presencia de sales inorgánicas ejm. Sulfito de sodio, nitrato de sodio, y lípidos dienos oxidados. A 280 nm, referido a las proteínas totales presentes en la hemolinfa, no se observa mayor diferencia.

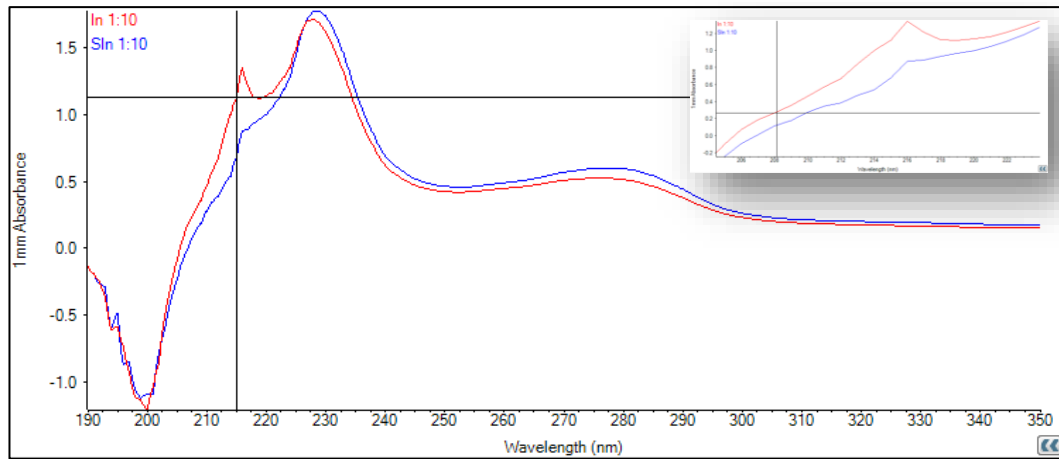


Fig. 8 Comparación entre los espectros de absorbancia UV de la hemolinfa pre-estimulada y sin estimular. Se trabajó con las diluciones 1:10 de las muestras de hemolinfa. Curva roja: Hemolinfa pre-estimulada, curva azul: hemolinfa sin estimular. En la esquina superior derecha se muestra una ampliación del rango 214-216 nm, rango de absorción del enlace peptídico

Otra característica de interés fue comprobar si la infección comprometía el desarrollo de las larvas durante el periodo de incubación post-estimulación. Se separó dos grupos de larvas, ambas fueron pesadas (n=50) a los 7 días de vida, y a continuación un grupo fue infectado con *E. coli*. Los dos grupos fueron criados bajo las mismas condiciones durante el periodo de incubación. Luego de 36 horas (9 días de vida), se pesó nuevamente ambos grupos. Con el fin de ver el efecto de la infección sobre el desarrollo, se calculó la tasa de crecimiento entre los 7 y 9 días, hallándose una diferencia significativa en las tasas de crecimiento entre ambos grupos $p=0.0012$, el promedio de la tasa de crecimiento del grupo sin inocular fue mayor al grupo inoculado (98.9% y 56.5%, respectivamente). Para efectos del análisis estadístico los datos fueron normalizados aplicando $\ln(x+1)$ (Fig. 9).

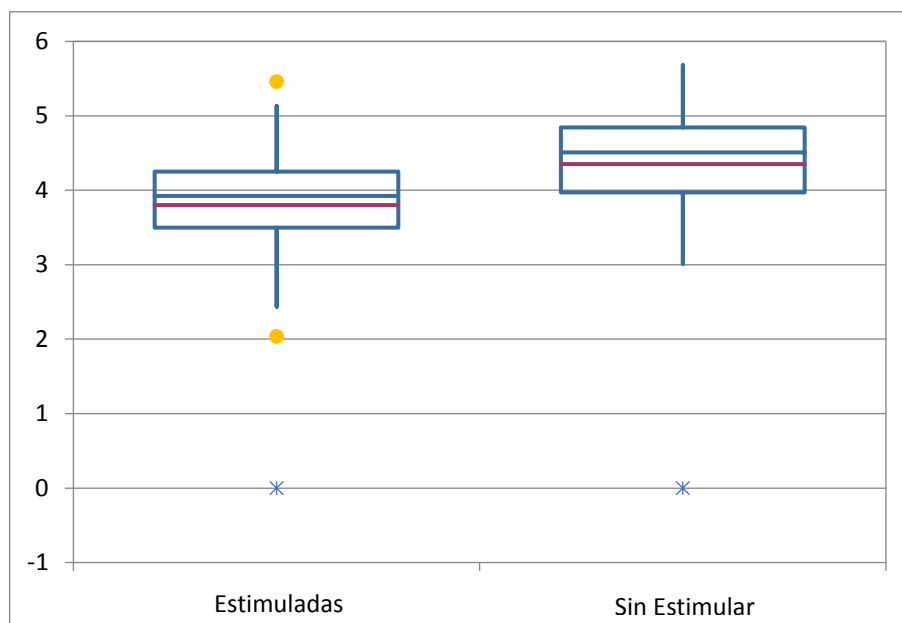


Fig. 9 Comparación de tasas de crecimiento (periodo entre 7-9 días), expresado en peso, entre el grupo de larvas estimuladas y sin estimular. - Caja, - Media (Ino 98.9%, Sin Ino 56.5%), ● Valores Atípicos, * Valores Extremos. Se encontró una diferencia de medias significativa ($p=0.0012$)

8.2 Purificación de péptidos con actividad anti-*Helicobacter pylori* a partir de la hemolinfa pre-estimulada de la Mosca Soldado Negra (*Hermetia illucens*)

8.2.1 Purificación cruda empleando columnas Sep-Pak® C18. Verificación de la presencia de actividad anti-*Helicobacter pylori* en la hemolinfa pre-estimulada.

Luego de separar la hemolinfa de las larvas de *Hermetia illucens* de 4to estadio, se eliminó el debris celular y se hizo la purificación cruda del sobrenadante acidificado empleando cartuchos pre-empacados Sep-Pak® C18. De ésta forma se esperaba remover las sales, el ácido del sobrenadante y el alto componente lipídico presente en la hemolinfa.

A partir de ésta purificación se separaron 4 fracciones de 10, 40, 80, 100% ACN (0.05% (v/v) TFA), observándose los siguientes rendimientos promedio en los diferentes ensayos de extracción y purificación: 10%ACN=68.8 mg/ml, 40%ACN=4.8 mg/ml, 80%ACN=1.1 mg/ml y 100%ACN=0.3 mg/ml, la sucesiva disminución en el rendimiento es un indicador del adecuado funcionamiento del sistema de purificación. Según estos datos, en la primera fase está eluyendo la mayor cantidad de contenido del sobrenadante de la hemolinfa, muy probablemente en su mayoría contenido lipídico.

Para identificar la presencia de péptidos antimicrobianos en las fracciones se evaluó la capacidad de inhibir el crecimiento de la cepa de referencia *H. pylori* ATCC 43504. Se emplearon dos modalidades de ensayo: (1) Por Ensayo de Microdilución en microplacas de 96 pozos, para la medición cuantitativa de la concentración

mínima inhibitoria (MIC, por sus siglas en inglés) y de manera cualitativa (2) Por Ensayo de Zona de Inhibición en placas de agar.

Previo a la evaluación de la actividad biológica de las muestras se hizo el control de calidad del sistema de bioensayo por microdilución y la cepa de referencia *Helicobacter pylori* ATCC® 43504 (CIP 103995) que se trabaja en el laboratorio. La cepa fue evaluada para su actividad Ureasa (+), catalasa (+). Oxidasa (+) y por microscopia (x400) se comprobó la forma bacilar y espiralada de la bacteria, síntoma de un estado óptimo de la cepa (Fig 10 A, B, C, D). Fue recomendable utilizar cultivos que tuvieran una baja proporción de células con morfología cocoide.

También se verificó la conformidad para los valores de Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) de las drogas de referencia amoxicilina, claritromicina, levofloxacino y metronidazol respecto a los reportados en el manual del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*) TABLA N°1 (82).

TABLA N° 1 Perfil de susceptibilidad *Helicobacter pylori* ATCC 43504*

| Antibióticos | MIC Cepa Laboratorio (µg/ml) | MIC Reportados ATCC 43504 (µg/ml) |
|---------------------|---|--|
| Amoxicilina | 0.015 (0.041 µM) | 0.015-0.125 ⁽⁸²⁾ |
| Claritromicina | 0.015 (0.02 µM) | 0.015-0.125 ⁽⁸²⁾ |
| Levofloxacino | 0.125 (0.346 µM) | 0.064-0.5 ⁽⁸³⁾ |
| Metronidazol | 64 (347.8 µM) | 64-256 ⁽⁸²⁾ |

* Ensayo de microdilución con un inóculo *H. pylori* a 1×10^7 cel/ml.



Fig. 10 Control de calidad de *Helicobacter pylori* ATCC 43504 (CIP 103995).

Se evaluó la conformidad de la cepa de referencia. A. Test de Ureasa + (izq. Control negativo, der. Control positivo cepa *H. pylori*), B. Test Catalasa (+), C. Test Oxidasa (+), D. Microscopia 400x Gram negativo, morfología espiralada

De la misma manera, para montaje y verificación del sistema de ensayo por zona de inhibición, se evaluó la actividad de la droga de referencia amoxicilina frente al cultivo en agar de *Helicobacter pylori* ATCC 43504. Los resultados se muestran a continuación (TABLA N°2):

TABLA N° 2 Ensayo Zona de Inhibición con Amoxicilina

H. pylori 43504*

| Amoxicilina [μg] | Diámetro de Inhibición (cm) |
|-------------------------|------------------------------------|
| 0.02 | 2.7 |
| 0.01 | 2.0 |
| 5 x 10 ⁻³ | 1.2 |
| 2.5 x 10 ⁻³ | No halo |

*Condiciones utilizadas: Inóculo a 1x10⁷ cel/ml, Medio BHI 1% Agar, IsoVitalex al 1%, TTC al 0.4%, Anfotericina B (20 mg/ml) al 0.025%.

Se observó una proporcionalidad entre el diámetro del halo de inhibición y la dilución al medio de la concentración de amoxicilina. A su vez, se comprobó la capacidad de difusión del antimicrobiano en el sistema montado para la detección de actividad de las fracciones.

8.2.1.1 Evaluación de las fracciones crudas por ensayo de microdilución

Se sembró la cepa *H. pylori* ATCC 43504 en placas de Agar Sangre (10% sangre de cordero, suplementado con Skirrow 0.5%, Anfotericina B 0.025% e IsoVitalex al 1%) y se dejó incubando por 72 horas. Se preparó un inóculo de 1×10^6 cel/ml en BHI 10% SFB, 1% Isovitalex y se repartió en cada uno de los pocillos de la microplaca a evaluar. Éste inóculo fue expuesto a las diluciones seriadas de las fracciones crudas liofilizadas de la hemolinfa 10, 40, 80, 100% ACN (0.05% TFA). Éstas fracciones fueron diluidas tanto en DMSO como en agua destilada tipo I (MilliQ®), sin embargo, se comprobó que el agua tipo I actuaba como un mejor diluyente permitiendo obtener valores MIC más bajos (Data no mostrada).

Las microplacas se dejaron incubando por 72 horas a 37°C en condiciones de microaerofilia. Se encontró que la fracción 40% ACN (0.05% TFA) poseía la actividad más elevada frente a la cepa de referencia *H. pylori* con un valor de concentración mínima inhibitoria MIC de 62.5 µg/ml a diferencia de las fracciones de 10% y 80% ACN (0.05% TFA) cuyos valores MIC estuvieron por encima del rango de valores evaluados, >250 µg/ml (TABLA N°3). La fracción eluida a 100% ACN (0.05% TFA) no pudo ser evaluada debido al casi nulo rendimiento de extracción. Ésta última fase de elución tiene como propósito la limpieza de la

columna cromatográfica. En cuanto a las fracciones provenientes de hemolinfa sin pre-estimar, ninguna presentó valor MIC en el rango de concentraciones evaluadas (por tanto, MIC “> [fracción]” en la TABLA 3).

TABLA N° 3 Valores MIC para fracciones crudas provenientes de hemolinfa pre-estimulada y sin estimular

| Fracciones % (ACN/0.05%TFA) | Concentraciones evaluadas (µg/ml) | MIC (µg/ml) |
|--|--|--------------------|
| <i>Hemolinfa pre-estimulada</i> | | |
| 10 | 250, 125, 62.5, ...7.8 | >250 |
| 40 | 500, 250, 125, ...15.6 | 62.5 |
| 80 | 250, 125, 62.5, ...7.8 | >250 |
| <i>Hemolinfa sin estimular</i> | | |
| 10 | 500, 250, 125, ...15.6 | >500 |
| 40 | 500, 250, 125, ...15.6 | >500 |
| 80 | 250, 125, 62.5, ...7.8 | >250 |

8.2.1.2 Evaluación de fracciones crudas por ensayo de Zona de Inhibición

El ensayo de zona de inhibición es una manera rápida de identificar las fracciones con actividad antibacteriana de manera más sencilla, sobretodo cuando se trabaja con mayor número de fracciones. Se deposita la muestra de interés en un pozo de 3mm de ancho y en caso de presentar actividad antibacteriana se podrá apreciar un halo de inhibición del crecimiento de la bacteria cultivada en todo el espesor del agar (protocolo modificado *Park et al.* (6)). Se evaluó las tres mismas fracciones crudas (10, 40, 80, 100% ACN (0.05%TFA)) depositando 5 µg de cada una por pozo. Se encontró resultados similares, la actividad anti-*H. pylori* estuvo concentrada en la fracción de mediana polaridad de 40% ACN (0.05% TFA). La hemolinfa de las larvas que no recibieron estimulación previa no presentó actividad visible contra ésta bacteria (Fig 11)

Cuando se evaluó las mismas fracciones frente a un cultivo de *E.coli* (inóculo 6×10^4 cel/ml), la única fracción que presentó actividad contra esta bacteria fue la de 40%ACN/0.05%TFA con un halo de 5mm. La inhibición contra *E. coli* es menor que la presentada para *H. pylori* sin embargo, es un indicio que nos permitió corroborar que la respuesta antimicrobiana con AMPs no es específica (Ver Anexo) (84).

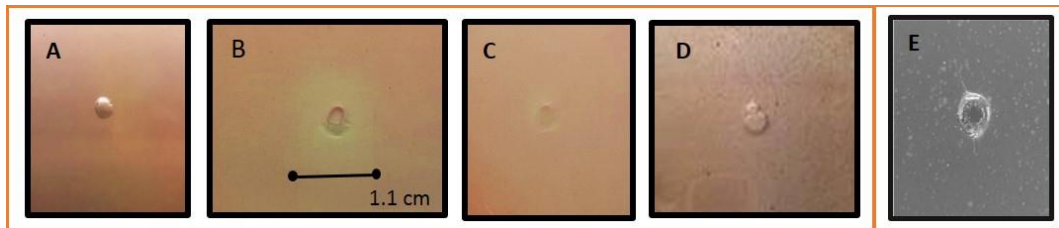


Fig. 11 Evaluación de fracciones crudas por ensayo de zona de inhibición.

Medio BHI al 1% de agar (2% IsoVitalex, 0.8% TTC (10 mg/ml), 0.025% Anfotericina B (20 mg/ml), 10% SFB) inoculado con *H. pylori* 1×10^6 cel/ml. Se agregó 4 μ l de cada fracción liofilizada a una concentración de 1.25 μ g/ μ l (3mm). Fracciones provenientes de hemolinfa pre-estimulada: (A) 10% ACN (0.05% (v/v) TFA), (B) 40% ACN (0.05% (v/v) TFA) halo 1.1 cm d.; (C) 80% ACN (0.05% (v/v) TFA); (D) Control negativo; Fracciones provenientes de hemolinfa no estimulada: (E) 40% ACN (0.05% (v/v) TFA).

Tanto el ensayo de microdilución como el de zona de inhibición coincidieron en que la hemolinfa de las larvas de *Hermetia illucens* contiene un compuesto/molécula “X” inducible capaz de inhibir el crecimiento de la bacteria *Helicobacter pylori*, presente en mayor proporción en la fracción 40% ACN (0.05% TFA). También se verificó que es necesario un estímulo inmunogénico que gatille la producción de estas moléculas (28, 40); dicho de otro modo, tras varias repeticiones se observó que la hemolinfa sin estimulación previa con *E. coli* ATCC25922 no presentóa actividad anti-*H. pylori* o al menos no se observó MIC a las concentraciones evaluadas.

La necesidad de un estímulo es un buen indicio que la actividad antimicrobiana es atribuible a moléculas de naturaleza peptídica o AMPs. Una vez obtenido éste resultado se pudo continuar con la purificación de la fracción activa.

8.2.2 Purificación por filtración molecular con filtros Amicon (Merck-Millipore®) 10kDa y 3kDa

El pequeño tamaño de los AMPs <10kDa (28, 85), permite emplear cromatografía de exclusión o filtración molecular (80) para su separación. No se conoce con exactitud el peso de los péptidos activos por lo que se prefirió hacer una separación más gruesa empleando filtros de límite de peso molecular nominal de 10kDa.

Para tener una idea de la composición proteica de la fracción activa, se midió la concentración de proteínas presentes tanto en la fracción retenida en el filtro (>10kDa) como en la fracción eluida (<10kDa) empleando el ensayo de Bradford. Aproximadamente el 18% del total de proteínas presentes en la fracción purificada

(40% ACN/0.05%TFA) eran péptidos menores a 10kDa, posibles candidatos a AMPs con actividad anti-*H. pylori*. De manera más detallada, por cada 100 ml de hemolinfa pre-estimulada se calculó habría 500 mg de la fracción liofilizada de 40%ACN (0.05%TFA), de ésta fracción sólo el 33% son proteínas, de las cuales el 18% son péptidos menores a 10kDa, candidatos a AMPs. Resumiendo, a partir de 100 ml de hemolinfa se esperaría obtener 30 mg de péptidos pequeños (<10kDa).

Como siguiente paso en la purificación de la fracción, para eliminar pequeñas moléculas interferentes, y a modo de concentración de la fracción <10kDa, se sometió la fracción a una segunda centrifugación con filtros de límite de peso molecular nominal de 3kDa.

Entonces, la fracción 40%ACN/0.05%TFA se dividió en tres subfracciones (A): F >10kDa, (B): F 3-10kDa y (C): F <3kDa, que fueron analizadas por bioensayo.

Por ensayo de microdilución en placa de 96 pozos se obtuvo los siguientes valores de concentración mínima inhibitoria (MIC) (A): F. >10kDa=125 µg/ml, (B): F. 3-10kDa=31.3µg/ml, (C) F. <10kDa= no se observó MIC a las concentraciones evaluadas. Conforme a lo esperado, la fracción de 3-10kDa es la fracción que concentra la mayor actividad anti-*H. pylori*, sin embargo la fracción >10kDa aún guarda un poco de ésta. Los resultados fueron corroborados por ensayo de zona de inhibición; se depositó 5µg de la muestra (Kit *Non Interfering Protein Assay*TM), el halo formado por la fracción más activa (3-10kDa) mide 1.85 cm, aproximadamente el doble del halo de la fracción de 40%ACN (0.05%TFA) de la cual proviene (Fig. 12).

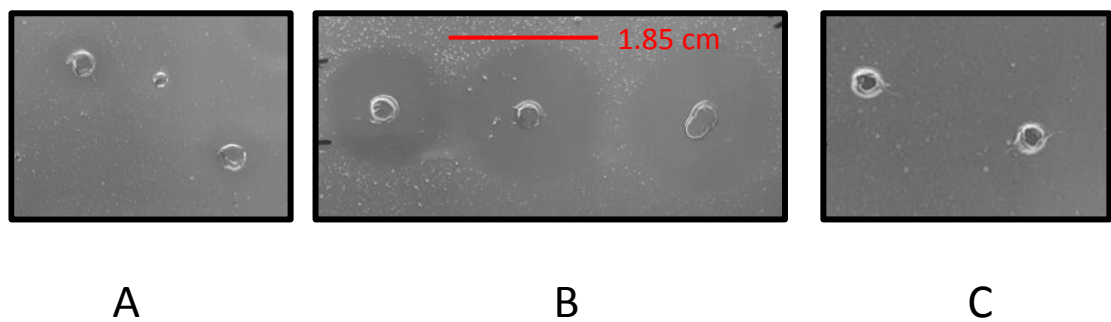


Fig. 12 Evaluación de la actividad anti-*H. pylori* de las fracciones separadas según peso molecular nominal. Se depositó en total 5 μ g de la fracción peptídica diluida en los 4 μ l colocados en cada pozo. Tamaño del halo de inhibición (A) Fracción >10kDa=0.7cm, (B) Fracción 3-10kDa=1.85cm, (C) Fracción <3kDa= No se observó halo de inhibición

8.2.3 Análisis mediante UHPLC-espectrometría de masa de la composición y la diversidad estructural del peptidoma de la hemolinfa estimulada (Fracción <10kDa)

La espectrometría de masa es una técnica analítica bastante poderosa para determinar la masa molecular exacta de péptidos/proteínas (86).

Una vez comprobada la actividad anti-*Helicobacter pylori* de la hemolinfa se procedió a hacer el análisis del peptidoma (para el presente trabajo se consideran todos aquellos péptidos <10kDa) para conocer el número y peso estimado de los péptidos que lo componen, así como el grado de dificultad de su purificación, y tener una idea global de las características estructurales y fisicoquímicas de dichos péptidos. La fracción con peso molecular nominal <10kDa, fue separada mediante cromatografía líquida de alta performance (HPLC) y analizada en línea con un espectrómetro de masas del tipo de ionización por “*electrospray*” en modo positivo, para pulverizar el analito y cargar positivamente los iones, éste iba acoplado a un analizador de masas tipo trampa de iones LCQ Advantage Mass Spectrometer (Thermo Scientific™). Con este equipo se logró identificar 26 péptidos multicargados que abarcaban un amplio rango de pesos moleculares (PM=1.5-7.2 kDa), todos por debajo de los 10 kDa. Sin embargo, más del 60% de los péptidos encontrados poseían una masa alrededor de 4kDa. Los péptidos con éste tamaño se estima que están compuestos por 36 residuos de aminoácidos, considerando que el peso promedio de un aminoácido es 110 Da (URL: <http://www.genscript.com/conversion.html>) (87). La mayor parte de estos péptidos eran policatiónicos y poseían 3 cargas positivas y en menor proporción entre 4 - 6. La proporción esperada es de una carga positiva por cada 1000 daltones (88).

El hecho de encontrar varios péptidos policatiónicos en el espectro electrospray refleja la alta proporción de sitios básicos en la molécula, susceptibles de ser protonados a bajo pH.

En la TABLA N° 4 se muestra un listado de los 26 péptidos identificados, por este sistema de MS de tipo trampa de iones, que componen el peptidoma de la hemolinfa de *H. illucens*.

Se hizo una aproximación a la diversidad estructural de los péptidos policatiónicos detectados y a la probable familia a la que pertenecen, mediante el análisis de la presencia de enlaces disulfuro. Estos son en parte los responsables de formar estructuras secundarias características que favorecen la acción de los AMPs, y juegan un rol crucial en favorecer la especificidad por su target (89), algunos autores refieren que los péptidos lineales sin una estructura aparente en solución se pueden plegar en una hélice anfipática luego de unirse a la membrana blanco (90).

Para identificar la presencia de enlaces disulfuro se hicieron ensayos de reducción y alquilación de la fracción <10kDa. Se incubaron los péptidos con ditioneitol (DTT) y ácido iodoacético, aquellos péptidos que poseen el derivado de cisteína *S*-carboximetil sufrieron un incremento en su masa (Fig, 13). Teóricamente, por cada puente disulfuro presente se debió apreciar un incremento de masa de 116 Da (58 Da por cada residuo de cisteína), esto es detectable en el espectro y por tanto es posible identificar péptidos con este tipo de enlaces.

| TABLA N° 4 Listado de moléculas que componen el peptidoma activo de la hemolinfa estimulada de <i>Hermetia illucens</i> identificadas por LC-ESI-IT | | | | | | | | | | |
|---|--------------------------|-----------------------|-----------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| HPLC | | Espectrómetro de Masa | | | | | | | | |
| Abundancia Relativa (%) | Tiempo de Retención (RT) | PM (Da) | Número de cargas (=z) | | | | | | | |
| | | | 8 | 7 | 6 | 5 | 4 | 3 | 2 | 1 |
| 25.22 | 23.33 ⁽¹⁾ | 4177 | | | 697.20 | 836.44 | 1045.30 | 1393.40 | | |
| 11.79 | 13 ⁽²⁾ | 4529 | | 647.97 | 755.80 | 906.75 | 1133.19 | 1510.59 | | |
| 11.19 | 26.54 | 4170 | | | 696.08 | 835.09 | 1043.61 | 1391.15 | | |
| 5.96 | 27.08 | 4181 | | | 697.83 | 837.20 | 1046.25 | 1394.67 | | |
| 5.91 | 14.22 ⁽³⁾ | 4471 | | 639.73 | 746.18 | 895.22 | 1118.77 | 1491.36 | | |
| 5.05 | 13.8 | 4316 | 540.49 | 617.56 | 720.32 | 864.19 | 1079.99 | 1439.65 | | |
| 4.32 | 13.68 | 4333 | | 619.97 | 723.13 | 867.56 | 1084.20 | 1445.26 | | |
| 4.08 | 27.08 ⁽⁴⁾ | 4199 | | | 700.77 | 840.72 | 1050.65 | 1400.53 | | |
| 3.93 | 27.35 | 4103 | | 587.09 | 684.78 | 821.53 | 1026.66 | 1368.55 | | |
| 3.67 | 25.46 | 4157 | | | 693.77 | 832.33 | 1040.16 | 1386.55 | | |
| 3.30 | 27.35 | 7153 | | 1022.91 | 1193.23 | 1431.68 | 1789.35 | | | |
| 2.96 | 14.02 ⁽⁵⁾ | 5911 | 739.85 | 845.40 | 986.14 | 1183.16 | 1478.71 | | | |
| 1.98 | 25.26 | 4442 | | 635.52 | 741.28 | 889.33 | 1111.41 | 1481.55 | | |
| 1.81 | 18.62 | 4415 | | | 736.80 | 883.96 | 1104.70 | 1472.59 | | |
| 1.80 | 18.62 | 5764 | | 824.41 | 961.65 | 1153.78 | 1441.97 | 1922.29 | | |
| 1.64 | 19.98 | 3949 | | | 659.19 | 790.83 | 988.29 | 1317.39 | 1975.58 | |
| 1.35 | 23.04 | 4692 | | 671.22 | 782.92 | 939.30 | 1173.88 | 1564.84 | | |
| 0.87 | 19.28 | 4480 | | | 747.74 | 897.09 | 1121.11 | 1494.48 | | |
| 0.64 | 20.87 | 5946 | | 850.36 | 991.92 | 1190.10 | 1487.38 | 1982.84 | | |
| 0.57 | 17.24 | 2599 | | | | | | 867.39 | 1300.58 | |
| 0.49 | 11.55 | 1519 | | | | | | 507.18 | 760.27 | 1519.54 |
| 0.45 | 21.26 | 1507 | | | | | | 503.27 | 754.40 | |
| 0.42 | 16.97 | 2826 | | | | | 707.60 | 943.13 | 1414.20 | |
| 0.38 | 24.91 | 4603 | | | 768.16 | 921.59 | 1151.73 | 1535.31 | | |
| 0.21 | 16.78 | 1448 | | | | | | 483.53 | 724.80 | 1448.60 |
| 0.00 | 20.12 | 2962 | | | | | | 988.38 | 1482.07 | |

Se resalta en verde los péptidos identificados con presencia de puentes SS. Modificaciones en el T_R post reducción/alquilación: T_R

(1) 24.18 min, 2-3 puentes SS; (2) 17.75 min, (3) 21.12 min, (4) 24.18 min, (5) 16.24 min, 2-3 puentes SS.

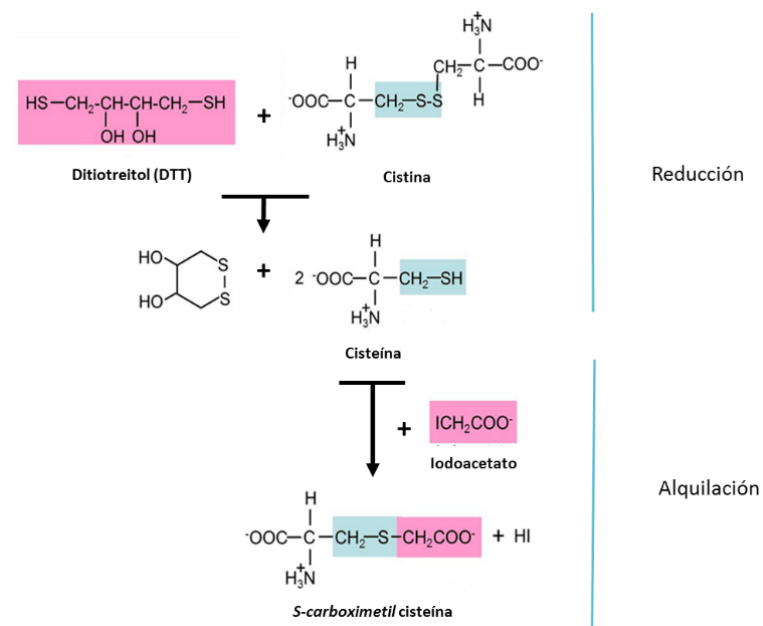


Fig. 13 Esquema de Reducción y alquilación de puentes disulfuro con ditiotreitolo y iodoacetato, respectivamente. Formación de *S-carboximetil cisteína*

La comparación de los cromatogramas y los espectros de masa de las muestras luego de la reducción reveló lo siguiente: De los 26 péptidos identificados, 12 fueron confirmados como péptidos lineales policatiónicos, 5 péptidos, entre ellos los de mayor abundancia en la muestra, presentaron uno o varios puentes disulfuro. No se pudo determinar con exactitud la cantidad de enlaces S-S presentes debido a la baja precisión del analizador de masa empleado. Por otro lado, se perdió la señal correspondiente a 9 péptidos, ello podría deberse a que se encuentran en pequeñas cantidades en la muestra, o en el caso que fuesen péptidos con estructura dimérica la ruptura de los enlaces disulfuro puede haber provocado la separación de ambos monómeros. A su vez, el mismo proceso de reducción pudo haber provocado otras modificaciones estructurales no conocidas (Ejm. Pérdida de glicosilaciones).

En la figura 14 se muestra un mapa del peptidoma analizado, relacionando la masa estimada de los péptidos y el grado relativo de hidrofobicidad según el orden de elución (tiempo de retención) a través de la columna cromatográfica. La mayor parte de los péptidos eluyen entre 20-30% ACN (1% (v/v) AF), indicando un grado de hidrofobicidad moderado, ello quizá responda a las características anfipáticas de los AMPs.

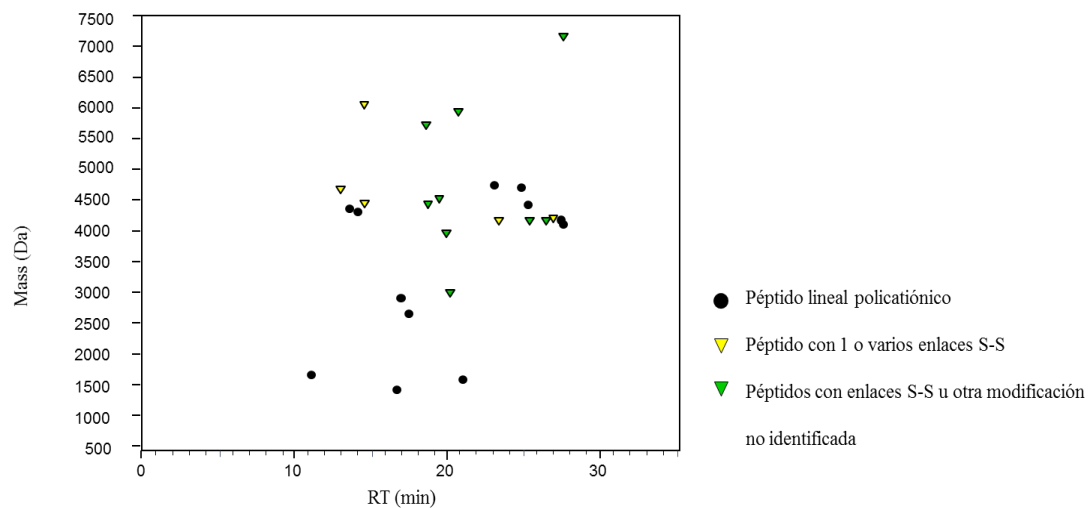


Fig. 14. Peptidoma de la fracción activa de hemolinfa pre-estimulada. La mayor parte de péptidos pesan 4kDa y eluyen entre los 13 y 29 minutos. No se observa relación entre el orden de elución y la característica estructural tras los ensayos de reducción

Resumiendo, el peptidoma de la hemolinfa estimulada y activa contra *Helicobacter pylori* posee una moderada complejidad. Se detectaron 26 péptidos policatiónicos bajo el sistema de espectrometría de masa por trampa de iones, los más abundantes poseen un peso molecular entre 4-5kDa, algunos de ellos presentan cisteínas en su secuencia para la formación de puentes disulfuro.

Para obtener resultados de mayor resolución y con valores de masa más exactos se repitió el análisis utilizando un cromatógrafo líquido de ultra alto rendimiento (UHPLC) acoplado a un espectrómetro de masa con analizador de Tiempo de Vuelo Cuadrupolo Qtof (Xevo G2-XS Qtof Waters®).

8.2.4 Análisis de la fracción 3-10kDa por UPLC-ESI-MSqTOF

El analizador de masa de tipo tiempo de vuelo (TOF) acoplado a un cuadrupolo (qTOF) permite determinar la masa molecular de los péptidos con mayor sensibilidad y exactitud que el analizador de masa tipo trampa de iones (IT), por lo que fue de interés complementar y corroborar los datos previos.

La fracción 3-10kDa fue separada por una columna Acquity UPLC BEH C18 y se hizo el recuento de iones totales conforme estos iban atravesando el detector de masa (modo TIC, Ver Fig.15). Las señales de los iones detectados fueron restadas de las del blanco metodológico. En éste último se encontraron señales características de iones de polímeros de plástico propios de los envases en los que eran almacenadas las muestras. Estas no fueron tomadas en cuenta al momento del análisis. También se verificó la presencia de los iones m/z de interés en cada una de las dos muestras.

Con éste equipo se detectó 86 péptidos multicarga, pero muchos de ellos en cantidades mínimas, por lo que el análisis se enfocó en los 35 péptidos policationicos más abundantes (intensidad del pico: 1475-602764, TABLA 5), casi la mitad de ellos posee un peso molecular de 4kDa aproximadamente. La masa molecular de los péptidos fue determinada analizando la distribución isotópica y deconvolucionando de manera manual el espectro masa/carga (m/z) de cada péptido. Al visualizar la distribución isotópica del ion se puede deducir el número de cargas (z) que posee calculando el inverso de la diferencia entre dos picos consecutivos. Con este valor (z) se puede aplicar la formula $m/z=[M+z(1.0079)]/z$ donde M es la masa del péptido y la masa del protón 1.0079Da. Ejm. Péptido más abundante con $m/z=836.4$, carga $z=5$, tiene un peso molecular de 4177Da (Fig. 15 B, C, D). De los 35 péptidos policationicos identificados, la mitad coinciden con los hallados previamente con el espectrómetro de masa tipo trampa de iones, los restantes solamente pudieron ser detectados gracias a la sensibilidad de este equipo.

Los péptidos pueden tener iones aductos asociados, aparte de los iones hidrógeno, sin embargo éstos no se observaron. Los aductos son los productos formados por la adición directa de dos o más moléculas distintas. Encontrar moléculas de sodio asociadas es frecuente ya que estos son contaminantes frecuentes de los solventes. Por ejemplo, un péptido con $M=100$, un aducto de hidrógeno $[M+H]^+$ tendría una m/z de 101, mientras que la misma molécula con sodio asociado $[M+Na]^+$ tendría una m/z de 123, por tanto la diferencia entre señales sería de 22. No se halló correspondencia con estos valores de pérdida entre señales. Se cree que la formación de éstos aductos es ineficiente a las diluciones de las muestras trabajadas.

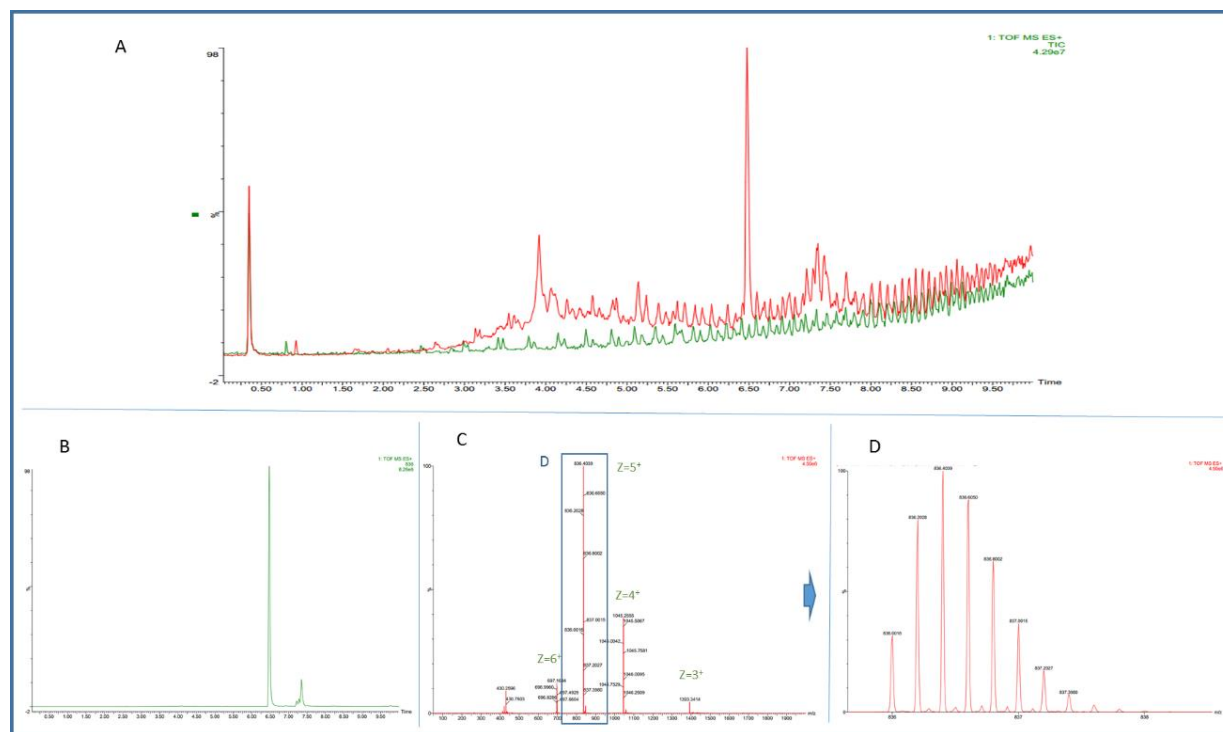


Fig. 15 Análisis de la fracción 3-10kDa por ESI-MSqTOF. A. Recuento Total de Iones (*modo TIC*) fracción 3-10kDa (rojo), TIC blanco metodológico (verde). Visualización del pico/péptido más abundante en el cromatograma: B. Pico (péptido) en el cromatograma con Tiempo de retención (T_R) 6.57min, *modo Monitoreo de ión seleccionado* (SIM, por sus siglas en inglés). C. Espectro de masa del péptido seleccionado ($T_R=6.57$ min), se observa el péptido con múltiples cargas ($Z=3, 4, 5, 6 H^+$). D. Distribución isotópica del ión principal $m/z=836.4$, $z=5$

| TABLA N° 5 Péptidos Mayoritarios en el pool 3-10kDa identificados por UPLC-ESImsQtof | | | | | | | | |
|--|--|-----------------------------|-----------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| HPLC | | Espectrómetro de Masa (m/z) | | | | | | |
| Abundancia Relativa (%) | Tiempo de Retención T _R (min) | PM (Da) * | Número de cargas (=z) | | | | | 2 |
| | | | 7 | 6 | 5 | 4 | 3 | |
| 40.6 | 6.572 | 4177.0 | | 697.16 | 836.40 | 1045.26 | 1393.34 | |
| 14.1 | 3.868 | 4316.3 | | 720.39 | 864.26 | 1080.09 | | |
| 5.2 | 3.822 | 4332.3 | | 723.05 | 867.46 | 1084.09 | | |
| 4.7 | 7.469 | 4170.0 | | | 835.00 | 1043.76 | 1391.02 | |
| 3.8 | 7.567 | 4199.0 | | | 840.81 | 1051.01 | | |
| 3.7 | 4.033 | 4528.3 | | 755.72 | 906.67 | 1133.35 | | |
| 3.4 | 7.83 | 3282.6 | | | | 821.65 | | |
| 3.0 | 7.418 | 4198.0 | | | 840.61 | 1050.52 | | |
| 3.0 | 5.177 | 4415.0 | | 736.99 | 883.99 | 1105.00 | 1472.66 | |
| 2.2 | 7.55 | 4180.0 | | 697.82 | 837.00 | 1046.00 | 1394.34 | |
| 1.8 | 4.817 | 2826.5 | | | | | 943.16 | |
| 1.6 | 3.735 | 5910.8 | 845.40 | 986.1398 | | | | |
| 1.4 | 5.437 | 5763.8 | | 961.64 | | | | |
| 1.2 | 7.086 | 4156.0 | | 693.66 | 832.20 | 1040.01 | 1386.35 | |
| 1.1 | 4.485 | 4471.3 | | | 895.26 | | | |
| 1.0 | 5.629 | 4491.1 | | | 899.21 | 1123.77 | | |
| 0.9 | 4.599 | 6276.0 | | 1047.00 | | | | |
| 0.8 | 7.784 | 7153.4 | 1022.91 | 1193.24 | 1431.69 | | | |
| 0.7 | 7.635 | 4119.3 | | | 824.85 | 1030.82 | | |
| 0.6 | 7.801 | 7153.4 | 1022.91 | 1193.24 | 1431.69 | | | |
| 0.6 | 4.817 | 2599.4 | | | | | 867.44 | 1300.68 |
| 0.6 | 3.273 | 2277.2 | | | | 570.29 | | |
| 0.5 | 4.128 | 2332.2 | | | | | | 1167.09 |
| 0.5 | 7.332 | 4442.5 | | 741.40 | 889.49 | 1111.61 | | |
| 0.5 | 4.365 | 3011.5 | | | | | 1004.82 | |
| 0.4 | 6.406 | 2481.2 | | | | | 828.05 | |
| 0.4 | 8.544 | 3961.9 | | | 793.3799 | 991.4832 | 1321.6465 | |
| 0.4 | 5.977 | 5944.9 | | | 1189.9857 | | | |
| 0.3 | 7.252 | 4006.2 | | | 802.2329 | 1002.5516 | | |
| 0.3 | 5.709 | 7108.7 | | 1185.7858 | | | | |
| 0.2 | 4.059 | 2429.2 | | | | | | 1215.618 |
| 0.2 | 3.49 | 2767.4 | | | | | 923.4615 | |
| 0.2 | 3.719 | 3028.5 | | | | | 1010.4991 | |
| 0.1 | 5.343 | 3884.9 | | | | | 1295.9813 | |
| 0.1 | 4.365 | 2316.2 | | | | | | 1159.0941 |

*Péptidos con fondo verde, previamente identificados por LC-MS-TI (tipo trampa de iones)

8.2.5 Análisis de la pureza y complejidad de la fracción activa (3-10kDa) por electroforesis de una y doble dimensión

8.2.5.1 Electroforesis 1D: SDS-PAGE y Tricina-SDS-PAGE

Con el objetivo de analizar de manera cualitativa la pureza y complejidad de la fracción compuesta por los péptidos activos de 3 a 10kDa se corrió dichas fracciones en geles de poliacrilamida al 15% bajo condiciones denaturantes (*Laemmli* SDS-PAGE). Tras revelar los geles con tinción de Azul de Coomassie se pudo observar la aparición de dos bandas gruesas y difusas, de aproximadamente 8 y 10 kDa (Fig. 16A). Para aumentar la resolución de dichas bandas se modificaron condiciones como la concentración de las muestras, los tiempos de corrida y porcentajes del gel, sin embargo no se obtuvieron resultados óptimos. Se vio por conveniente emplear un protocolo alternativo, el Tricina-SDS-PAGE, reemplazando el ión de arrastre glicina por iones de tricina para resolver proteínas y péptidos pequeños en el rango de 5 a 20kDa (*modificado de Schagger (81)*).

En el sistema empleando tricina en el buffer catódico (Fig. 16B) se obtuvieron bandas más delgadas y definidas con pesos aproximados de 12, 10 y 8 kDa. Con éste último método se pudo separar en dos la aparente banda gruesa de 10kDa observada en la metodología tradicional. No se observó bandas por encima de los 10kDa, verificando la eficacia de los filtros Amicon NMWL 3 y 10kDa. Con el fin de cerciorarse sobre el contenido de las bandas resueltas se trabajó a su vez una separación por electroforesis 2D empleando la misma muestra; se detalla a continuación.

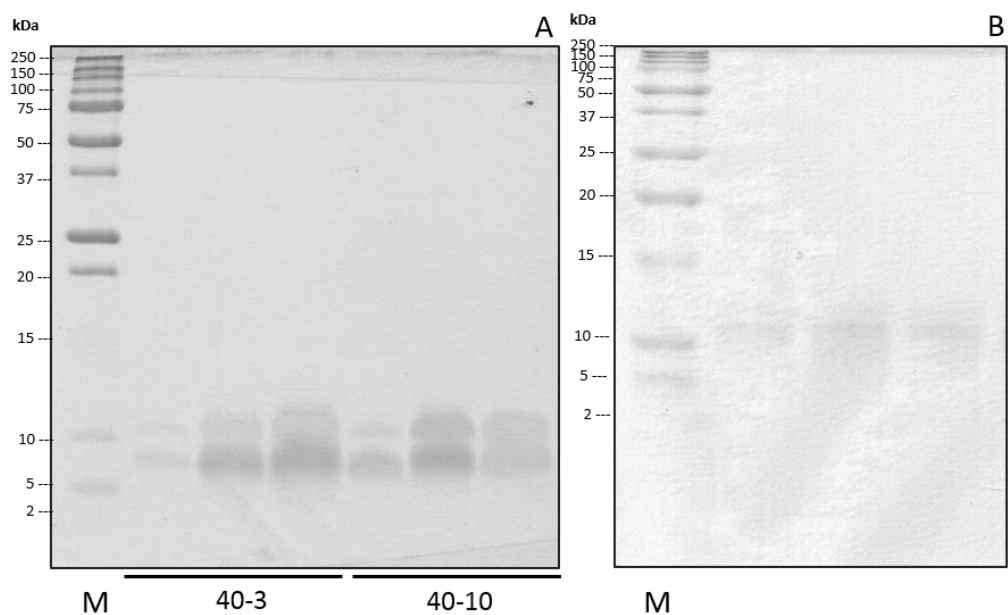


Fig. 16 Patrón de péptidos en geles de poliacrilamida-SDS presentes en las fracciones purificadas con filtros de 3-10 kDa. **A.** Laemmli SDS-PAGE 15% a 200V por 90 min, fracción filtro 3-10kDa del lote de extracción 3 (40-3, carril 1: 0.74 μg , carril 2: 1.48 μg , carril 3: 2.22 μg) y lote de extracción 10 (40-10, carril 4: 0.44 μg , carril 5: 0.88 μg , carril 6: 1.32 μg). **B.** Tricina SDS-PAGE (modificado) al 15% a 180V por 50 min. Fracción 3-10kDa (carril 1: 0.33 μg , carril 2: 0.4 μg , carril 3: 1.25 μg).

8.2.5.2 Electroforesis 2D: 2D-SDS-PAGE

Para la electroforesis bidimensional se agregó 100 µg (kit) de péptidos de la subfracción 3-10kDa (proveniente de varios ensayos de extracción de hemolinfa). La muestra fue rehidratada por 12 h, sometida a isoelectroenfoque por 15 h y corrida en la segunda dimensión por 8 h.

Los geles fueron teñidos con nitrato de plata, dada su sensibilidad de detección 100 veces mayor respecto a la tinción tradicional con Azul de Coomassie (81). Se visualizaron 23 manchas o “spots” (en contraste a los 35 reportados en como más abundantes en el espectrómetro de masa qTOF) de péptidos comprendidos en su mayoría en un rango de punto isoeléctrico de 5 a 8, relativamente neutro, y con pesos moleculares estimados entre 5 y 15 kDa. Se comprobó que las dos bandas visualizadas en el gel de una dimensión en realidad representaban a más de un péptido con pesos moleculares muy similares. El estrecho rango vertical en el que se ubican las manchas da cuenta de los pesos moleculares muy similares de los péptidos purificados hasta esta etapa.

Hasta este punto de la investigación se tuvo información de la complejidad de la fracción activa 3-10kDa, los pesos moleculares aproximados de los péptidos candidatos que la componen (aprox. 4 kDa), su punto isoeléctrico (pI 5-8), su carga relativa (péptidos policationicos), la presencia de puentes disulfuro y su grado de actividad frente a *H. pylori*.

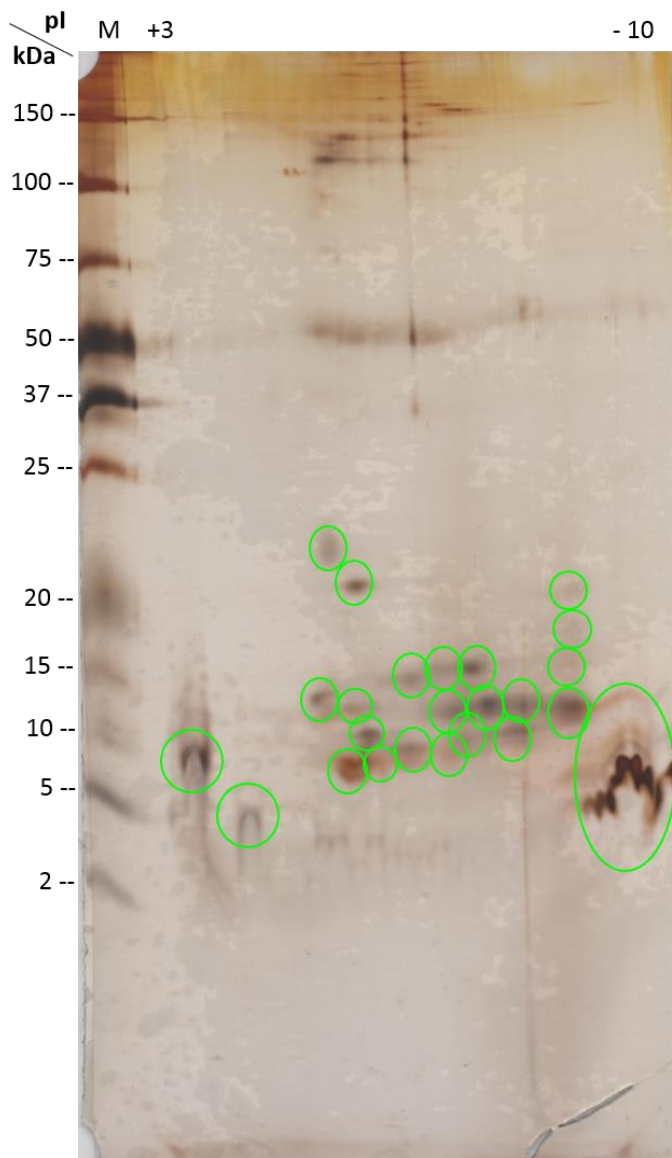


Fig. 17 Gel 2D-SDS-PAGE.- Patrón de distribución en doble dimensión de péptidos en el pool purificado con filtros 3-10kDa. IEF Strip IPG 11 cm Pi 3-10. SDS-PAGE al 15%, 9h 19min, 14 Ma, teñido con nitrato de plata

Además de conocer la complejidad de la fracción empleando geles de doble dimensión se contempló la idea (y se hizo algunos ensayos preliminares) de hacer la selección del péptido activo mediante ensayos biológicos de superposición directa de la banda sobre una placa de agar sembrada con la cepa de *H. pylori* (91, 92), sin embargo éste ensayo no se pudo realizar con éxito puesto que la tinción con Nitrato de Plata no era compatible con los cultivos ni con los posteriores ensayos de espectrometría de masa para la identificación del péptido activo. Se hizo la prueba con Azul de Coomassie pero este tipo de tinción no permitió detectar las manchas de interés. Es difícil lograr una repetitibilidad exacta de la ubicación de las manchas entre geles 2D, por lo que utilizar un gel como guía para el aislamiento de las manchas en un gel sin teñir no fue posible.

8.2.6. Purificación de péptidos activos a partir del pool 3-10 kDa por cromatografía líquida de ultra alta eficiencia (UHPLC-UV)

Continuando con la purificación de la subfracción F 3-10kDa se inyectó a través de una columna Aeris™ Peptides XB-C18 de la marca Phenomenex® especialmente diseñada para la separación de péptidos de bajo peso molecular utilizando un equipo UltraHPLC Dionex Ultimate 3000 (Thermo Scientific®) acoplado a un detector UV a 215 nm.

8.2.6.1 Purificación de la fracción 3-10kDa e identificación de la fracción activa

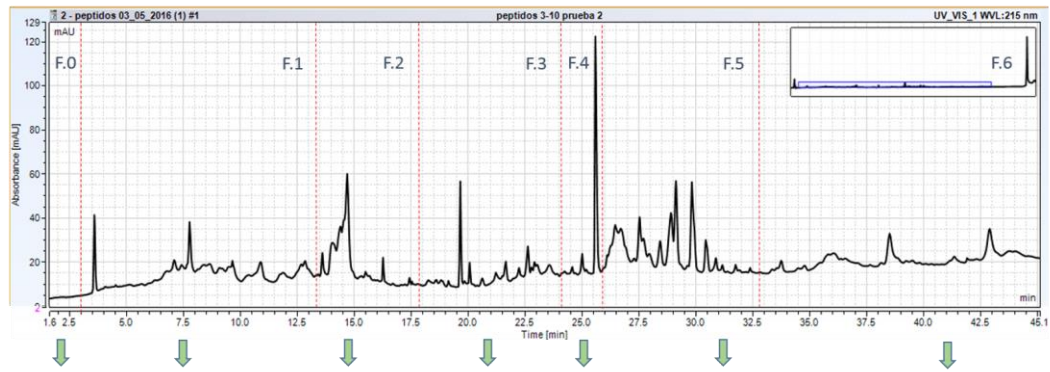
En esta primera etapa de separación de la subfracción 3-10kDa se identificó cerca de 24 señales. Las principales estuvieron adecuadamente resueltos mientras que los

que se encontraban en menor concentración se podría mejorar aún su separación, pero primero se debía ubicar en qué segmento del cromatograma se encontraba la actividad anti-*H. pylori* (Fig 18). Se vio por conveniente separar esta subfracción en 7 subfracciones gruesas llamadas de F.0 a F.6. Se definió los tiempos de elución y se fueron colectando conforme iban eluyendo del detector.

En modo analítico, este cromatograma UV compartía un patrón similar al diagrama de iones totales (TIC) obtenido por el espectrometro de masa qTOF (Fig. 15a), habiendo 8 picos principales que poseen enlaces peptídicos (Abs UV 215 nm) y que a su vez son ionizables. Por ejemplo, el pico mayoritario que es detectado por UV a los 25.8 min, eluye a los 6.5 min en el UHPLC acoplado al espectrómetro de masa y posee una masa de 4.17 kDa. Las demás señales observadas en el TIC, y que no están presentes en el cromatograma UV, son otras moléculas o contaminantes con capacidad de ionizarse.

Las 7 subfracciones F.0 a F.6 fueron colectadas por separado conforme eluían, fueron concentradas progresivamente y liofilizadas, procurando perder la menor cantidad de muestra en este proceso. Una vez concentradas en un microtubo de 1.5 ml, y resuspendidas en un volumen máximo aproximado de 200µl, fueron llevadas a bioensayo. Para éste último se midió la cantidad de proteínas tanto por kit (Non-Interfering Protein Assay™ Calbiochem®) como por absorbancia a la longitud de onda de 215 nm para cada fracción. Tras varias repeticiones de medición, se halló la correspondencia de 1µg/µl leído por kit equivale a 7µg/µl leído bajo el espectro UV a 215 nm (Nanodrop 2000c). Los ensayos biológicos se hicieron en base a los valores de concentración por kit.

Cromatograma Fracción 3-10kDa (a 215 nm)



Ensayo biológico Anti-*H. pylori* III: Zona de Inhibición

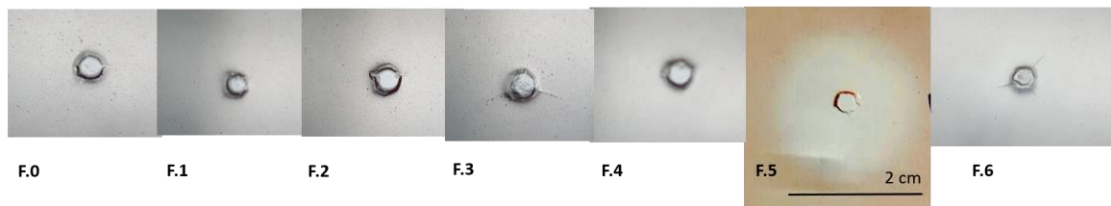


Fig. 18 Separación del pool concentrado de péptidos de 3-10 kDa e identificación de la fracción activa anti-*H. pylori*. Se colectaron 7 fracciones, cada una de las cuales fue evaluada por ensayo de zona de inhibición añadiendo 2.5 μ g de péptidos por pozo. Se halló la fracción F.5 como la de mayor actividad antimicrobiana

Se aplicó el ensayo por Zona de Inhibición para definir la fracción activa, en el pozo de agar sembrado con *H. pylori*, se depositó 2.5 µg de péptidos por cada subfracción (F.0 – F.6). Tras el periodo de incubación, la fracción F.5 presentó la mayor actividad generando un halo de inhibición de 2cm de diámetro. También se tuvo la precaución de verificar la no inhibición del crecimiento por parte de la fase móvil empleada (0.1% TFA/H₂O, 0.1%TFA/ACN) en caso haya remanentes en las fracciones concentradas.

Verificando el cromatograma UHPLC la fracción F.5 estaba compuesta por 6 picos señal, distinguibles pero que requerían resolverse mejor. Es por ello que se optó por disminuir la pendiente de la gradiente de solventes en ese rango de tiempos de retención ($T_R = 25-33$ min) y aislar nuevas subfracciones a través de ésta separación, denominadas F 5.1 a F 5.9.

8.2.6.1.1 Comparación de la fracción activa 3-10kDa procedente de hemolinfa estimulada y sin estimular

Debido a los resultados de baja actividad anti *H. pylori* en la fracción 40%ACN/0.05%TFA procedente de hemolinfa sin estimular, se tuvo interés en seguir con la purificación de la misma y analizar la subfracción 3-10kDa en el UHPLC. Se inyectó 2.2 µg tanto de la fracción 3-10kDa estimulada como de su par sin estimular. A simple vista se observó que la mayoría de picos principales están presentes en ambas muestras (Fig. 19). Se obtuvo el mismo resultado al comparar los diagramas TIC del análisis por ESI-MSqTOF para cada muestra. La diferencia radica en la proporción en la que éstos péptidos están presentes. Se ha constatado

una buena repetitibilidad entre inyecciones de una misma muestra, en referencia a la presencia de señales como a la abundancia de las mismas. Al analizar las variaciones específicamente en el rango de la fracción 5 activa, se observó de igual manera una variabilidad en la abundancia de los picos.

La fracción procedente de hemolinfa sin estimular parece contener la misma gama de péptidos pero en diferente proporción. No hubo ausencia de un pico específico en la fracción procedente de hemolinfa sin estimular, que sí estuviera presente en la fracción estimulada.

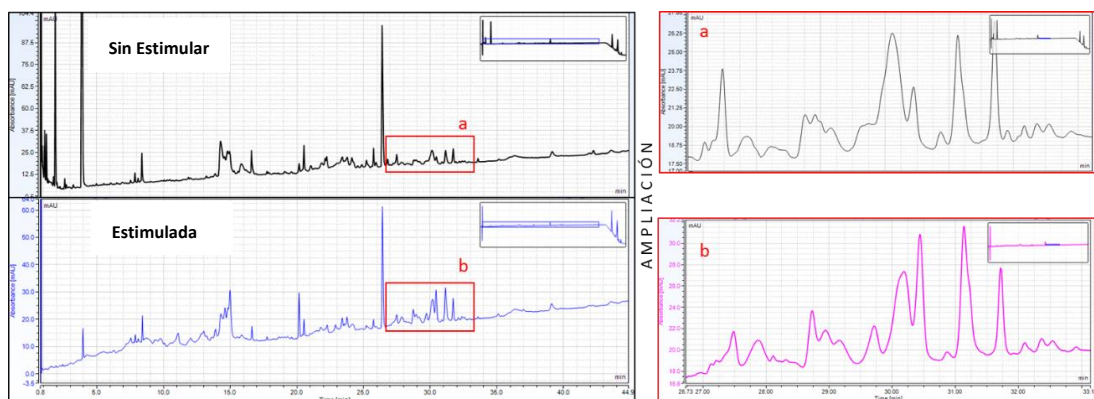


Fig. 19 Comparación cromatograma UHPLC de fracción peptídica 3-10kDa de hemolinfa sin estimular y estimulada. Izq. Superior se observa el cromatograma de la fracción 3-10kDa a partir de la hemolinfa sin inocular, (a) Ampliación fracción 5, hemolinfa sin inocular. Izq. Inferior cromatograma fracción 3-10kDa de hemolinfa inocularada. (b) Ampliación fracción 5, hemolinfa inocularada

Una vez se tenga el péptido activo identificado y se conozca la secuencia codificante se podría medir y comparar la expresión de estos genes a nivel de RNAm para ambos escenarios: hemolinfa inoculada y sin inocular.

8.2.6.2 Purificación de la fracción activa N° 5 por UHPLC

Para esta segunda ronda de separación de la fracción F.5 activa se modificó las condiciones cromatográficas a 25 - 40% ACN (0.05% TFA/H₂O) en un intervalo de 35 minutos (Fig.20).

Con esta modificación en las condiciones de elución se logró obtener picos más definidos y con mejor resolución, con una distribución muy semejante a la observada antes en el pool. Hubo dos señales que no se lograron resolver por completo, presentes en la fracción 5.7 y 5.8. Puede que los péptidos que los componen posean secuencias muy similares. Otra posibilidad, que produce picos divididos en el cromatograma es el deterioro de la columna o la contaminación del guardacolumna. Las 9 fracciones separadas fueron inmediatamente concentradas, cuantificadas y enfrentadas en bioensayo. Ésta vez se depositó 0.63µg por pozo debido al bajo rendimiento de algunas de las subfracciones. Sin embargo, a ésta concentración se logró visualizar un halo de inhibición en la fracción 5.8, una de aquellas que presentaba los picos de mayor abundancia, aunque divididos. El análisis de ésta fracción con el espectrómetro de masa permitirá discernir la composición de ésta fracción con mucha mayor sensibilidad que empleando el detector UV.

Cromatograma UHPLC Fracción F. 5 (Abs UV 215 nm)

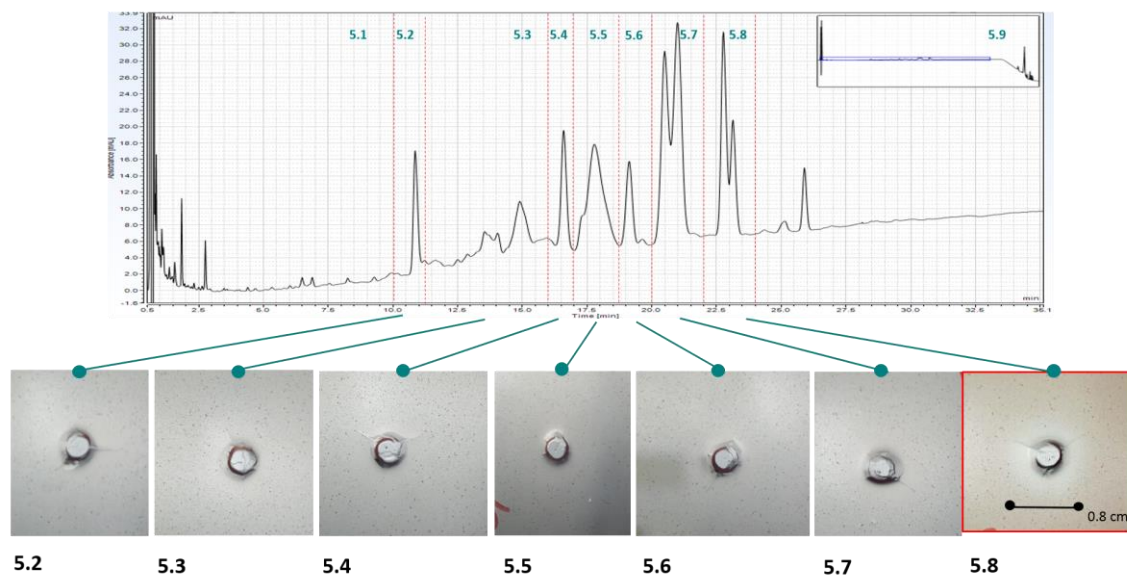


Fig. 20 Purificación de la fracción F. 5 e identificación de la subfracción activa (F 5.1 - F. 5.9). Condiciones empleadas en el UHPLC de 25 a 40% ACN (0.05% TFA/H₂O) por 35 minutos. Del mismo modo se utilizó Ensayo de Zona de Inhibición, a 0.63µg/pozo de cada fracción cuantificada por Kit

8.2.6.3 Análisis por ESI-MSQToF de la fracción activa N° 5.8

Conforme al análisis en el espectro de masa qTOF, la fracción 5.8 contaba con un solo pico de naturaleza peptídica, pero éste, a su vez, estaba compuesto por 4 péptidos en distintas abundancias que eluían con tiempos de retención muy similares, aproximadamente a los 3.25 minutos. Los demás picos observados en el cromatograma de recuento total de iones TIC presentaron una distribución isotópica característica de polímeros, sospechosos de ser contaminantes de la muestra, provenientes de los mismos contenedores.

El péptido más abundante (Péptido 1), poseía una masa de 4.179 kDa y era capaz de ionizarse de 4 formas distintas. El segundo péptido más abundante (péptido 2) presentó 4 y 5 protones cargados con un peso de 4.198 kDa. Estos dos fueron los péptidos mayoritarios y muy probablemente los que se apreciaron en el cromatograma UHPLC-UV como un pico partido. Por tanto se descarta que el pico dividido fuera a razón de inconvenientes en la columna.

La característica de elución de éstos dos péptidos fue muy similar, siendo muy difícil de ser purificados/separados bajo las condiciones cromatográficas empleadas. En proporciones mucho menores se logró detectar el péptido 3 y 4, de 4.23 y 4.25kDa, respectivamente. En la figura 21, se observa el recuento de iones totales de la fracción y se señala la abundancia de cada uno de los péptidos que constituyen el pico compartido.

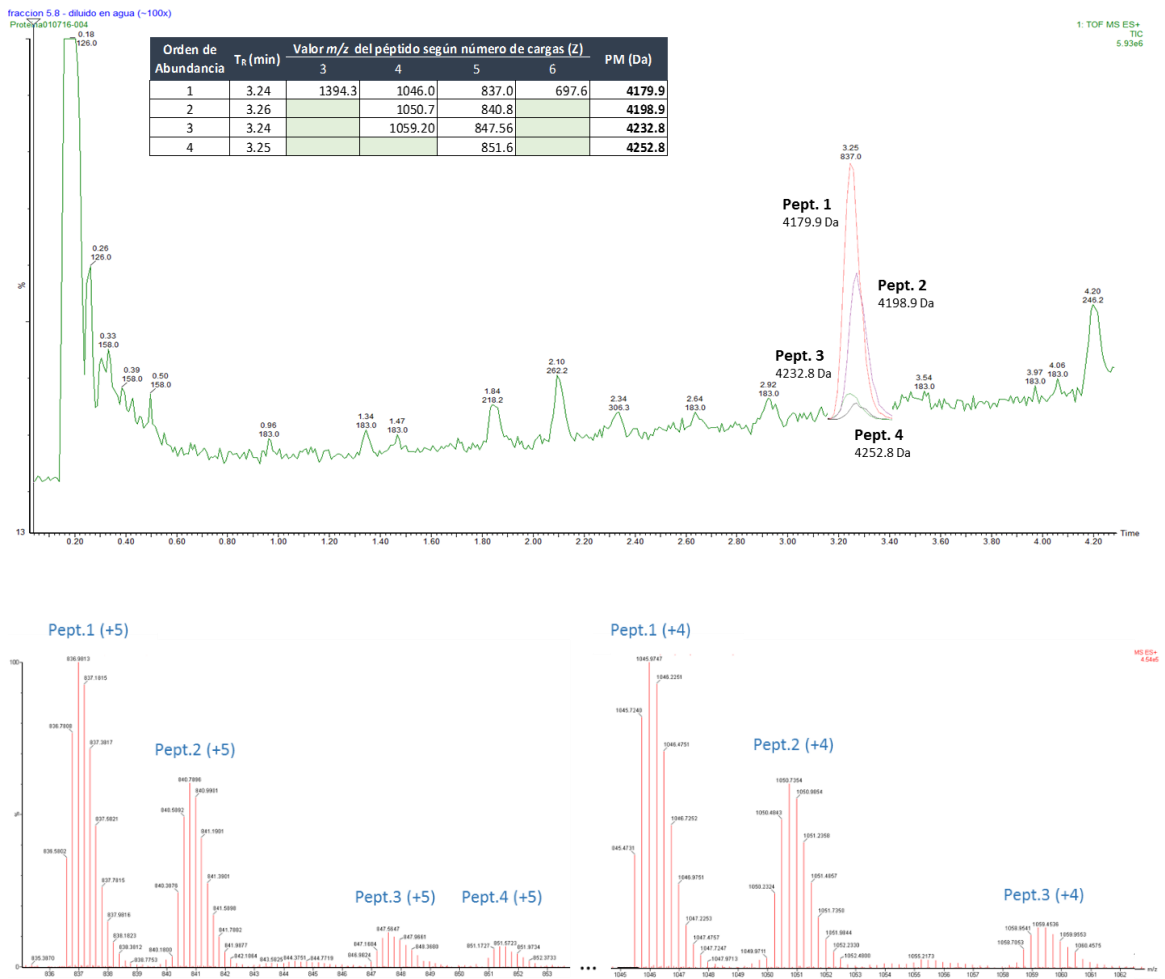


Fig. 21 Análisis por ESI-MSqTOF de la fracción activa 5.8. Superior: Diagrama de Recuento Total de iones TIC de la fracción, 3.2-3.4 minutos eluyen los péptidos activos candidatos. Inferior: Espectro de masa ESI-qTOF de los péptidos candidatos con carga +4 y +5, Péptido 1 (4179.9Da), 2 (4198.9Da), 3 (4232.8Da), 4 (4252.8Da)

Durante el análisis se tuvo la precaución de evaluar las fracciones adyacentes a la fracción 5.8, es decir la F. 5.7 y F 5.9 para comprobar que no haya contaminación entre fracciones, sobre todo por parte de la fracción activa. Sin embargo, se pudo comprobar que los péptidos presentes en una de las fracciones no estaban presentes en otra, y viceversa. El método de separación fue óptimo.

8.2.7. LC-MS/MS e identificación de secuencias de péptidos activos en un espectrómetro de masa Orbitrap de alta resolución

La fracción activa F5.8 fue llevada a analizar es un espectrómetro de masa *LTQ Velos Orbitrap Pro* de alta sensibilidad, resolución y precisión de masa con el objetivo de lograr identificar la secuencia de los péptidos previamente detectados en el ESI-msQtof. Dada la alta sensibilidad del equipo, en el espectro de Conteo total de iones (TIC) se logró detectar péptidos entre 3-5 kDa que también formaban parte de ésta fracción activa, aparte de los previamente reportados, (Péptido 1, 2 ,3). **Fig 22A, B.** Sin embargo, se decidió volcar los esfuerzos hacia la identificación de éstos últimos.

Para realizar la identificación de péptidos/proteínas por espectrometría de masa se suele partir teniendo una base de datos, por lo general presente en el repositorio de la National Center for Biotechnology Information NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Un software especializado (Ejm. Mascot) logra crear una data de fragmentos MS/MS teórica de todos los posibles péptidos/proteínas candidatos reportados para el organismo de interés. Luego se compara la data MS/MS experimental con el espectro MS/MS teórico predicho. De

ésta forma el software es capaz de predecir las coincidencias y asignar un score de identificación de las proteínas resultantes.

Hasta el momento solo están reportadas las secuencias de los cromosomas sexuales de la Mosca Soldado Negra, *H. illucens*, ensamblados a nivel de *scaffolds* en el NCBI (ID. 38288), por tanto resultó imposible crear una base de datos requerida para dicha ruta de identificación. Se planteó como alternativa realizar una predicción de *novo*, sin embargo éste no produjo ninguna entrada válida puesto que habían demasiados fragmentos y la mayoría no correspondían a diferencias de aminoácidos.

En la **Fig 22C** se muestra el patrón de fragmentación para el Péptido 1. Se utilizó el método de fragmentación HCD (Higher energy collisional dissociation), este tipo de fragmentación permite una detección de iones de alta resolución para espectros MS/MS de mayor calidad. Se encontró tamaños de fragmentos que podrían representar iones imonio de ácido glutámico y fenilalanina y algunas pérdidas de aminoácidos como ácido aspártico, ácido glutámico y alanina. No obstante, no hubo nada concluyente respecto a la predicción de la secuencia. En ésta misma sección de la figura aparecen los espectros de fragmentación tanto para el Péptido 1 y 2, como se puede apreciar ambos presentaron un patrón muy similar, estos péptidos parecen estar relacionados y tener secuencias muy similares.

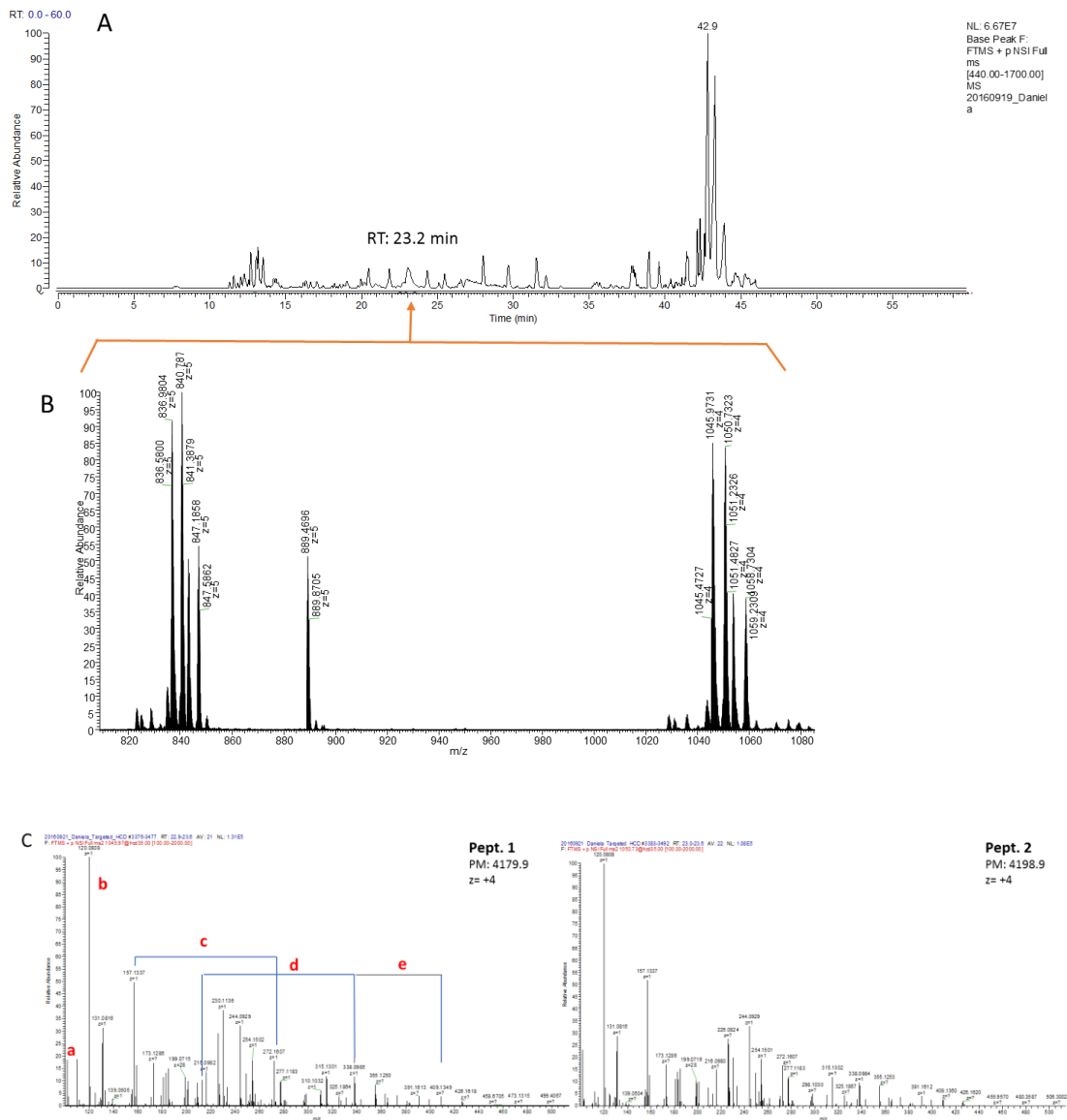


Fig. 22. Espectro nLC-MS/MS de la fracción activa F5.8 empleando un LTQ-Velos Orbitrap de alta resolución para el secuenciamiento parcial de péptidos.

A. Cromatograma TIC de la fracción F5.8. B. Se seleccionó el pico RT 23.2 min conteniendo los péptidos previamente identificados, se muestra el espectro MS de dichos péptidos. C. Espectro de fragmentación MS/MS de péptido 1 y péptido 2 (a. Ión Glu-imonio, b. Phe-imonio, c. Dif masa Asp, d. Dif. masa Glu, e. Dif. masa Ala)

Del mismo modo, se hicieron ensayos de reducción de la F 5.8 para observar la presencia de péptidos con enlaces disulfuro y cisteínas en su estructura primaria, sin embargo luego de la reducción no se observó ninguna modificación en la masa de los péptidos descartando así la presencia de éste tipo de péptidos activos contra *H. pylori*.

IX. DISCUSIÓN

Dhar y colaboradores, en el año 2003 (1) afirmaron que *Helicobacter pylori* es una de las bacterias patogénicas más exitosas de la historia, puesto que es capaz de colonizar a más de la mitad de la población humana. Son conocidas las implicancias de su patogenicidad y su estrecha relación con la aparición de adenocarcinoma gástrico (10, 93). La erradicación de éste microorganismo cura la infección y el desorden sintomatológico provocado, por lo que hay interés en evaluar terapias más efectivas. Además, los índices de resistencia se han incrementado para los antibióticos contemplados en la terapia triple, tales como claritromicina y levofloxacino (94).

Este conjunto de factores estimuló la búsqueda y el aislamiento de potenciales drogas alternativas, ben particular de péptidos antimicrobianos (AMPs) presentes de manera natural en los insectos. Se trabajó con un díptero, la Mosca Soldado Negra, *Hermetia illucens*, se purificó y se seleccionó las fracciones activas frente a un cultivo de *H. pylori* ATCC 43504. Se trabajó con éste díptero por su conocida capacidad de resistir a habitats hostiles con materia en descomposición y alta carga de microorganismos; se esperaba que ésta mosca tenga un alta capacidad de síntesis de péptidos antimicrobianos. Se sabe que estos AMPs no tienen acción contra un solo microorganismo en específico por lo que nació la inquietud de saber si se podía encontrar actividad contra este patógeno humano.

Solo ha habido dos autores que han hecho investigaciones previas sobre el potencial antimicrobiano que almacena ésta mosca. En el 2012, Choi *et al.* (95) halló actividad contra *Klebsiella pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Shigella sonnei* en

el extracto metanólico de las larvas, mientras que en el 2014 (63) logró identificar al ácido hexanodioico como responsable de ésta actividad. Park et al, han logrado profundizar más en el tema y en el 2015 (6) purificaron y caracterizaron el primer péptido antimicrobiano extraído de la hemolinfa de la Mosca Soldado Negra, el péptido similar a la defensina 4 ó DLP4 (Peso molecular: 4267 Da), con actividad antimicrobiana confirmada y con valores MIC contra bacterias Gram positivas, *S. aureus* KCCM 40881 (0.59-1.17 μM), *S. aureus* KCCM 12256 (1.17-2.34 μM), *S. epidermidis* (0.59-1.17 μM), *B. subtilis* (0.02-0.04 μM).

En el presente trabajo se encontró actividad contra la bacteria gram negativa *H. pylori* en la hemolinfa estimulada de la larva BSF. El peptidoma de la hemolinfa estaba compuesto por más de 80 péptidos de pequeño tamaño (4-7 kDa). A partir de este, se logró purificar 4 péptidos policatiónicos de alrededor de 4.2 kDa, a los que se les atribuye la actividad Anti-*H. pylori*.

En los insectos, la síntesis de péptidos antimicrobianos tiene lugar en el cuerpo graso (equivalente al hígado en vertebrados) y son liberados a la circulación en la hemolinfa (9, 96). Por esta razón y para evitar el margen de compuestos no activos durante el procedimiento de purificación, se separó este fluido del resto del contenido larvario, protegiendo a los péptidos de su degradación por enzimas proteolíticas (97),

Según estudios previos, los insectos deben recibir un estímulo previo a su sistema inmune para exacerbar la producción de péptidos antimicrobianos (41, 98). Una forma indirecta de visualizar este efecto fue comparando el espectro de absorción UV de la hemolinfa estimulada VS. la no estimulada. Se observó un incremento de

casi dos veces la absorción en el rango del enlace peptídico (214-216 nm) en la muestra de hemolinfa estimulada respecto a la que no recibió estímulo. Otra forma con la que se corroboró el incremento de la síntesis de AMPs fue con los bioensayos donde a diferencia de la hemolinfa estimulada, no se encontró actividad de las fracciones procedentes de hemolinfa sin estimular empleando la misma concentración. Por otro lado, este incremento en la síntesis tiene un costo en el desarrollo normal de la larva puesto que se encontró una disminución significativa en la tasa de crecimiento en comparación al grupo control sin estimular (expresado en ecología como un “*Trade-off*”), tras los días de incubación. Es esperable que las larvas inoculadas experimenten falta de apetito, o un desgaste metabólico por efecto de la infección generalizada que se le provoca. Estudios previos no ofrecen comentarios al respecto. Del mismo modo, hubo una tasa de mortalidad relativamente baja por parte del grupo de larvas estimuladas (tasa de mortalidad promedio, 10%). Algunos autores proponen mecanismos de inducción aséptica, empleando una aguja estéril, para insectos; pero la respuesta suele ser más débil y se manifiesta por un periodo más corto que las larvas infectadas (41), por esta razón se eligió realizar la infección.

Cabe mencionar que las larvas “no estimuladas” no han sido criadas en un ambiente estéril, por lo que se espera una producción basal de péptidos antimicrobianos (activos contra *H. pylori* o no). Otro punto a tomar en cuenta es que la invasión con bacterias no es la única señal que estimula la producción de AMPs; en *Drosophila* se ha visto que las lesiones con material aséptico, los bajos niveles de energía en el organismo, inducidos por la ausencia de señalización por insulina regulan hacia abajo los genes activados por el factor de crecimiento similar a la insulina (ILs) y

activan la expresión de genes para AMPs bajo la regulación del factor de crecimiento FOXO (99).

Entonces, la aparente falta de actividad de la fracción cruda (F 40%ACN/0.05%TFA) de hemolinfa sin estimular puede ser provocada por los bajos niveles de síntesis de AMPs, requiriéndose mayor concentración para observar un efecto anti-*H. pylori* tangible de la fracción. Cuando se comparó los cromatogramas de la fracción F. 5 activa (primera serie de fraccionamiento por UHPLC, derivado de la fracción 3-10 kDa) de ambos grupos de hemolinfa, cuidando de partir de concentraciones similares, no se halló mayor variación en las proporciones de los picos, o la ausencia de alguno que pudiera explicar la falta de actividad. Es probable que cada pico este constituido por más de un péptido, de manera que variaciones en la abundancia de algunas de las señales no es fácilmente evidenciable por esta metodología. Esta suposición se basa en los resultados de espectrometría de masa para la fracción F 5.8 donde los 4 péptidos eluyeron sobrelapados.

La cepa de referencia *H. pylori* ATCC43504 aislada por Marshall y Warren en el año 1983 posee un perfil genotípico para factores de virulencia *vacA* s1a-m1, *cagA* positiva. Haciendo una comparación con cepas clínicas se ha visto que aquellas que son positivas para *vacA* s1a-m1 poseen un mayor grado de virulencia y una toxina inductora de vacuolas citoplásmicas más activa, a su vez, el marcador de isla de patogenicidad *cagA* está asociado con la producción incrementada de IL-8, activación del factor nuclear kB, inflamación de mucosas y el desarrollo de úlceras pépticas, gastritis atrófica y cáncer gástrico (100). Respecto a su perfil de susceptibilidad a antibióticos de referencia, según el manual de la EUCAST –

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (101), ésta cepa es resistente a metronidazol ($R > 8 \mu\text{g/ml}$, $\text{MIC}_{\text{ATCC43504}} = 64 \mu\text{g/ml}$).

Teniendo esto presente, la fracción cruda (40% ACN/0.05% TFA) procedente de hemolinfa estimulada mostró valores de concentración mínima inhibitoria (MIC) de $62.5 \mu\text{g/ml}$ en los ensayos de microdilución, mientras que la fracción F 3-10kDa derivada de la fracción mencionada anteriormente mostró valores MIC $31.3 \mu\text{g/ml}$ contra la cepa *H. pylori* virulenta. Entre un paso de purificación y el otro parece haberse concentrado las moléculas activas al doble. Un comportamiento similar se observó en el ensayo de zona de inhibición aumentando el diámetro del halo casi al doble de medida (1.1 cm y 1.85 cm, respectivamente). Este hecho apoya el empleo del ensayo cualitativo como un método de sondeo rápido de las fracciones activas, y para el caso particular de las fracciones de hemolinfa apoya una equiparable capacidad de difusión de los compuestos tanto en medio líquido como sólido.

La TABLA N°6 muestra en resumen el tamaño de los halos de inhibición de las fracciones activas seleccionadas durante el proceso de purificación a partir de la fracción cruda. Conforme se iba avanzando en el aislamiento, el rendimiento de las fracciones era menor, por lo que se debió emplear menor cantidad de muestra para evaluar por bioensayo. De la fracción más pura, la F. 5.8 apenas se pudo emplear $0.63 \mu\text{g}$, obteniendo un halo de 0.8 cm de diámetro, se esperarían obtener un halo aproximado de 6.4 cm utilizando $5 \mu\text{g}$ esta fracción; lo cual equivale a haber concentrado la muestra 6 veces desde la fracción cruda F 40% ACN/0.5% TFA.

TABLA N°6: Ensayo Zona de Inhibición: Medida halos de inhibición de fracciones activas seleccionadas

| N° | Fracciones | Cantidad de | |
|----|---------------------|---|---------------------|
| | | muestra depositada (μg) | Medida halo (cm) |
| 1. | F. 40% ACN/0.5% TFA | 5 | 1.1 |
| 2. | F 3-10 kDa | 5 | 1.85 |
| 3. | F. 5 | 2.5 | 2 |
| 4. | F 5. 8 | 0.63 | 0.8 |

Son pocos los péptidos antimicrobianos con actividad anti-*H. pylori* aislados previamente, los hay procedentes de anfibios y peces (TABLA N°7) y sus rangos de actividad varían entre 3 a 20 µg/ml. Considerando que la F 3-10 kDa es una fracción de composición compleja y tiene un MIC de 31.3 µg/ml, es muy probable que la actividad de los péptidos puros que la componen esté en un rango similar o mayor a los mencionados en la TABLA N°6.

TABLA N°7 Péptidos antimicrobianos con actividad anti-*H. pylori*
reportados previamente

| Péptido Antimicrobiano | Organismo | MIC (µg/ml) | Referencias |
|---|--|------------------------------|--------------------|
| Piscidina de Tilapia 4 (TP4) | Tilapia del Nilo <i>(Oreochromis niloticus)</i> | 3 | (102) |
| Pexiganan | Rana africana de Uñas <i>(Xenopus laevis)</i> | 4 | (103) |
| Odorranain-HP | Rana grahami <i>(Odorrana grahami)</i> | 20 | (104) |
| Longicornsin | Garrapata dura <i>(Haemaphysal longicornis)</i> | 6.4 | (105) |

Tomando el peso molecular promedio de los péptidos de la fracción 3-10 kDa, (PM=4191.4 Da) se calcula un valor MIC de 7.47 μM para dicha fracción. Si se compara este valor con los de los antibióticos de referencia para la cepa *H. pylori* ATCC 43504, está muy por encima de antibióticos como amoxicilina (MIC 0.041 μM), claritromicina (MIC 0.02 μM), y levofloxacino (MIC 0.346 μM), pero es 47 veces más activo que el metronidazol (347.8 μM).

La purificación fue acompañada de análisis complementarios para verificar el proceso de purificación, entre ellos la electroforesis en una y dos dimensiones. La electroforesis en 2D con tinción de Nitrato de Plata es altamente sensible, sin embargo, cada spot puede significar la mezcla de varios péptidos, ya sea de similar punto isoelectrico y/o peso molecular. En todo caso, los diferentes tipos de LC-MS/MS pueden ser más útiles para determinar la pureza de una fracción de manera más rápida, la identificación de sus componentes, lograr una mejor separación de los mismos, y realizar mediciones más exactas de los pesos moleculares de los péptidos. La misma fracción 3-10 kDa fue analizada tanto por gel de electroforesis 2D como por ESI-msQTOF, encontrándose diferencias en los valores de peso molecular promedio de los péptidos. En el método electroforético la mayor parte de péptidos estuvo alrededor de 10kDa, no obstante los valores encontrados por todos los equipos de espectrometría de masa utilizados (Qtof, IT, Orbitrap) arrojaron tamaños promedio de 4kDa. La migración de los péptidos en el gel puede haber estado afectada por las características catiónicas (péptidos altamente básicos), alguna modificación postraducciona, la zona hidrofóbica de su estructura, el pequeño tamaño de los AMPs también puede reducir su capacidad de interacción con el SDS. A pesar de la debilidad del método electroforético en la precisión del

estimado de peso molecular, es una técnica bastante útil para tener una idea general de la complejidad de una muestra de manera más económica. En el gel de electroforesis 2D se visualizaron 23 manchas o “spots”, en contraste a los 35 reportados como más abundantes por el espectrómetro de masa Qtof (fueron detectados unos 45 péptidos más en cantidades traza). Además, la espectrometría de masa permitió evidenciar la naturaleza policationica de los péptidos. La mayor parte poseían 3 cargas positivas y en menor proporción entre 4 – 6.

Otro punto técnico importante en el aislamiento fue la metodología empleada para la medición de la concentración de proteínas/péptidos. Ello fue de suma importancia al realizar los bioensayos, en el cálculo de la capacidad de las columnas de filtración molecular, los cálculos de rendimiento, y también para el cálculo de muestra a cargar en el gel de electroforesis. La medición por ensayo de Bradford es un método bastante económico, sobretodo cuando se tienen varias fracciones que se desea evaluar y se cuenta con buena cantidad de muestra, por esta razón se aplico para la medición de varias fracciones crudas y para el cálculo de rendimientos. Un método mas costoso pero que arroja valores de medición muy similares a los valores teóricos fue el kit Non-Interfering Protein Assay™ (Calbiochem®). Se seleccionó este kit para calcular las concentraciones de las fracciones para el bioensayo. Sin embargo, debido a los bajos rendimientos de las últimas series de fraccionamiento por el UHPLC se tuvo que buscar una metodología que requiera muy poco volumen de muestra, de relativa buena sensibilidad y repetitibilidad. Se optó por las lecturas de absorbancia a 215nm empleando el espectrofotómetro Nanodrop 2000c, que utiliza microvolúmenes de muestra/fracción. Debido a que esta técnica no era tan exacta como el kit respecto al valor teórico, se trabajo haciendo una curva de

calibración concentración VS. absorbancia utilizando un péptido puro que se tenía en el laboratorio. Luego se ensayó un lote de muestra tanto por Nanodrop como por Kit, encontrándose la siguiente correspondencia: 1µg/µl leído por kit equivale a 7µg/µl leído bajo el espectro UV a 215 nm. De esta forma se tenía la flexibilidad de realizar las mediciones por absorbancia con microvolúmenes y a la par teniendo un valor de concentración más exacto por kit especialmente para los bioensayos.

Al realizar el aislamiento de AMPs a partir de organismos vivos, leves variaciones en los factores que influyen en la producción de AMPs pueden afectar en gran medida los niveles sintetizados (28). De ésta manera, no es de extrañar que pueda ocurrir un fallo cuando se repita el aislamiento de compuestos previamente identificados. Durante el aislamiento ocurrió algo similar en un siguiente lote de extracción, encontrándose actividad anti-*H. pylori* en la fracción N°4 de la primera serie de separación por UHPLC (data no mostrada), a la vez que se conservaba la actividad en la fracción N° 5 que mostró actividad inter-lotes de extracción por lo que se decidió proseguir con la purificación e identificación de los péptidos en la fracción que en varios lotes mostró actividad. No se descartará hacer más adelante el análisis e identificación de los péptidos en ésta nueva fracción.

En los trabajos de purificación de compuestos naturales una de las grandes limitantes es la escasa cantidad de moléculas activas que se logra purificar. Por ejemplo para purificar la hormona gastrointestinal secretina se tuvo que procesar más de 10,000 cerdos; de igual modo para aislar la hormona tirotrópica del crecimiento se emplearon 500,000 hipotálamos de ovejas y cerdos (106). En el trabajo realizado se proyectó que a partir de 100 ml de hemolinfa se puede obtener 30 mg de péptidos pequeños (<10kDa), pero para lograr aquel volumen de

hemolinfa se necesitaría trabajar con al menos unas 10,000 larvas. En la sección Anexos se muestra un ejemplo de rendimiento de extracción para el lote 3 del trabajo, se realizó la extracción de hemolinfa de más de 750 larvas inoculadas (equivalente a 6.6 ml de hemolinfa) y apenas se pudo recuperar 2µg de la fracción de péptidos activa más pura (subfracción F5.8). No se descarta que haya habido pérdida de material activo durante el proceso de purificación. Por lo general cuando se tienen bajos rendimientos de las moléculas activas se recomienda optar por un protocolo de purificación con el menor número de pasos y así evitar demasiada pérdida de rendimiento. En la metodología empleada se trató de utilizar concentraciones adecuadas que impidan que los filtros o columnas se saturen. El fraccionamiento por UHPLC con columna C18, analítica, especial para la separación de péptidos de pequeño tamaño también permitió el uso de bajos volúmenes de inyección logrando optimizar lo mejor posible los bajos rendimientos.

La identificación de los 4 péptidos contenidos en la fracción activa F5.8 fue complicada de realizar por espectrometría de masa desde el momento que no se contaba con una base de datos genómica y proteica confiable para la Mosca Soldado Negra. Ante ésta dificultad se planteó deducir la familia a la que pertenecen los péptidos activos empleando la base de datos peptídica de *Drosophila melanogaster*, puesto que está lo suficientemente caracterizada y al ser un organismo relacionado es capaz de sintetizar péptidos de la misma familia con secuencias similares. Tener la familia y la secuencia relacionada del péptido facilitaría la interpretación de los espectros de fragmentación de masa para lograr un secuenciamiento *de novo* exitoso. De los 5 aminoácidos de la secuencia primaria que se pudo deducir hubo

una mayor abundancia de Glutamato (Glu), un aminoácido con cadena lateral ácida. Ambos péptidos 1 y 2 presentaron un patrón de fragmentación muy similar, ésta semejanza en la secuencia podría ser la razón de la dificultad de su separación por HPLC. Para lograr una mejor separación se puede intentar alternando entre “agentes de apareamiento de iones” diferentes (en orden de hidrofobicidad: fosfato⁻ < ácido trifluoroacético TFA⁻ < ácido pentafluoropropiónico PFPA⁻ < ácido heptafluorobutírico HFBA⁻) y a diferentes concentraciones (107). Se vino utilizando TFA que es el agente de elección para las separaciones por cromatografía de fase reversa (RP-HPLC).

Para el análisis en el Orbitrap es importante contar con una muestra pura, con la menor cantidad de contaminantes, ya que se requiere que la señal de los péptidos de interés predomine sobre la señal de los contaminantes de la muestra, tales como polímeros de plástico, polvo, queratinas, etc. Esto va incrementar la proporción señal/ruido (S/N) y habrán iones de la secuencia lo suficientemente altos que puedan contribuir con la designación de la secuencia.

Si es que se desea ir más allá en la caracterización de éstos péptidos antimicrobianos, confirmar su blanco de acción a través de microscopia de fluorescencia o electrónica, o profundizar en su actividad biológica (valores MIC, MBC, IC50, CCI) contra el patógeno bacteriano de interés, o evaluar cultivos con cepas clínicas resistentes, habrá que considerar el elaborar péptidos sintéticos o su clonamiento en sistema de expresión para un mayor rendimiento. Para ello es imprescindible contar con la secuencia definitiva y las modificaciones en su estructura primaria.

En los insectos, es común encontrar péptidos estabilizados por cisteínas, ejm. Las defensinas, éstas suelen tener entre 33 a 46 residuos de aminoácidos, y estar formadas por un dominio alfa-hélice y dos hebras β -antiparalelas estabilizadas por 3 a 4 puentes disulfuro. Precisamente, Park et al, (6) lograron purificar la defensina DLP4 a partir de la mosca Soldado Negra, pero ésta no presentó actividad frente a bacterias Gram negativas como *Enterobacter aerogenes* KCCM12177, *Escherichia coli* KCCM11234, *Pseudomonas aeruginosa* KCCM11328), ni aún a la concentración más alta ensayada, 19.9 $\mu\text{g/ml}$. Esta especificidad es común para los AMPs que pertenecen a la familia de las defensinas, por lo que al parecer los AMPs con actividad anti-*H. pylori* que se purificaron no pertenecen a dicha familia. Se corroboró este hecho en los ensayos de reducción de la fracción 5.8 en la que ningún péptido vio modificada su masa. El peso molecular de la DLP-4 (4.27 kDa) tampoco coincidió con ninguna de las masas identificadas en el peptidoma por ESI-MSqTOF. Park *et al.* utilizaron un equipo de masa MALDI-TOF de menor precisión que los empleados en este trabajo, ésta puede ser la causa de no haber observado un péptido que coincida con ésta masa de manera exacta. Hay otras familias de AMPs con afinidad por bacterias Gram negativas que son comunes en insectos como las Cecropinas, Drosocinas, Atacinas, y/o Dipterocinas, por tanto serían nuevos AMPs reportados para ésta *Hermetia illucens*.

Acerca de cuán factible puede ser el uso de los AMPs como drogas de administración terapéutica. Hay limitantes como la falta de especificidad por un organismo patógeno en particular, la dificultad que pueda haber para alcanzar las células blanco, su reducida vida media, su propensión al clivaje proteolítico, las altas dosis requeridas. Por otro lado, se plantean desafíos como la prevención de su

toxicidad, considerando que *in vivo* éstos están protegidos por gránulos o se sintetizan como propéptidos no tóxicos (7). Son varias las características que se les atribuye a los AMPs, como agentes antiinfecciosos, como promotores de un efecto sinérgico con antibióticos convencionales, como inmunoestimulantes o agentes neutralizantes de endotoxinas, como tumorocidas y mitogénicos. Entonces, vale la pena realizar estudios de farmacocinética y/o postular formas de administración empleando partículas biodegradables, nanopartículas lipídicas con liberación sostenida, nanotubos de carbono derivatizados con péptidos bioactivos, etc. El anclaje directo de las nanopartículas a los sitios específicos se puede lograr conjugándolos a los ligandos que interactúan con los receptores presentes en las células blanco bacterianas (108). El clivaje proteolítico también se puede sobrellevar realizando sustituciones de L-aminoácidos por D-aminoácidos, conjugando con ácidos grasos, etc. Su pequeño tamaño también provoca que sean fácilmente adsorbidos y excretados por los riñones, por lo que se ha intentado incrementar su tamaño añadiendo polietilenglicol pero esto no favorece su actividad antimicrobiana. También se ha reportado el uso de polímeros degradables para los sistemas de liberación controlada, la proteína/péptido es embebido en matrices de polímeros que van atravesando hidrólisis o digestión enzimática tras la administración oral (109).

Si se compara la actividad de los péptidos antimicrobianos respecto a los antibióticos de referencia, es poco común encontrar AMPs en la naturaleza que sean más potentes que estos antimicrobianos. Hay que considerar que los antibióticos que se administran actualmente han sufrido a través del tiempo una serie de modificaciones que los han hecho cada vez más eficaces, de igual manera esto se

puede hacer para los péptidos antimicrobianos siempre que se tenga una estructura base activa de la cual partir. Algunos autores recomiendan que los péptidos antimicrobianos pueden favorecer la actividad de las moléculas antibióticas al facilitar su paso hacia su blanco dentro de la célula. En un futuro podría pensarse en hacer este tipo de ensayos con los péptidos sintetizados y comprobar dicha hipótesis.

A nivel industrial se han hecho estudios y se viene implementando la utilización de las larvas de la Mosca Soldado Negra como alimento de pollos y peces (18) por su alto contenido de proteínas y grasas, 42% y 35%, respectivamente (24, 110). Tras haber comprobado con ésta investigación que la larva de *Hermetia illucens* es capaz de almacenar un potencial contenido antimicrobiano puede hacer más atractiva su utilización como fuente de alimento para animales.

X. CONCLUSIONES

- La Mosca Soldado Negra es capaz de sintetizar péptidos con actividad anti-*Helicobacter pylori*, que libera en su hemolinfa.
- Es necesario la estimulación de la síntesis de los péptidos antimicrobianos en la hemolinfa de *Hermetia illucens* para lograr su aislamiento y purificación.
- Se purificó parcialmente 4 péptidos novedosos con actividad frente a cultivos de *H. pylori* (ATCC 43504).
- Los péptidos activos aislados presentan alrededor de 4.2kDa, una secuencia primaria similar entre sí, son policatiónicos, poseen un pI de 5-8, y no presentan cisteínas ni enlaces disulfuro en su estructura.

XI. RECOMENDACIONES

- Dado el escaso rendimiento de los péptidos activos aislados se sugiere implementar una metodología que permita la recolección y almacenaje temporal de la hemolinfa tras la extracción, con el fin de poder partir de un mayor volumen para el proceso de purificación sin que ésta se melanice.
- Se recomienda purificar de manera secuencial por HPLC, alternando entre columnas con sílica de distinta longitud de la cadena alquilo (C18 → C8 → C4), y/o modificando el agente de apareamiento de iones (Ejm. TFA, HFBA) utilizado en la gradiente de solventes. Ambas variables modificarán parámetros como el desplazamiento, la selectividad y simetría de los picos, facilitando así su discriminación.
- Se sugiere acompañar la separación por UHPLC acoplado a un espectrómetro de masas como control de calidad de la pureza de los picos,
- Se recomienda obtener datos cuantitativos de la actividad anti-*H. pylori* de los péptidos activos aislados y caracterizados, para su posterior comparación con péptidos antimicrobianos previamente reportados.

XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Dhar S, Soni R, Das B, Mukhopadhyay G. Molecular mechanism of action of major *Helicobacter pylori* virulence factors. *Mol Cell Biochem.* 2003;253(1-2):207-15.
2. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C, Bazzoli F, El-Omar E, Graham D, et al. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. *Gut.* 2007;56(6):772-81.
3. Boyanova L. Prevalence of multidrug-resistant *Helicobacter pylori* in Bulgaria. *Journal of medical microbiology.* 2009;58(7):930-5.
4. Bahar AA, Ren D. Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland).* 2013;6(12):1543-75.
5. Cociancich S, Bulet P, Hetru C, Hoffmann JA. The inducible antibacterial peptides of insects. *Parasitology Today.* 1994;10(4):132-9.
6. Park S-I, Kim J-W, Yoe SM. Purification and characterization of a novel antibacterial peptide from black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae. *Developmental & Comparative Immunology.* 2015;52(1):98-106.
7. Gordon YJ, Romanowski EG, McDermott AM. A Review of Antimicrobial Peptides and Their Therapeutic Potential as Anti-Infective Drugs. *Current eye research.* 2005;30(7):505-15.
8. Hancock REW, Sahl H-G. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat Biotech.* 2006;24(12):1551-7.

9. Park S-I, Chang BS, Yoe SM. Detection of antimicrobial substances from larvae of the black soldier fly, *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae). *Entomological Research*. 2014;44(2):58-64.
10. Ishaq S, Nunn L. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: a state of the art review. *Gastroenterology and Hepatology From Bed to Bench*. 2015;8(Suppl1):S6-S14.
11. Ramírez Ramos A, Mendoza Requena D, Leey Casella J, Guerra Valencia J. Estudio del *Helicobacter pylori* en el Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*. 2002;19:209-14.
12. Klein PD, Opekun AR, Smith EO, Klein PD, Graham DY, Graham DY, et al. Originally published as Volume 1, Issue 8756 Water source as risk factor for *Helicobacter pylori* infection in Peruvian children. *The Lancet*. 1991;337(8756):1503-6.
13. Ramos DAR. *Helicobacter pylori*: variación de la prevalencia de la infección por el *Helicobacter pylori* y su asociación con los niveles de cloro. Simposio; Academia Nacional de Medicina 2006. p. 59.
14. Smith SM, O'Morain C, McNamara D. Antimicrobial susceptibility testing for *Helicobacter pylori* in times of increasing antibiotic resistance. *World journal of gastroenterology*. 2014;20(29):9912-21.
15. Linnaeus C. *Systema naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis*. Editio decima, reformata. Stockholm: Laurentii Salvii H; 1758. 1-824.
16. Sheppard JKTaDC. Lekking Behavior of the Black Soldier Fly. *Florida Entomologist*. 2001;84(4):729-30.

17. Tomberlin JK, Adler PH, Myers HM. Development of the Black Soldier Fly (Diptera: Stratiomyidae) in Relation to Temperature. *Environmental Entomology*. 2009;38(3):930-4.
18. G. L. Newton DCS, D.W. Watson, G. J. Burtle, C. R. Dove, J. K. Tomberlin, and E. E. Thelen. The Black Soldier Fly, *Hermetia illucens*, as a manure Management/Resource Recovery Tool.
19. Craig Sheppard D, Larry Newton G, Thompson SA, Savage S. A value added manure management system using the black soldier fly. *Bioresource Technology*. 1994;50(3):275-9.
20. Booth DC, Sheppard C. Oviposition of the Black Soldier Fly, *Hermetia illucens*(Diptera: Stratiomyidae): Eggs, Masses, Timing, and Site Characteristics. *Environmental Entomology*. 1984;13(2):421-3.
21. Gobbi FP. *Biología reproductiva y caracterización morfológica de los estadios larvarios de Hermetia illucens (L., 1758) (Diptera: Stratiomyidae). Bases para su producción masiva en Europa: Universidad de Alicante; 2012.*
22. Holmes L.A. VSL, Tomberlin J.K. Relative Humidity Effects on the Life History of *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae). *Entomological Society of America*. 2012;41(4):971-8.
23. Holmes LA, Vanlaerhoven SL, Tomberlin JK. Substrate effects on pupation and adult emergence of *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae). *Environ Entomol*. 2013;42(2):370-4.
24. Sheppard D.C. TJK, Joyce J.A., Kiser B.C., Summer S.M. Rearing methods for the Black Soldier Fly (Diptera: Stratiomyidae). *Journal of medical entomology*. 2002;39(4):695-8.

25. Cribb BW. Oviposition and maintenance of *Forcipomyia* (*Lasiohelea*) *townsvillensis* (Diptera: Ceratopogonidae) in the laboratory. *Journal of medical entomology*. 2000;37(3):316-8.
26. Zhang J, Huang L, He J, Tomberlin JK, Li J, Lei C, et al. An Artificial Light Source Influences Mating and Oviposition of Black Soldier Flies, *Hermetia illucens*. *Journal of Insect Science*. 2010;10:202.
27. Briscoe AD, Chittka L. The evolution of color vision in insects. *Annual review of entomology*. 2001;46:471-510.
28. Sperstad SV, Haug T, Blencke HM, Styrvold OB, Li C, Stensvag K. Antimicrobial peptides from marine invertebrates: challenges and perspectives in marine antimicrobial peptide discovery. *Biotechnology advances*. 2011;29(5):519-30.
29. Franc NC, White K. Innate recognition systems in insect immunity and development: new approaches in *Drosophila*. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 2000;2(3):243-50.
30. Hoffmann JA, Hetru C, Reichhart J-M. The humoral antibacterial response of *Drosophila*. *FEBS Letters*. 1993;325(1-2):63-6.
31. Hultmark D. Immune reactions in *Drosophila* and other insects: a model for innate immunity. *Trends in Genetics*. 9(5):178-83.
32. Hoffmann JA, Reichhart JM. *Drosophila* innate immunity: an evolutionary perspective. *Nature immunology*. 2002;3(2):121-6.
33. Ashida M, Brey PT. Role of the integument in insect defense: pro-phenol oxidase cascade in the cuticular matrix. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995;92(23):10698-702.

34. Nappi AJ, Vass E. Melanogenesis and the Generation of Cytotoxic Molecules During Insect Cellular Immune Reactions. *Pigment Cell Research*. 1993;6(3):117-26.
35. Lagueux M, Perrodou E, Levashina EA, Capovilla M, Hoffmann JA. Constitutive expression of a complement-like protein in Toll and JAK gain-of-function mutants of *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(21):11427-32.
36. Tzou P, De Gregorio E, Lemaitre B. How *Drosophila* combats microbial infection: a model to study innate immunity and host-pathogen interactions. *Current opinion in microbiology*. 2002;5(1):102-10.
37. Gottar M, Gobert V, Michel T, Belvin M, Duyk G, Hoffmann JA, et al. The *Drosophila* immune response against Gram-negative bacteria is mediated by a peptidoglycan recognition protein. *Nature*. 2002;416(6881):640-4.
38. Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*. 2002;415(6870):389-95.
39. Michel T, Reichhart J-M, Hoffmann JA, Royet J. *Drosophila* Toll is activated by Gram-positive bacteria through a circulating peptidoglycan recognition protein. *Nature*. 2001;414(6865):756-9.
40. Lemaitre B, Reichhart JM, Hoffmann JA. *Drosophila* host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94(26):14614-9.

41. Yakovlev AY. Induction of antimicrobial peptide synthesis by the fat body cells of maggots of *Calliphora vicina* R.-D. (Diptera, Calliphoridae). *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 2012;47(6):543-51.
42. Boman HG, Nilsson-Faye I, Paul K, Rasmuson T. Insect Immunity I. Characteristics of an Inducible Cell-Free Antibacterial Reaction in Hemolymph of *Samia cynthia* Pupae. *Infection and immunity*. 1974;10(1):136-45.
43. Faye I, Pye A, Rasmuson T, Boman HG, Boman IA. Insect immunity. 11. Simultaneous induction of antibacterial activity and selection synthesis of some hemolymph proteins in diapausing pupae of *Hyalophora cecropia* and *Samia cynthia*. *Infection and immunity*. 1975;12(6):1426-38.
44. Sperstad SV, Haug T, Paulsen V, Rode TM, Strandskog G, Solem ST, et al. Characterization of crustins from the hemocytes of the spider crab, *Hyas araneus*, and the red king crab, *Paralithodes camtschaticus*. *Developmental & Comparative Immunology*. 2009;33(4):583-91.
45. Rahnamaeian M. Antimicrobial peptides: modes of mechanism, modulation of defense responses. *Plant signaling & behavior*. 2011;6(9):1325-32.
46. Tossi A, Sandri L, Giangaspero A. Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers*. 2000;55(1):4-30.
47. Yi H-Y, Chowdhury M, Huang Y-D, Yu X-Q. Insect Antimicrobial Peptides and Their Applications. *Applied microbiology and biotechnology*. 2014;98(13):5807-22.

48. Baba K, Okada M, Kawano T, Komano H, Natori S. Purification of Sarcotoxin III, a New Antibacterial Protein of *Sarcophaga peregrina*. The Journal of Biochemistry. 1987;102(1):69-74.
49. Falla TJ, Karunaratne DN, Hancock REW. Mode of Action of the Antimicrobial Peptide Indolicidin. Journal of Biological Chemistry. 1996;271(32):19298-303.
50. Brewer D, Lajoie G. Structure-Based Design of Potent Histatin Analogues. Biochemistry. 2002;41(17):5526-36.
51. Hoffmann JA. Innate immunity of insects. Current opinion in immunology. 1995;7(1):4-10.
52. Soares JWM, C. M. Antimicrobial Peptides: A review of How Peptide Structure Impacts Antimicrobial Activity. Proceedings of SPIE. 2004; 5271.
53. Wu M, Hancock RE. Improved derivatives of bactenecin, a cyclic dodecameric antimicrobial cationic peptide. Antimicrobial agents and chemotherapy. 1999;43(5):1274-6.
54. Rahnamaeian M, Cytryńska M, Zdybicka-Barabas A, Dobszlaff K, Wiesner J, Twyman RM, et al. Insect antimicrobial peptides show potentiating functional interactions against Gram-negative bacteria. Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences. 2015;282(1806).
55. Otvos L, Jr. Antibacterial peptides isolated from insects. Journal of peptide science : an official publication of the European Peptide Society. 2000;6(10):497-511.
56. Yount NY, Bayer AS, Xiong YQ, Yeaman MR. Advances in antimicrobial peptide immunobiology. Peptide Science. 2006;84(5):435-58.

57. Yang D, Biragyn A, Kwak LW, Oppenheim JJ. Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal. *Trends Immunol.* 2002;23(6):291-6.
58. Gutschmann T, Hagge SO, David A, Roes S, Bohling A, Hammer MU, et al. Lipid-mediated resistance of Gram-negative bacteria against various pore-forming antimicrobial peptides. *Journal of endotoxin research.* 2005;11(3):167-73.
59. Yang L, Harroun TA, Weiss TM, Ding L, Huang HW. Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores. *Biophysical journal.* 2001;81(3):1475-85.
60. Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature reviews Microbiology.* 2005;3(3):238-50.
61. Li W-F, Ma G-X, Zhou X-X. Apidaecin-type peptides: Biodiversity, structure–function relationships and mode of action. *Peptides.* 2006;27(9):2350-9.
62. Gallo RL, Ono M, Povsic T, Page C, Eriksson E, Klagsbrun M, et al. Syndecans, cell surface heparan sulfate proteoglycans, are induced by a proline-rich antimicrobial peptide from wounds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1994;91(23):11035-9.
63. Choi WH, Jiang M. Evaluation of antibacterial activity of hexanedioic acid isolated from *Hermetia illucens* larvae. *Journal of Applied Biomedicine.* 2014;12(3):179-89.
64. Testerman TL. MD, Mobley HLT. Adherence and Colonization. In: Mobley HLT, Mendz GL, Hazell SL, editors. *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics.* Washington.2001.

65. Mendoza-Elizalde S, Cortés-Márquez AC, Giono-Cerezo S, Zuñiga G, Consuelo-Sánchez A, Valencia-Mayoral P, et al. Analysis of the genotypic diversity of strains of *Helicobacter pylori* isolated from pediatric patients in Mexico. *Infection, Genetics and Evolution*. 2015;29:68-74.
66. Goodwin CS, McCulloch RK, Armstrong JA, Wee SH. Unusual cellular fatty acids and distinctive ultrastructure in a new spiral bacterium (*Campylobacter pyloridis*) from the human gastric mucosa. *Journal of medical microbiology*. 1985;19(2):257-67.
67. Dhar SK, Soni RK, Das BK, Mukhopadhyay G. Molecular mechanism of action of major *Helicobacter pylori* virulence factors. *Mol Cell Biochem*. 253(1):207-15.
68. Smith JI, Drumm B, Neumann AW, Policova Z, Sherman PM. In vitro surface properties of the newly recognized gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Infection and immunity*. 1990;58(9):3056-60.
69. Ghotaslou R, Leylabadlo HE, Asl YM. Prevalence of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*: A recent literature review. *World Journal of Methodology*. 2015 ;5(3):164-74.
70. Shokrzadeh L, Alebouyeh M, Mirzaei T, Farzi N, Zali MR. Prevalence of multiple drug-resistant *Helicobacter pylori* strains among patients with different gastric disorders in Iran. *Microbial drug resistance (Larchmont, NY)*. 2015;21(1):105-10.
71. De Francesco V, Zullo A, Hassan C, Giorgio F, Rosania R, Ierardi E. Mechanisms of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance: An updated

- appraisal. *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology*. 2011;2(3):35-41.
72. Parsonnet J, Friedman GD, Orentreich N, Vogelmann H. Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative *Helicobacter pylori* infection. *Gut*. 1997;40(3):297-301.
73. Mabe K, Yamada M, Oguni I, Takahashi T. In vitro and in vivo activities of tea catechins against *Helicobacter pylori*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1999;43(7):1788-91.
74. Dekker KA, Inagaki T, Gootz TD, Kaneda K, Nomura E, Sakakibara T, et al. CJ-12,954 and its congeners, new anti-*Helicobacter pylori* compounds produced by *Phanerochaete velutina*: fermentation, isolation, structural elucidation and biological activities. *The Journal of antibiotics*. 1997;50(10):833-9.
75. Craik DJ, Fairlie DP, Liras S, Price D. The future of peptide-based drugs. *Chem Biol Drug Des*. 2013;81(1):136-47.
76. Park S-C, Park Y, Hahm K-S. The Role of Antimicrobial Peptides in Preventing Multidrug-Resistant Bacterial Infections and Biofilm Formation. *International Journal of Molecular Sciences*. 2011;12(9):5971-92.
77. Hetru C, Bulet P. Strategies for the Isolation and Characterization of Antimicrobial Peptides of Invertebrates. In: Shafer W, editor. *Antibacterial Peptide Protocols. Methods In Molecular Biology™*. 78: Humana Press; 1997. p. 35-49.
78. Hoffmann JA, Hetru C. Insect defensins: inducible antibacterial peptides. *Immunology today*. 1992;13(10):411-5.

79. Touchard A, Koh JMS, Aili SR, Dejean A, Nicholson GM, Orivel J, et al. The complexity and structural diversity of ant venom peptidomes is revealed by mass spectrometry profiling. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2015;29(5):385-96.
80. Cole AM, Ganz T. Human antimicrobial peptides: analysis and application. *BioTechniques*. 2000;29(4):822-6, 8, 30-1.
81. Schagger H. Tricine-SDS-PAGE. *Nat Protocols*. 2006;1(1):16-22.
82. Jorgensen JH HJ, Bernard K, et al. M45-A2. *Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Test of Infrequently Isolated of Fastidious Bacteria* 2010.
83. Best LM, Haldane DJ, Keelan M, Taylor DE, Thomson AB, Loo V, et al. Multilaboratory comparison of proficiencies in susceptibility testing of *Helicobacter pylori* and correlation between agar dilution and E test methods. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2003;47(10):3138-44.
84. Jenssen H, Hamill P, Hancock REW. Peptide Antimicrobial Agents. *Clinical microbiology reviews*. 2006;19(3):491-511.
85. Ravi, C., Jeyashree, A., Devi R, K. *Antimicrobial Peptides from Insects: An Overview*. *Research in Biotechnology*. 2011.
86. Zhang G, Annan RS, Carr SA, Neubert TA. Overview of Peptide and Protein Analysis by Mass Spectrometry. *Current Protocols in Protein Science: John Wiley & Sons, Inc.*; 2001.
87. Salditt T, Li C, Spaar A. Structure of antimicrobial peptides and lipid membranes probed by interface-sensitive X-ray scattering. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2006;1758(9):1483-98.

88. Edmond de Hoffmann VS. *Mass Spectrometry: Principles and Applications*. Third Edition ed. England: John Wiley & Sons; 2007.
89. Huang Y, He L, Li G, Zhai N, Jiang H, Chen Y. Role of helicity of alpha-helical antimicrobial peptides to improve specificity. *Protein & cell*. 2014;5(8):631-42.
90. Dathe M, Wieprecht T. Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 1999;1462(1-2):71-87.
91. Defer D, Desriac F, Henry J, Bourgougnon N, Baudy-Floc'h M, Brillet B, et al. Antimicrobial peptides in oyster hemolymph: The bacterial connection. *Fish & Shellfish Immunology*. 2013;34(6):1439-47.
92. Aliahmadi A, Roghanian R, Emtiazi G, Ghassempour A. A simple method for primary screening of antibacterial peptides in plant seeds. *Iranian journal of microbiology*. 2011;3(2):104-8.
93. Polk DB, Peek RM. *Helicobacter pylori*: gastric cancer and beyond. *Nat Rev Cancer*. 2010;10(6):403-14.
94. Mégraud F. The challenge of *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics: the comeback of bismuth-based quadruple therapy. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*. 2012;5(2):103-9.
95. Choi W-H, Yun J-H, Chu J-P, Chu K-B. Antibacterial effect of extracts of *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae) larvae against Gram-negative bacteria. *Entomological Research*. 2012;42(5):219-26.

96. An C, Ishibashi J, Ragan EJ, Jiang H, Kanost MR. Functions of *Manduca sexta* Hemolymph Proteinases HP6 and HP8 in Two Innate Immune Pathways. *Journal of Biological Chemistry*. 2009;284(29):19716-26.
97. Conlon JM. Purification of naturally occurring peptides by reversed-phase HPLC. *Nat Protocols*. 2007;2(1):191-7.
98. Hou L, Shi Y, Zhai P, Le G. Antibacterial activity and in vitro anti-tumor activity of the extract of the larvae of the housefly (*Musca domestica*). *Journal of Ethnopharmacology*. 2007;111(2):227-31.
99. Loch G JE, Bulow M, Zinke I, Mori T, Suzuki S, Takeyama H. Metabolism and Innate Immunity: FOXO Regulation of Antimicrobial Peptides in *Drosophila*. In: Hartmann G WH, editor. *Innate Immunity: Resistance and Disease-Promoting Principles*. 2013. p. 103-11.
100. Erdogdu C, Saribas Z, Akyon Yilmaz Y. Detection of *cagA* and *vacA* genotypes of *Helicobacter pylori* isolates from a university hospital in Ankara region, Turkey. *Turkish journal of medical sciences*. 2014;44(1):126-32.
101. Alarcon T, Urruzuno P, Martinez MJ, Domingo D, Llorca L, Correa A, et al. Antimicrobial susceptibility of 6 antimicrobial agents in *Helicobacter pylori* clinical isolates by using EUCAST breakpoints compared with previously used breakpoints. *Enfermedades infecciosas y microbiologia clinica*. 2016
102. Narayana JL, Huang H-N, Wu C-J, Chen J-Y. Efficacy of the antimicrobial peptide TP4 against *Helicobacter pylori* infection: in vitro membrane perturbation via micellization and in vivo suppression of host immune responses in a mouse model. *Oncotarget*. 2015;6(15):12936-54.

103. Ge Y, MacDonald DL, Holroyd KJ, Thornsberry C, Wexler H, Zasloff M. In Vitro Antibacterial Properties of Pexiganan, an Analog of Magainin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1999;43(4):782-8.
104. Chen L, Li Y, Li J, Xu X, Lai R, Zou Q. An antimicrobial peptide with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. *Peptides*. 2007;28(8):1527-31.
105. Lu X, Che Q, Lv Y, Wang M, Lu Z, Feng F, et al. A novel defensin-like peptide from salivary glands of the hard tick, *Haemaphysalis longicornis*. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*. 2010;19(3):392-7.
106. Conlon JM, Leprince J. Identification and analysis of bioactive peptides in amphibian skin secretions. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 2010;615:145-57.
107. Shibue M, Mant CT, Hodges RS. Effect of anionic ion-pairing reagent hydrophobicity on selectivity of peptide separations by reversed-phase liquid chromatography. *Journal of chromatography A*. 2005;1080(1):68-75.
108. Urban P, Valle-Delgado JJ, Moles E, Marques J, Diez C, Fernandez-Busquets X. Nanotools for the delivery of antimicrobial peptides. *Current drug targets*. 2012;13(9):1158-72.
109. Gombotz WR, Pettit DK. Biodegradable Polymers for Protein and Peptide Drug Delivery. *Bioconjugate Chemistry*. 1995 1995/07/01;6(4):332-51.
110. Tomberlin JK, Sheppard D. Craig. Factors Influencing Mating and Oviposition of Black Soldier Flies (Diptera: Stratiomyidae) in a Colony. *Journal of Entomology Sciences*. 2002;37(4):345-52

XIII. ANEXOS

TABLA DE REGISTRO DE EXTRACCIÓN DE HEMOLINFA

| REGISTRO DE EXTRACCIÓN DE HEMOLINFA | | | | | | |
|-------------------------------------|----------------------|---------------------|-----------------------|---------------------------------|----------------------------------|--|
| N° Ensayo | Fecha Inoculación | Fecha Extracción | Cantidad de Larvas | Vol. Hemolinfa Extraída (ml) | Rendimiento (F. 40%ACN) mg | Observaciones |
| 1 | 21/01/2015 | 23/01/2015 | 384 | 3 | 11.4 | Incubación sin alimento, temp ambiente |
| 2 | | 29/01/2015 | 365 | 2 | 6.4 | Hemolinfa se melanizó |
| 3 | 11/02/2015 | 13/02/2015 | 373 | 2 | | Para medición de pH, se desechó la hemolinfa |
| 4 | 17/02/2015 | 19/02/2015 | 359 | 1.5 | 5.4 | Larvas incubadas en el bioterio, sin comida |
| 5 | 04/03/2015 | 06/03/2015 | 295 | 2 | 6.2 | Larvas incubadas en alimento humedecido |
| 6 | 11/03/2015 | 13/03/2015 | 186 | 1.5 | 6 | Incubadas en el bioterio con alimento |
| 7 | 18/03/2015 | 20/03/2015 | 152 | 1 | 5.1 | Larvas pequeñas (<1cm). No se melanizó |
| 8 | 25/03/2015 | 27/03/2015 | 119 | 0.8 | 3.2 | Incubadas en el bioterio con alimento |
| 9 | 07/04/2015 | 09/04/2015 | 177 | 1.5 | 8.9 | Incubadas en el bioterio con alimento |
| 10 | 15/04/2015 | 17/04/2015 | 190 | 1.5 | 8.3 | Incubadas en el bioterio con alimento |
| 11 | 05/05/2015 | 07/05/2015 | 200 | 2 | 11.9 | Conforme |
| 12 | 19/05/2015 | 21/05/2015 | 98 | 1 | 3.2 | Dificultades en la crianza. Ambiente demasiado húmedo. Nueva comida enriquecida a partir de este momento |
| 13 | 27/05/2015 | 29/05/2015 | 190 | 2 | 12.9 | Larvas robustas >1.5 cm |
| 14 | 10/06/2015 | 12/06/2015 | 121 | 1.5 | 8.4 | Hemolinfa ligeramente de color verde |
| 15 | 17/06/2015 | 19/06/2015 | 265 | 2.4 | 14.5 | Conforme |





| | | | | | | |
|----|------------|------------|-----|------|------|--|
| 16 | 30/06/2015 | 02/07/2015 | 260 | 2.5 | 14.6 | Larvas con demasiado contenido de grasa |
| 17 | | 22/09/2015 | 142 | 2 | NSC | Larvas sin inocular. Se intentó guardar el contenido extraído a -20°C sin embargo, al descongelar se melanizó. |
| 18 | 13/10/2015 | 15/10/2015 | 272 | 3 | NSC | Conforme |
| 19 | 20/10/2015 | 21/10/2015 | 172 | 1.5 | NSC | Dificultades en el bioterio con el control de temperatura |
| 20 | 03/11/2015 | 05/11/2015 | 148 | 1.18 | NSC | Conforme |
| 21 | 11/11/2015 | 13/11/2015 | 281 | 2 | NSC | Conforme |
| 22 | 15/12/2015 | 17/12/2015 | 60 | 0.5 | NSC | Dificultades en las condiciones de crianza |
| 23 | 28/12/2015 | 30/12/2015 | 200 | 2.5 | NSC | Conforme |
| 24 | | 13/01/2016 | 184 | 2 | NSC | Larvas sin inocular. Se melaniza con facilidad |
| 25 | 12/01/2015 | 14/01/2016 | 250 | 3 | NSC | Conforme |
| 26 | 20/01/2016 | 22/01/2016 | 156 | 1.7 | NSC | Conforme |
| 27 | 10/02/2016 | 12/02/2016 | 205 | 2 | NSC | Conforme |
| 28 | 16/02/2016 | 18/02/2016 | 211 | 2.5 | NSC | Conforme |
| 29 | 15/03/2016 | 17/03/2016 | 198 | 2 | NSC | Conforme |
| 30 | 15/06/2016 | 17/06/2016 | 185 | 1.6 | NSC | Conforme |
| 31 | 06/07/2016 | 08/07/2016 | 346 | 2.75 | NSC | Conforme |
| 32 | | 07/07/2016 | 242 | 2 | NSC | Larvas sin inocular |
| 33 | 11/07/2016 | 13/07/2016 | 237 | 3 | NSC | Conforme |

NSC: No se calculó el rendimiento

MEDICIÓN DE LA CÁPSULA CEFÁLICA BAJO EL ESTEREOSCOPIO

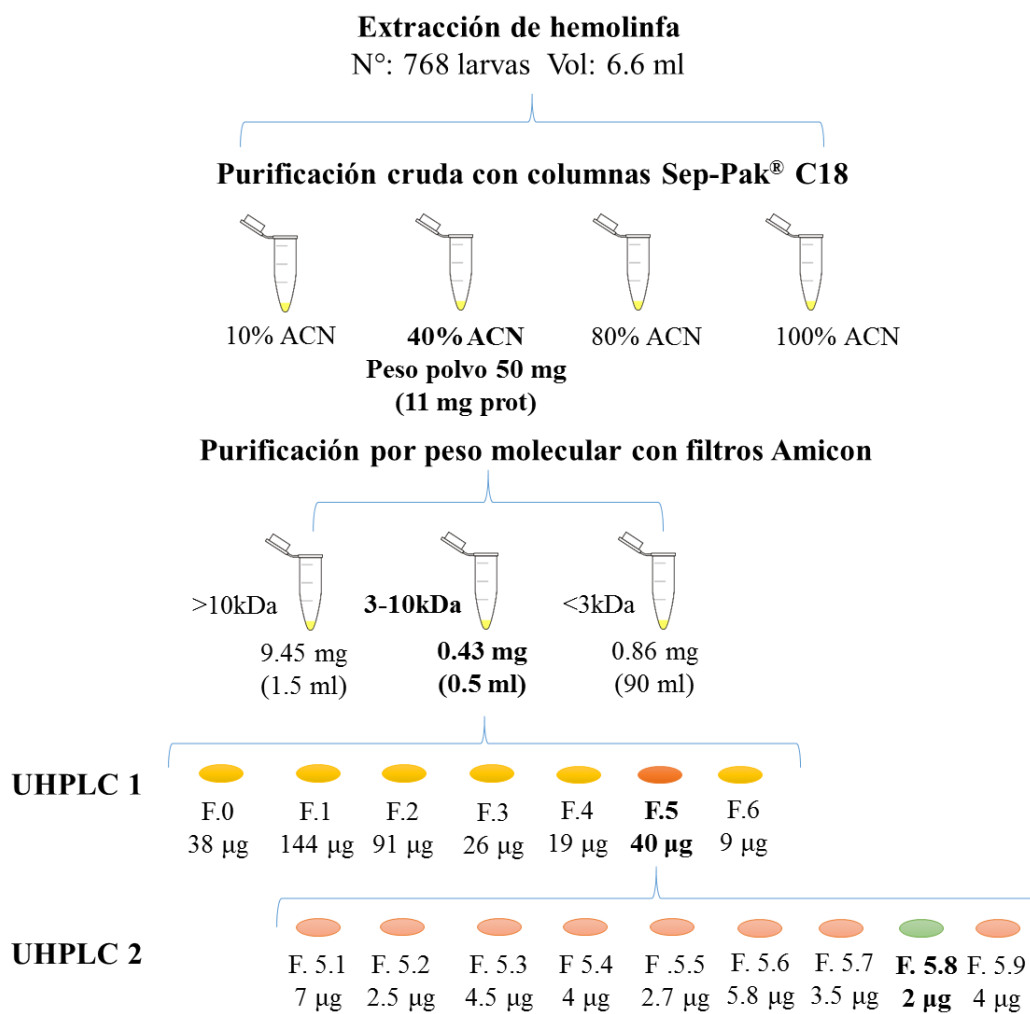


EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LAS FRACCIONES CRUDAS SEP-PAK® C18 FRENTE A CULTIVO DE *Escherichia coli* ATCC 25922

| Evaluación de Actividad anti- <i>E. coli</i> (ATCC25922) de fracciones crudas Sep-Pak® C18 (5µg) | | | |
|--|---|--|---|
| Control + | 10% ACN/0.05% TFA | 40% ACN/0.05% TFA | 80% ACN/0.05% TFA |
|  |  |  |  |
| Diámetro halo | - | 5 mm | - |

Evaluación de actividad de las fracciones crudas frente al cultivo de *E. coli* ATCC25922. Condiciones utilizadas: Inóculo cultivo 24 h a 6×10^4 bac/ml, Medio BHI 1% Agar, IsoVitalex al 1%, TTC al 0.4%, Anfotericina B (20 mg/ml) al 0.025%.

RENDIMIENTOS: EXTRACCIÓN DE PÉPTIDOS ACTIVOS (DATOS RECOGIDOS DEL LOTE 3)



PREPARACIÓN DE REACTIVOS Y MATERIALES

A. Cuantificación de proteínas empleando el Kit “Non-Interfering protein Assay (Calbiochem)”

1. Preparar una curva estándar empleando el stock de Albumina Sérica bovina (BSA) a 2 mg/ml que viene con el kit, de la siguiente manera:

| Tubo # | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|---------------------------|---|---|----|----|----|----|
| 2 mg/ml BSA estándar (μl) | 0 | 4 | 8 | 12 | 20 | 25 |
| Proteína (μg) | 0 | 8 | 16 | 24 | 40 | 50 |

2. Alicuotar 8 y 12 ul de la muestra que se desea cuantificar.
3. Agregar 500 ul del reactivo UPPA-I en cada tubo. Vortexear e incubar por 3 minutos.
4. Agregar 500 ul del reactivo UPPA-II en cada tubo. Vortexear e incubar por 3 minutos.
5. Centrifugar a 10,000 xg por 7 minutos.
6. Descartar el sobrenadante y dejar secar los tubos de manera invertida.
7. Añadir la solución de cobre: 100 ul a cada tubo y luego 400 ul de agua a cada uno. Vortexear.
8. Añadir 1 ml del Reactivo II. Éste se prepara con Rvo A: Rvo B en proporción 100:1. Vortexear.

9. Incubar por 30 minutos. Alicuotar 200 ul de la muestra por triplicado en la placa de ELISA.

10. Leer la absorbancia a 490 nm en un lector de microplacas iMark de BioRad®.

B. Electroforesis en dos dimensiones (2D) para péptidos purificados de la hemolinfa

Primero cuantificar la cantidad de proteínas que hay en la muestra a correr empleando el Kit Non-Interfering Protein Assay.

*Para un strip de 11 cm se recomienda emplear 100 ug de la mezcla de proteínas.

B. 1 Primera Dimensión

1. Pesar 118.67 mg de Reactivo Protein Extraction Reagent Type 4. Se disuelve en 133.33 ul de Agua PCR (890 ug/ul).
2. Agregar 20 ul de DTT. Luego la solución de proteína, cantidad necesaria aproximada 100 ug.
3. Agregar 4 ul de Azul de Bromofenol y 1.25 ul de anfolitos (BioRad®).
4. Vortex por 30 min a nivel 8.
5. Agregar 1.33 ul de acrilamida 9M.
6. Vórtex por 30 min a nivel 8.
7. Atemperar las tiras IPG strips (BioRad®).
8. Centrifugar a 10,000 RCF por 10 segundos.
9. Colocar 200 ul de la mezcla en el carril de los cassettes de 11 cm.

10. Coger las tiras por el extremo negativo empleando pinzas y colocar en el carril. Desde el polo (+) a (-). La cara del gel debe estar hacia abajo en contacto con la mezcla de proteínas. Importante: Evitar burbujas
11. Agregar 700 a 800 ul de aceite mineral sobre el strip para sellar.

B. 1.1 Programa IEF:

1. Se realiza una rehidratación activa. Por tanto, buscar 5A8 Plasma/Edit/Rehydration: Yes, temperatura 20°, rehidratación activa con corriente: 50V, 20°C, 12 hrs.

Insertar pausa luego de la rehidratación: No. Continúa primera dimensión:

| | |
|--------|-------------------------------------|
| Paso 1 | Voltaje 500V Modo Linear 1 hora |
| Paso 2 | Voltaje 1000V Modo Linear 1 hora |
| Paso 3 | Voltaje 4000V Modo Linear 1 hora |
| Paso 4 | Voltaje 6000V Modo Linear 2 hrs |
| Paso 5 | Voltaje 8000V Modo Linear 10 hrs |
| | Complete Method |

2. Una vez terminado el programa, poner Exit y apagar. Sacar la cámara y levantar el strip por la zona del electrodo negativo.
3. Si no se va correr la segunda dimensión de manera inmediata, se puede colocar el strip en un tubo de ensayo con tapa rosca y llevar a -20°C, cuidando que el gel no choque con las paredes del tubo. Limpiar el exceso de aceite mineral de la lámina del strip.

Nota: Lavar la cámara con ayuda de un cepillo y detergente no iónico. Enjuagar con agua destilada.

B.2 Segunda Dimensión

1. Limpiar los vidrios con ayuda de unas hojas “Kimwipes” y alcohol al 70%. Proceder a armar el cast (vidrios, separadores, tiras de goma, clips medianos).
2. Preparar el gel de poliacrilamida: Dimensiones 14 x 28 x 0.1 cm, vol. 50 ml

| | | |
|--------------------|---------|------|
| | 12% | 15% |
| Agua Destilada | 16.5 ml | 11.5 |
| Poliacrilamida 30% | 20 ml | 25.0 |
| Tris-HCl pH 8.8 | 12.5 ml | 12.5 |
| SDS 10% | 0.5 ml | 0.5 |
| APS 10% | 0.5 ml | 0.5 |
| TEMED | 0.02 ml | 0.02 |

Agregar el volumen preparado al cast armado en posición vertical, dejando el espacio necesario para que entre el strip. Agregar en la parte superior agua destilada para sellar y permitir la polimerización. Dejar gelificando.

3. En paralelo preparar los buffers de equilibrio

Buffer de equilibrio I:

| Reactivo | Stock | Conc. Final | Cantidad |
|--------------------|--------------|--------------------|-----------------|
| Úrea | - | 6 M | 1.8018g |
| Tris-HCl | 1.5 M | 0.075 M | 0.250 ml |
| Glicerol | 100% | 29.3% | 1.465 ml |
| Azul de Bromofenol | 0.1% | 0.002% | 0.100 ml |
| SDS | 10% | 2% | 1.1 ml |
| DTT | 6% (0.38M) | 1% (0.633M) | 0.83 ml |
| Agua | - | - | 1.255 ml |

Dejar que disuelva con ayuda del rocker (5 min aprox). El strip ya debe estar temperado. Introducir el strip cogiéndolo con una pinza por el polo negativo.

4. Incubar por 30 minutos el buffer de equilibrio I

5. Buffer de equilibrio II (Prepararlo 15 minutos antes que termine la incubación en el buffer I):

| Reactivo | Stock | Conc. Final | Cantidad |
|--------------------|--------------|--------------------|-----------------|
| Úrea | - | 6 M | 1.8018g |
| Tris-HCl | 1.5 M | 0.075 M | 0.250 ml |
| Glicerol | 100% | 29.3% | 1.465 ml |
| Azul de Bromofenol | 0.1% | 0.002% | 0.100 ml |
| SDS | 10% | 2% | 1.1 ml |
| Acrilamida | 9M | 0.36M | 0.200 ml |
| Agua | - | - | 1.855 ml |

6. Disolver en el rocker. Trasladar el strip (limpiando con un Kimwipe la parte inferior del strip) y dejar incubando por 30 minutos.

7. Preparar Agarosa 1%. Solubilizar

| | Concentración | Para 5 ml | Para 50 ml |
|--------------------------------|----------------------|------------------|-------------------|
| Agarosa | 1% | 0.05 g | 0.5 g |
| Azul de Bromofenol | 0.002% | 0.1ml | 1 ml |
| Buffer de corrida Tris Glicina | - | 5 ml | 50 ml |
| SDS 1X | - | 5 ml | 50 ml |

8. Preparar Buffer Laemmli 10X (Diluir a 1X para su uso): Para 1L

| | [Stock] 10 X | Pesar |
|-----------------------|--------------|---------|
| Tris Base (PM=121.14) | 0.25 M | 30.3 g |
| Glicina (PM=75.07) | 1.92 M | 144.1 g |
| SDS | | 10g |

9. Limpiar el pocillo para el strip con el buffer Laemmli. Y colocar el papel filtro con el ladder diluido 1/20, agregar 5 ul. Debe ser colocado lo más cercano al extremo izquierdo, junto al polo positivo del strip.

10. Poner el strip de izquierda a derecha, polo positivo a negativo. Agregar la agarosa al 1% a lo largo de todo el pocillo y hundir inmediatamente el strip con ayuda de una pinza. Dejar que gelifique. No permitir que haya burbujas, de lo contrario se debería retirar el strip, remover la agarosa, limpiar y volver a hacer el procedimiento.

11. Colocar los geles en la cámara de electroforesis discontinua. Luego de haber sacado la cinta de goma alrededor del gel.

12. Echar 600 ml de Buffer Laemmli en el cátodo y luego llenar a la mitad el electrodo anódico (150 ml). Éste último puede ser llenado con buffer reusado.

13. Dejar corriendo a 14 mA por 8 horas.

14. Preparar la solución de fijación:

Para 250 ml: Ácido acético 30 ml, Etanol 125 ml, Agua destilada 95 ml.

B.3 Tinción con Nitrato de Plata

1. Preparar 300 ml de etanol al 50%. Hacer lavados de 100ml por 5, 10, y 15 minutos, cada uno.
2. Preparar solución de tiosulfato (intensificador de sensibilidad) y agregar al gel sin dejar de balancear (30 seg.).
3. Lavar 3 veces con agua destilada rápidamente.
4. Preparar solución de Nitrato de Plata e incubar por 45 minutos.
5. Enjuagar 3 veces con agua destilada
6. Agregar la solución de revelado por 2 a 4 minutos.
7. Detener con solución de Fijación
8. Colocar el gel en agua. Guardar.

B. 4 Preparación de Reactivos

B.4.1 Generales:

- DTT 6%: Pesar 0.6 g de DTT, llevar a 10 ml de agua destilada.
- Acrilamida 9 M: Pesar 3.1986 g de acrilamida, llevar a 5 ml de agua destilada
- Tris BASE 1.5 M pH 8.8: Pesar Tris Base 36.342 g, agua destilada hasta 200 ml.
Llevar hasta 150 ml y ajustar con HCl (suele estar en pH 9-10).
- SDS 10%: Pesar 50 g de SDS. Completar con 500 ml de agua destilada.

- APS 10%: Pesar 0.15 g de APS. Completar a 1.5 ml con agua destilada.
- Azul de Bromofenol 0.1%: Pesar 1.5 mg de azul de Bromofenol en un microtubo. Llevar a 1.5 ml con agua destilada.

B.4.2 Para tinción con Plata:

B.4.2.1 Solución de Fijación:

Ácido acético al 12%: 60 ml de ácido acético glacial

Etanol 50%: 250 ml etanol

Agua destilada: 190 ml

Vol. Total: 500 ml

B.4.2.2 Solución Tiosulfato:

1 ml de tiosulfato (10 ng/ml), 49 ml de agua destilada

B.4.2.3 Solución de Tinción:

0.5 g nitrato de Plata **

0.189 ml formaldehído 37% (agregar poco antes de la tinción)

Completar con agua destilada 250 ml.

** Para mayor comodidad se puede disolver previamente el nitrato de plata.

Para 1 litro de solución, se utilizará 2 g de nitrato de plata (el contenido de un sobre). Luego se separa los 250 ml a emplear.

B.4.2.4 Solución de Revelado:

Pesar 7.5 g de Na_2CO_3

Solución de Tiosulfato 5 ml

Formaldehído 37%: 0.172 ml (agregar poco antes de la tinción).

Completar con 250 ml de agua destilada.

C. Evaluación de fracciones activas por Ensayo de Zona de Inhibición

(Adaptado de Park et al. (9))

1. Pesar 3.7 g de Infusión Cerebro Corazón (BHI) y 0.8 g de Bacto Agar para preparar 100 ml de medio al 0.8% Agar.
2. Disolver en 90 ml de agua destilada y calentar ligeramente para que termine de disolver por completo. Autoclavar.
3. UVear la cabina y mientras tanto preparar Cloruro de Trifenil Tetrazolio (TTC) al 1% P/V. Disolver 0.1g de TTC en 10 ml de agua destilada y esterilizar con un filtro jeringa de 0.22 μm . Cubrir el tubo con papel aluminio. Resuspender el Isovitalex en el volumen recomendado por el proveedor.
4. Esperar que el agar atempere (30-40°C), agregar:
 - Anfotericina B (20 mg/ml): 25 μl
 - Isovitalex: 2 ml
 - TTC: 0.8 ml

- Suero Fetal Bovino Inactivado: 10 ml

- Inóculo *H. pylori* 1×10^6 bac/ml

5. Verter 5 ml del medio preparado con inóculo en la placa de cultivo para tener agar de 1 mm de espesor. Dejar que solidifique
6. Con ayuda de una jeringa de 1 ml hacer pocillos de 3 mm de diámetro en el agar.
7. Colocar 4-5 μ l de la fracción a evaluar a la concentración adecuada.
8. Dejar incubando por 3 días a 37°C en atmósfera de microaerofilia (10% CO₂, 5% O₂, 85% N₂)