

Análisis de la actividad antibacteriana de fracciones de hemolinfa de larvas de insecto *G. mellonella* contra *S. aureus*

Analysis of antibacterial activity of hemolymph fractions from insect larvae *G. mellonella* against *S. aureus*

Olga Lucía Calderón-Gutiérrez^I, Beatriz Henao-Murillo^{II},
Carlos Peláez-Jaramillo^{III}, Edwin Patiño-González^{IV}.

Resumen:

Objetivo: El trabajo tiene como objetivo inducir, aislar y evaluar la actividad antibacteriana en *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) de fracciones derivadas de la hemolinfa total de la larva *Galleria mellonella* (*G. mellonella*). Las moléculas naturales antimicrobianas en insectos son la respuesta de la inmunidad innata contra patógenos. Las fracciones de hemolinfa de *G. mellonella* fueron purificadas por cromatografía. *S. aureus* se usó como modelo para evaluar las diferentes fracciones. Una zona de inhibición de crecimiento evidenció la actividad antibacteriana. Como conclusión, *S. aureus* fue susceptible a dos fracciones de la hemolinfa.

Métodos: El trabajo descrito fue hecho con larvas de *G. mellonella* del último estadio de desarrollo y el peso promedio de las larvas estuvo entre 270 ± 30 mg. Las larvas inmunizadas fueron inyectadas con una suspensión de la bacteria *S. aureus*. Como control, se usaron larvas inoculadas con PBS o larvas no tratadas. El extracto metanólico de la hemolinfa de *G. mellonella* fue fraccionado por SPE y RP-HPLC, y las

-
- I Estudiante de Maestría, Universidad de Antioquia, calle 67 N°53-108, laboratorio 1-243, Medellín-Colombia.
II Maestría en Biología, Investigadora asociada Universidad de Antioquia, calle 67 N°53-108, laboratorio 2-230, Medellín-Colombia.
III Doctor en Ciencias Químicas, Profesor Investigador Universidad de Antioquia, calle 67 N°53-108, laboratorio 2-230, Medellín-Colombia.
IV Doctor en Bioquímica, Profesor Investigador Universidad de Antioquia, calle 67 N°53-108, laboratorio 1-314, Medellín-Colombia. * edwin.patino@udea.edu.co

fracciones resultantes fueron almacenadas a -70°C . El ensayo de actividad antibacteriana de cada fracción fue determinado por los tamaños de las zonas de inhibición del crecimiento de *S. aureus* alrededor de discos de papel filtro impregnados con cada una de las fracciones de hemolinfa. El peso molecular de las fracciones de hemolinfa fue determinado por SDS-PAGE.

Resultados: Los análisis de cromatografía mostraron que en la hemolinfa inmunizada se incrementaron algunos componentes proteicos. El método en medio líquido demostró que la hemolinfa inmunizada inhibió el crecimiento visible de *S. aureus*. Las fracciones purificadas de hemolinfa inmunizada consistieron de diferentes bandas desde 37 hasta por debajo de la banda de 6 kDa por SDS-PAGE. Dos fracciones separadas POR RP-HPLC de la hemolinfa infectada mostraron actividad antibacterial contra la especie *S. aureus*.

Conclusiones: Fue posible inducir la producción de péptidos antimicrobianos en la hemolinfa de las larvas de *G. mellonella*. Se pudo demostrar con los resultados de inhibición en medio líquido y por el método de difusión en discos de filtro que la actividad antibacteriana observada en la hemolinfa fue debido a la inmunización de las larvas. Después del proceso de purificación se pudo detectar en la hemolinfa de larvas inmunizadas una fracción entre 1-10 kDa con péptidos antibacterianos.

Palabras Clave: *G. mellonella*, *S. aureus*, fracciones, hemolinfa, RP-HPLC, SDS-PAGE.

Abstract:

Aim: The work has the aim to induce, isolate, and evaluate the antibacterial activity on *Staphylococcus aureus* of derived fractions from whole hemolymph of *Galleria mellonella* larvae. Natural antimicrobial molecules in insect are the innate immune response against pathogens. Hemolymph fractions from *Galleria mellonella* were purified by chromatographic procedure. *S. aureus* was used as a model to test the different fraction. A growth inhibition zone was the evidence of antibacterial activity. As a conclusion, *S. aureus* was susceptible to two fractions of hemolymph.

Methods: The work described was performed with *G. mellonella* larvae in the last development stage and the average weight of the larvae were 270 ± 30 mg. The immunized larvae were injected with a suspension of *S. aureus* bacteria. As control, we used larvae inoculated with PBS or untreated larvae. The methanolic extract of *G. mellonella* hemolymph was fractionated by SPE and RP-HPLC, and the resulting fractions were store at -70°C . Antibacterial activity assay of each fraction was determined from the sizes of the growth inhibition zone of *S. aureus* around filter paper disks soaked with each one hemolymph fraction. The molecular weight of hemolymph fractions was determined by SDS-PAGE.

Results: The chromatography analysis showed that the immunized hemolymph increased some of the protein components. The broth method demonstrated that immunized hemolymph inhibits the visible growth of the *S. aureus*. The purified proteins from immunized hemolymph consisted of several bands from 37 to below of 6 kDa band in SDS-PAGE. Two fractions isolated by RP-HPLC from the hemolymph infected showed antibacterial activity against the species *S. aureus*.

Conclusions: It was possible to induce the production of antimicrobial peptides in the hemolymph of *G. mellonella* larvae. It was demonstrated from broth and paper disk results that antimicrobial activity observed in hemolymph was due to immunization of larvae. After the purification procedure, we could detect in hemolymph from immunized larvae a fraction between 1-10 kDa with antibacterial peptide.

Keywords: *G. mellonella*, *S. aureus*, fractions, hemolymph, RP-HPLC, SDS-PAGE.

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha venido reportando más casos de infecciones microbianas resistentes a los tratamientos con antibióticos, tanto en los individuos como en centros de atención hospitalaria (Cohen, 1992; Theuretzbacher, 2013). Los reportes señalan que estos mecanismos de resistencia se reportaron para *S. aureus* en los años 1940 y posteriores. Los primeros reportes indican que después de tres años de comenzar el uso de la penicilina para combatir el *S. aureus* (1941-1944), se reportaron las primeras cepas resistentes al antibiótico. Además, por los años de 1970, la resistencia de *S. aureus* había aumentado significativamente, y para los años 1980 más del 95 % de las cepas de *S. aureus* presentaban resistencia al tratamiento con penicilina (Cohen, 1992; Burk and Berghuis, 2002; Lowy, 2003; Edwards et al., 2014). Este mismo fenómeno fue evidenciado con otras cepas bacterianas, lo que inmediatamente obligó a la búsqueda de nuevas moléculas antibióticas para el tratamiento de infecciones (Fischbach and Walsh, 2009; Theuretzbacher, 2013). Las nuevas moléculas podrían ser productos naturales provenientes de organismos que los utilicen como defensa contra infecciones. Por muchos siglos los insectos han incorporado mecanismos de defensa contra patógenos invasores (Gillespie et al., 1997). La infección en los insectos estimula una compleja respuesta inmune defensiva llamada respuesta inmune innata. Esta respuesta innata, depende del plasma y principalmente de péptidos producidos por el cuerpo graso y hemocitos, conocidos como péptidos antimicrobianos (PAMs) (Gillespie et al., 1997). Estos PAMs son moléculas de expresión constitutiva. Sin embargo, durante la respuesta inmune del organismo, se induce su expresión (Luplertlop et al., 2011; Casanova-Torres and Goodrich-Blair, 2013). La muerte de los patógenos del insecto mediada por PAMs ocurre por diferentes mecanismos

(Lemaitre and Hoffmann, 2007), y esto posiblemente se debe a que son moléculas heterogéneas, usualmente de carácter catiónico que suelen presentar hélices alfa, hojas beta y estructuras lineales (Campagna et al., 2007). Los datos muestran que los PAMs tienen un efecto rápido y son de amplio espectro. Su mecanismo de acción se basa principalmente en aumentar la permeabilidad de la membrana o desestabilización de la membrana del agente invasor (Shai, 2002; Ryan et al., 2013). Este gran arsenal químico de los insectos podría servir para aumentar las posibilidades de obtener nuevas moléculas para tratar las infecciones bacterianas. Este trabajo presenta un primer reporte sobre la inducción de péptidos antimicrobianos en esta especie de polilla en Colombia. Se logró la identificación de fracciones de hemolinfa que mostraron inhibición del crecimiento de *S. aureus*, cualidad ligada directamente a la concentración de los péptidos. La trascendencia de estos resultados radica en la necesidad, cada vez mayor, de disponer de principios activos, naturales o sintéticos, contra especies de microorganismos que han mostrado marcada resistencia al tratamiento con antibióticos convencionales.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Reto inmune y extracción de la hemolinfa

Las larvas de *G. mellonella* fueron criadas con una dieta natural de salvado de trigo, cera y miel de abejas como previamente se reportó (Zdybicka-Barabas and Cytryńska, 2011), mantenidas a temperatura ambiente de $27 \pm 3^\circ\text{C}$, en condiciones de oscuridad. Solo se utilizaron larvas del último estadio y que tenían un peso de 270 ± 30 mg. Cada larva fue inoculada con $1 \mu\text{L}$ de suspensión de *S. aureus* a una concentración de 1×10^5 UFC/mL. Como control se utilizaron larvas no inoculadas o inoculadas con el mismo volumen de $1 \times \text{PBS}$. Las larvas fueron mantenidas a las mismas condiciones antes mencionadas hasta el tiempo indicado para la recolección de la hemolinfa (24 horas). Para la extracción de la hemolinfa, las larvas se depositaron en cajas de Petri estériles sobre una nevera con hielo para reducir su movilidad. La hemolinfa fluyó de las larvas después de insertar una aguja dentro de la parte superior del abdomen. Entre 15-20 L de hemolinfa por larva fueron colectados en tubos de 1.5 mL estériles. La inhibición de las proteasas y la melanización de la hemolinfa se realizó agregando a cada tubo de recolección feniltiourea para una concentración final de 200 mM. La hemolinfa libre de hemocitos, lípidos y proteínas de alto peso molecular fue obtenida siguiendo el protocolo de Schoofs y colaboradores (Schoofs et al., 1990). El producto final de la extracción se liofilizó para realizar un fraccionamiento por extracción en fase sólida (SPE) y por cromatografía líquida de alta presión en fase reversa (RP-HPLC).

2.2 Obtención de fracciones por SPE y RP-HPLC

El liofilizado se resuspendió en agua estéril y fue cargado en una columna empacada a mano de 12 cm de sílica gel C18 modificada (SPE). La solución acuosa de ácido trifluoroacético al 0.1% se mezcló con acetonitrilo en diferentes proporciones (70:30, 60:40, 50:50 y 40:60). Cada mezcla de agua-ácido trifluoroacético/acetonitrilo fue agregada independientemente a la columna, y se tomaron fracciones cada 3 min las cuales fueron liofilizadas. Luego, para RP-HPLC las fracciones fueron resuspendidas en agua y cargadas en una columna Supelcocol LC-18 (Supelcocol LC-18, 4.6mm x 250mm, Sigma-Fluka) con un gradiente de acetonitrilo de 0-100% en un tiempo máximo de 40 min y con un flujo de 1 mL/min.

2.3 Electroforesis en poliacrilamida

Las fracciones obtenidas de las diferentes cromatografías SPE y RP-HPLC fueron analizadas por SDS-PAGE con un gel de separación al 15 % el cual fue teñido con plata (Invitrogen, San Diego, CA). Aproximadamente 10 µg de cada fracción fue cargada en cada pozo y los pesos de las proteínas fueron estimados con los marcadores de peso molecular.

2.4 Inhibición del crecimiento de *S. aureus*

La inhibición del crecimiento de *S. aureus* se realizó por el método de dilución en caldo enriquecido. Cinco tubos de ensayo cada uno con 3 mililitros de caldo enriquecido fueron inoculados con 100 µL de un cultivo de *S. aureus* a una concentración de 1×10^5 . A cada tubo se le agregó una concentración diferente de hemolinfa libre de hemocitos (20, 40, 80 ó 160 ppm, respectivamente). Los tubos se incubaron a 37°C por 24 horas.

El ensayo de inhibición por difusión se realizó utilizando 1×10^5 UFC de *S. aureus* en caldo enriquecido. Cajas de Petri con 20 mL de agar/caldo enriquecido fueron inoculadas con el cultivo de *S. aureus* haciendo una distribución uniforme con un hisopo en toda la caja. Después de 15 minutos, discos estériles de papel de filtro de 0.5 cm de diámetro fueron humedecidos con cada fracción de hemolinfa obtenida por cromatografía y colocados sobre el agar. Las cajas fueron incubadas 24 horas a 37°C. Como control positivo se utilizó el antibiótico oxitetraciclina a una concentración de 2 µg/µL (2000 ppm) después de ser titulado.

3. RESULTADOS

3.1 Cambios en el patrón de hemolinfa con el reto inmune

Se investigó el cambio de los niveles de péptidos o componentes de la hemolinfa de *G. mellonella* retada con *S. aureus*. Los resultados obtenidos de la actividad antibacteriana por el método de dilución en caldo muestran que el reto inmunológico con *S. aureus* en las larvas de *G. mellonella* tuvo una pronunciada actividad antibacteriana en la hemolinfa proveniente de larvas inmunizadas (Figura 1). La actividad antibacteriana encontrada fue dosis dependiente ya que la mayor inhibición se observó en el tratamiento de 160 ppm (tubo 5). La turbidez encontrada en el tubo 1 indica que *S. aureus* no experimentó ninguna restricción de crecimiento ya que se encontraba en medio sin antibiótico. La modulación positiva de algunos componentes en la hemolinfa de larvas retadas pudo ser la responsable de la actividad antibacteriana mostrada. Debido a que la hemolinfa de larvas no retadas no inhibió el crecimiento de *S. aureus*.

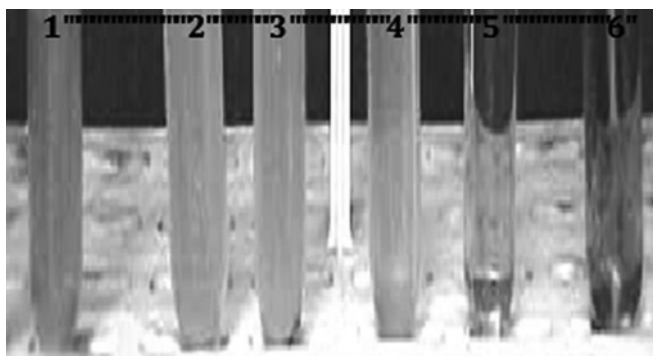


Figura 1. Análisis anti *S. aureus* de la hemolinfa de *G. mellonella*. Inhibición del crecimiento (turbidez) del cultivo de *S. aureus* con la hemolinfa de larvas retadas; tubo 1, *S. aureus* sin hemolinfa; tubos 2-5 cultivo de *S. aureus* con 20, 40, 80 ó 160 ppm de hemolinfa retada; tubo 6, medio de cultivo

3.2 Perfiles cromatográficos de hemolinfa sin reto y retada

Para identificar de dónde provenía la actividad antibacteriana presente en la hemolinfa de larvas retadas, se obtuvieron los perfiles cromatográficos de las dos hemolinfas. Los resultados muestran que en la hemolinfa retada hubo un aumento en la concentración de componentes proteicos (Figura 2).

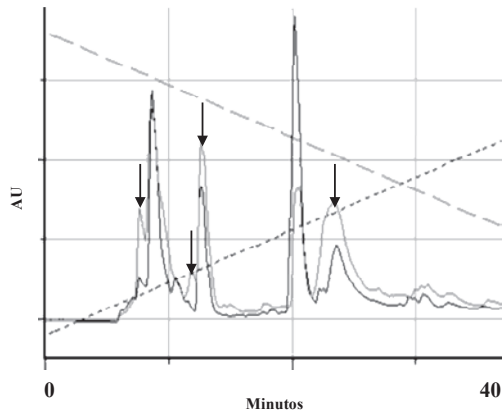


Figura 2. Perfiles cromatográficos de la hemolinfa sin reto y con reto inmunológico. Cromatogramas de hemolinfa de larvas sin reto (línea roja) y retadas (línea verde), las flechas indican el incremento de componentes en la hemolinfa retada

Sin embargo, otros componentes proteicos se encontraron en mayor proporción en la hemolinfa de larvas sin reto. Solo se observó una leve aparición de un pico nuevo comparando los dos cromatogramas (Figura 2). La mayor concentración de la expresión diferencial de proteínas se puede observar en la hemolinfa retada por encima de la banda de 6 kDa, lo que indica que las proteínas podrían llegar hasta 10 kDa de peso molecular (Figura 3). Estos resultados fueron la base para comenzar a separar los componentes antibacterianos de la hemolinfa proveniente de larvas retadas.

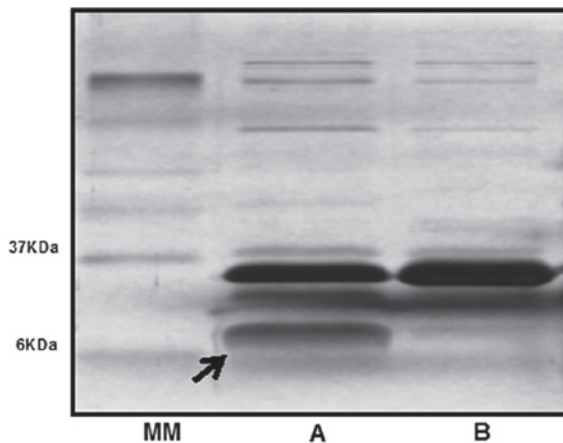


Figura 3. Perfiles electroforéticos de la hemolinfa. Carril A, hemolinfa retada y carril B, hemolinfa sin retar. La flecha indica las bandas diferencialmente expresadas en la hemolinfa retada

3.3 Fracciones de hemolinfa obtenidas por SPE

La cromatografía por gravedad utilizando una resina de sílica gel C18 modificada (SPE) y diferentes proporciones de solución acuosa de ácido trifluoroacético/acetonitrilo (70:30, 60:40, 50:50 y 40:60) fue realizada para separar los componentes antibacterianos de la hemolinfa libre de hemocitos. Las fracciones colectadas con cada una de las mezclas fueron analizadas en un gel de glicina SDS-PAGE el cual mostró que la fracciones obtenidas con la mezcla 70:30 de hemolinfa retada incrementó las proteínas de bajo peso molecular (Figura 4). Los resultados de electroforesis muestran que hubo cambios en la composición de péptidos ya que podemos decir que están entre el rango de 10 kDa hasta más abajo de 6 kDa en la hemolinfa retada. La visualización de estos péptidos se debe posiblemente a que en la liofilización de la misma fracción se concentraron estos péptidos haciéndolos visibles en el SDS-PAGE.

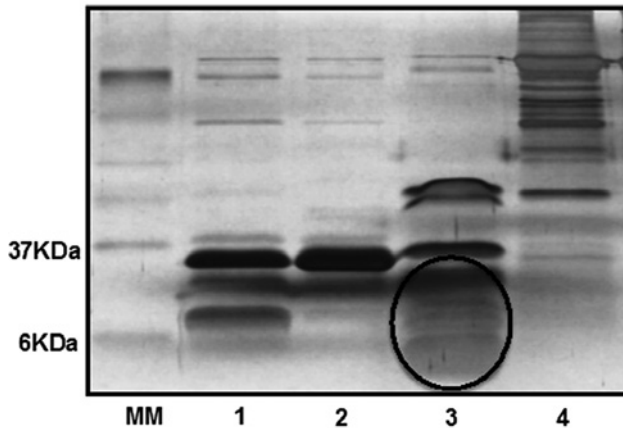


Figura 4. Análisis de las fracciones de hemolinfa obtenidas por SPE. La hemolinfa purificada por SPE con la mezcla 70:30 fue analizada en un gel SDS-PAGE. 1, hemolinfa retada; 2, Hemolinfa no retada; 3, fracción SPE; 4, extracto crudo de hemolinfa

3.4 Actividad anti *S. aureus* de las fracciones SPE

Los resultados de la comparación de la composición de péptidos en las fracciones por SDS-PAGE nos condujeron a examinar la actividad antibacteriana de la hemolinfa retada contra *S. aureus*. Los resultados de las zonas de inhibición del crecimiento demostraron que la fracción 4 obtenida con la mezcla 70:30 poseía la mayor actividad anti *S. aureus* (Figura 5). Mientras, otras fracciones como la 5, 6 y 7 fueron no efectivas en la inhibición del crecimiento de *S. aureus*. La comparación cualitativa de las

zonas de inhibición obtenidas con la fracción 4 y el control positivo oxitetraciclina demuestra que la fracción 4 posee una alta actividad antibacteriana (Figura 5).

Los anteriores resultados demuestran que la fracción 4 de la mezcla 70:30 está compuesta por diferentes péptidos de bajo peso molecular los cuales pueden ser los responsables de la actividad antibacteriana observada. Con el objetivo de conocer cual de estos péptidos posee la actividad antimicrobiana o si esta actividad se encuentra en un rango más estrecho de pesos moleculares, la fracción 4 se sometió a un nuevo fraccionamiento por RP-HPLC.

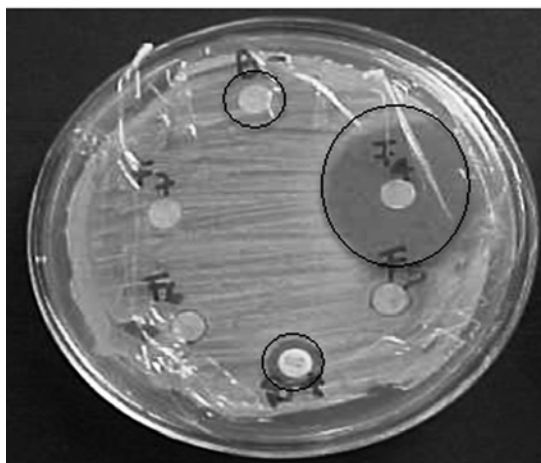


Figura 5. Zonas de inhibición de crecimiento de *S. aureus*. B-, control con PBS; B+, Control positivo con oxitetraciclina; F5, F6 y F7, diferentes fracciones de la mezcla 70:30 obtenidas por SPE

3.5 Fraccionamiento de la fracción 4 por RP-HPLC

Los componentes de la fracción 4 deben tener propiedades químicas similares. Para lograr el fraccionamiento de esta fracción se utilizó un gradiente de acetonitrilo cambiando la relación antes utilizada de 70:30 (Figura 6).

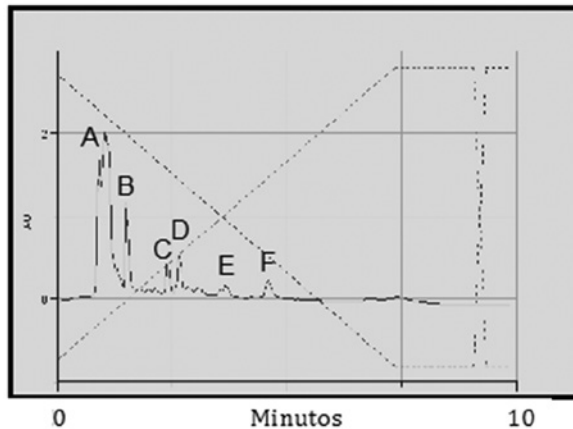


Figura 6. Análisis por RP-HPLC de la fracción 4 obtenida por SPE

El objetivo fue separar sus componentes de acuerdo a su hidrofobicidad por RP-HPLC. Entonces, la fracción 4 fue sometida a una nueva cromatografía utilizando un gradiente de acetonitrilo. Los resultados de la cromatografía muestran que las interacciones hidrofóbicas de la fracción 4 con los grupos de la columna Supelcocoil LC-18 dieron 6 diferentes picos, nombrados de la A-F (Figura 6). Lo que demuestra que aún esta fracción estuvo compuesta por diferentes péptidos. El perfil cromatográfico de la fracción 4 muestra que los picos A y B poseen una mayor proporción de proteína con respecto a los otros picos.

3.6 Actividad antibacteriana de las fracciones obtenidas por RP-HPLC

El ensayo de zonas de inhibición del crecimiento de *S. aureus* fue realizado para investigar si después de la separación estas fracciones tenían actividad antibacteriana. Cuando el papel de filtro fue impregnado con la fracción perteneciente a cada uno de los picos y colocados en una caja de Petri con *S. aureus*, se observaron zonas de inhibición del crecimiento bacteriano para las fracciones pertenecientes a los picos A y D, (Figura 7, marcados como 1 y 2). Las restantes fracciones no mostraron actividad antibacteriana. Aunque la cantidad de proteína del pico B es mayor que la del pico de la fracción D, este pico no mostró ninguna actividad antibacteriana.

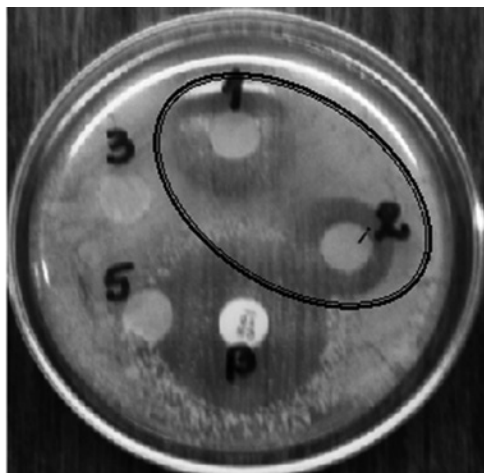


Figura 7. Inhibición de crecimiento de *S. aureus*. B, Control positivo con oxitetraciclina; 1, 2, 3 y 5 fracciones A, D, E y F, respectivamente

Los halos de inhibición de las fracciones pertenecientes a los picos A y D son relativamente más pequeños que el mostrado por la fracción 4 de la cual ellos fueron obtenidos (Figura 5), esto podría indicar que hay un efecto sinérgico de estas dos fracciones. Nosotros no conocemos si las fracciones A y D están compuestas de diferentes péptidos o estas fracciones pertenecen a un solo péptido.

4. DISCUSIÓN

La hemolinfa de los insectos que es el equivalente a la sangre en los mamíferos es la encargada de transportar las células inmunes y una batería de péptidos y proteínas para la defensa del insecto de microorganismos invasores. Estas moléculas constituyen factores claves de la respuesta inmune innata humoral de estos organismos. En este estudio nosotros mostramos que el reto inmunológico con *S. aureus* de las larvas de *G. mellonella* que están en el último estadio larval induce un cambio en los niveles de la hemolinfa (figura 1). Este cambio en la inducción lo pudimos constatar 24 horas después de realizar el reto inmunológico. Los análisis de los efectos de la inhibición del crecimiento de *S. aureus* nos mostraron que la hemolinfa de larvas retadas no permitieron la fermentación del medio de cultivo, encontrándose una menor turbidez en los tubos en los cuales se adicionó la hemolinfa retada (Figura 1). Nuestros resultados muestran que la hemolinfa sin reto no mostró actividad antibacteriana (datos no mostrados). Este mismo fenómeno ha sido observado en la hemolinfa obtenida de otros insectos como las abejas (B et al., 2013). Aunque, la actividad

antibacteriana de la hemolinfa sin reto, sí se ha podido observar en otros organismos (Myriapoda, 2009; Al, 2010). El cambio observado en la hemolinfa retada estuvo marcado por un aumento en la expresión de las proteínas o péptidos de bajo peso molecular. Este mismo comportamiento ha sido reportado en estudios previos con *Drosophila melanogaster* y *Onthophagus taurus* en donde se ha evidenciado la presencia de nuevas moléculas inmunes después del reto con *M. luteus* y *E. coli* (Verleyen et al., 2006; B et al., 2013). Mediante la cromatografía por gravedad (SPE) se pudo observar que sólo la fracción 4 tuvo actividad antimicrobiana (Figura 2). Esta fracción posee un patrón de proteínas de bajo peso molecular diferente al de la hemolinfa sin reto o la hemolinfa retada que no ha sido purificada por resina C18 (Figura 2). Este patrón podría deberse a la menor hidrofobicidad de esta fracción ya que es obtenida con la mezcla 70:30. La polaridad de los péptidos presentes en la fracción 4 se volvió a evidenciar cuando esta fracción fue sometida nuevamente a la columna C18 en fase reversa, en la cual los picos eluyeron a bajas concentraciones de acetonitrilo (Figura 3). La elución de péptidos hidrofílicos provenientes de hemolinfa de insectos como *D. melanogaster* concuerda con nuestros resultados (Uttenweiler-Joseph et al., 1998). Nosotros no tenemos evidencia experimental para relacionar esta actividad antimicrobiana a un solo péptido. Sin embargo, nuestros hallazgos indican que hay moléculas anti *S. aureus* en la hemolinfa de las larvas retadas que inhibieron el crecimiento de las bacterias en dos diferentes ensayos como fueron la dilución en caldo y inhibición por difusión. Nuestros resultados ofrecen una gran posibilidad de obtener moléculas que son capaces de combatir a una bacteria hipervirulenta la cual incorpora diferentes mecanismos para su resistencia (Benson et al., 2014).

5. CONCLUSIONES

Nuestras conclusiones son que el potencial antibacterial de la hemolinfa, se debe a la presencia de los péptidos que se aumentaron con el reto inmunológico, estos deben ser investigados con el fin de aislarlos para tener nuevas moléculas con actividad antibiótica. Se deben realizar más esfuerzos con el fin de mejorar los pasos de purificación hasta llegar a la obtención de péptidos individuales en las fracciones, con el fin de obtener las secuencias de estos y poderlos producir por tecnologías como el DNA recombinante o síntesis química.

6. AGRADECIMIENTOS

Al Grupo de Inmunología e Inmunogenética de la Universidad de Antioquia, especialmente a la Profesora Blanca Lucía Ortiz Reyes, por la colaboración brindada para esta investigación.

A la profesora Nora Restrepo, adscrita al Instituto de Química de la Universidad de Antioquia, por su colaboración en el trabajo.

Al profesor Carlos Alberto Peláez Jaramillo, por la oportunidad brindada para llevar a cabo este trabajo de investigación.

A la Universidad de Antioquia Estrategia de Sostenibilidad 2011-2012.

7. REFERENCIAS

- Al., L.G.E. (2010). Antibacterial Potential of Haemolymph and Aqueous Extraction of Red Velvet Mite, *T. Grandissimum*. *J Biomed Sci Res* **2** : 250–253.
- B, V.P.H., Y, S.K.B., and Kumar, S. (2013). Isolation and partial purification of antimicrobial peptides / proteins from dung beetle , *onthophagus taurus* immune hemolymph. **2**: 2414–2418.
- Benson, M.A., Ohneck, E.A., Ryan, C., Alonzo, F., Smith, H., Narechania, A., *et al.* (2014) Evolution of hypervirulence by a MRSA clone through acquisition of a transposable element. *Mol Microbiol* **93**: 664–81.
- Burk, D.L., and Berghuis, A.M. (2002). Protein kinase inhibitors and antibiotic resistance. *Pharmacol Ther* **93**: 283–292.
- Campagna, S., Saint, N., Molle, G., and Aumelas, A. (2007). Structure and mechanism of action of the antimicrobial peptide piscidin. *Biochemistry* **46**: 1771–8.
- Casanova-Torres, Á., and Goodrich-Blair, H. (2013). Immune Signaling and Antimicrobial Peptide Expression in Lepidoptera. *Insects* **4**: 320–338.
- Cohen, M.L. (1992). Epidemiology of drug resistance: implications for a post-antimicrobial era. *Science* **257**: 1050–5.
- Edwards, B., Andini, R., Esposito, S., Grossi, P., Lew, D., Mazzei, T., *et al.* (2014). Treatment options for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection: Where are we now? *J Glob Antimicrob Resist* **2**: 133–140.
- Fischbach, M.A., and Walsh, C.T. (2009). Antibiotics for emerging pathogens. *Science* **325**: 1089–1093.
- Gillespie, J.P., Kanost, M.R., and Trenczek, T. (1997). Biological mediators of insect immunity. *Annu Rev Entomol* **42**: 611–43.
- Lemaitre, B., and Hoffmann, J. (2007). The Host Defense of *Drosophila melanogaster*.

- Lowy, F.D. (2003). Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest* **111**: 1265–73.
- Luplertlop, N., Surasombatpattana, P., Patramool, S., Dumas, E., Wasinpiyamongkol, L., Saune, L., *et al.* (2011). Induction of a peptide with activity against a broad spectrum of pathogens in the *Aedes aegypti* salivary gland, following Infection with Dengue Virus. *PLoS Pathog* **7**: e1001252.
- Myriapoda, D. (2009). Soil organisms. **81**: 413–429.
- Ryan, L., Lamarre, B., Diu, T., Ravi, J., Judge, P.J., Temple, A., *et al.* (2013). Anti-antimicrobial peptides: folding-mediated host defense antagonists. *J Biol Chem* **288**: 20162–72.
- Schoofs, L., Holman, G.M., Hayes, T.K., Nachman, R.J., and Loof, A. De. (1990). Locust-tachykinin I and II, two novel insect neuropeptides with homology to peptides of the vertebrate tachykinin family. *FEBS Lett* **261**: 397–401.
- Shai, Y. (2002). Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Biopolymers* **66**: 236–48.
- Theuretzbacher, U. (2013). Global antibacterial resistance: The never-ending story. *J Glob Antimicrob Resist* **1**: 63–69.
- Uttenweiler-Joseph, S., Moniatte, M., Lagueux, M., Dorsselaer, A. Van, Hoffmann, J.A., and Bulet, P. (1998). Differential display of peptides induced during the immune response of *Drosophila*: a matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry study. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 11342–7
- Verleyen, P., Baggerman, G., D’Hertog, W., Vierstraete, E., Husson, S.J., and Schoofs, L. (2006). Identification of new immune induced molecules in the haemolymph of *Drosophila melanogaster* by 2D-nanoLC MS/MS. *J Insect Physiol* **52**: 379–388.
- Zdybicka-Barabas, A., and Cytryńska, M. (2011). Involvement of apolipoprotein III in antibacterial defense of *Galleria mellonella* larvae. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **158**: 90–8.

Referencia	Fecha de recepción	Fecha de aprobación
Olga Lucía Calderón-Gutiérrez, Beatriz Henao-Murillo, Carlos Peláez-Jaramillo, Edwin Patiño-González. Análisis de la actividad antibacteriana de fracciones de hemolinfa de larvas de insecto <i>G. Mellonella</i> contra <i>S. Aureus</i> Revista Tumbaga. (2014), 9 Vol. I, 69-82	Día/mes/año 08/05/2013	Día/mes/año 01/09/2013