

Generación de anión superóxido O_2^- en respuesta a zymosan (β , 1-3 glucanos), activador de la respuesta inmune en la cochinilla fina del nopal (*Dactylopius coccus*: Homóptera)

Fernando García,¹ Alejandra Calzada,¹ Cecilia Rangel,¹ Gala Castro,³
Humberto Lanz,³ Ignacio del Río⁴ y Fidel Hernández^{2,1}

¹Universidad Simón Bolívar, México, D. F., ²Cinvestav-IPN, México, D. F., ³CISEI-INSP, México, D. F.,
⁴Colorantes Naturales de Oaxaca "Tlapanocheztli", Oaxaca

Resumen

*Durante la melanización, mecanismo central de la respuesta inmune de los insectos, se generan especies reactivas de oxígeno (Reactive Oxygen Species, ROS), que tienen actividad citotóxica y pueden eliminar a microorganismos invasores. En la cochinilla del nopal *Dactylopius coccus*, insecto productor del ácido carmínico (carmín), poco se sabe de los componentes de la respuesta inmune. En este trabajo, identificamos la formación de anión superóxido (O_2^-) en la hemolinfa y células de cuerpo graso de *D. coccus*, en respuesta a la presencia de zymosan, un componente de la pared celular de hongos y levaduras. Los resultados indican que el carmín es usado en esta especie de insecto como sustrato en las reacciones de la melanización, con formación de O_2^- .*

Palabras clave: *Dactylopius coccus*; melanización; anión superóxido (O_2^-); especies reactivas de oxígeno (ROS); fenoloxidasa (FO); cochinilla del nopal.

Abstract

*Reactive oxygen species (ROS) are generated during melanization a central process of insect immune response. These compounds have been implicated as cytotoxic acting against microorganisms invading. In this report we demonstrated the anion superoxide (O_2^-) generation in the hemolymph and fat body cells of *Dactylopius coccus* (carmine cochineal), in response to Zymosan (microbial yeast and fungi cell wall component) presence furthermore, we observed that the carminic dye to generate ROS and was used as substrate in tirosinase mediated melanization reactions.*

Keywords: *melanization; carminic acid dye; cytotoxic molecules; Dactylopius coccus.*

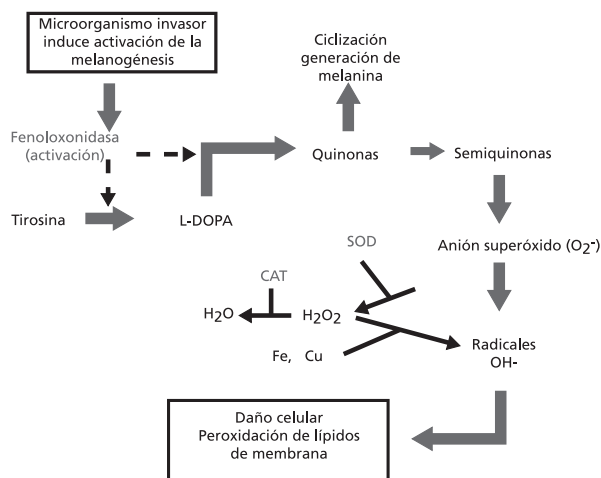
Introducción

La respuesta inmune de los insectos es innata y se caracteriza por ser inducible, carecer de memoria y ser inespecífica. En ella participan barreras físicas como los epitelios y, además, tiene mecanismos efectores celulares y humorales. En la respuesta innata celular participan fagocitos, en tanto que para la humoral se producen sustancias antimicrobianas. En la hemolinfa de los insectos están presentes células llamadas hemocitos, las cuales cumplen varias funciones, que incluyen reconocer y adherir a su superficie bacterias y parásitos invasores, así como recubrirlos de melanina para, posteriormente, eliminarlos mediante fagocitosis (Nappi, Carton y Vass, 1992).

La melanización es el sistema más importante de la respuesta humoral, en ella se genera el polímero de melanina, la cual recubre a los agentes invasores y coordina los distintos tipos de respuesta y, durante este proceso, se producen compuestos citotóxicos (Nappi, Vass, Frey y Carton, 2000). Para la formación de la melanina, se requiere de la activación de enzimas que actúan en cascada, usando como sustrato inicial la L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA), un producto de la hidroxilación del aminoácido tirosina (Chase, Raina, Bruno y Sugumaran, 2000). Durante el proceso, se genera una serie de compuestos químicos intermediarios, tales como quinonas, semiquinonas y compuestos fenólicos

trihidroxilados, los cuales tienen la habilidad de combinarse con compuestos nucleófilos y generar las llamadas *especies reactivas de oxígeno* (ROS), tales como el anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radicales hidroxilo ($\cdot OH$), las cuales son capaces de destruir agentes infecciosos (Sugumaran y Nellaiappan, 1991). Particularmente, el anión superóxido es capaz de producir daño oxidativo bajo dos formas: convirtiéndose en peróxido de hidrógeno, formado por la acción reductora de la enzima superóxido dismutasa (SOD), y reduciendo completamente complejos metálicos que interaccionan con H_2O_2 (Figura 1) (Carton y Nappi, 1992).

Figura 1. La formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en los insectos en asociación con la melanización



La melanización requiere de la activación de la fenoloxidasas. Quinonas derivadas de la L-DOPA son deficientes de electrones y en presencia de compuestos nucleofílicos se ciclan formando a los precursores de la melanina. Las semiquinonas, productos de la síntesis de la melanina, reducen al oxígeno molecular produciendo anión superóxido (O_2^-) e incrementando los niveles de peróxido de hidrógeno (H_2O_2). En la presencia de metales como el hierro (Fe) y cobre (Cu) se forman radicales hidroxilo ($\cdot OH$) altamente tóxicos. Los tejidos del huésped producen catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD) para protegerlo del anión superóxido.

La grana fina (*Dactylopius coccus* Costa), insecto parásito del nopal que se cultiva para obtener ácido carmínico (colorante rojo de uso comercial) (Llenderal y Nieto, 1999), que es una molécula tricíclica aromática del grupo de las antraquinonas, que posee tres grupos hidroxilo en su estructura y que está unida a una glucosa mediante enlaces covalentes (Schmitt y Günter, 1984). El carmín está presente en la hemolinfa (HL), hemocitos y células de cuerpo graso (cromatocitos) del insecto, y se

consume ante la presencia de componentes microbianos (Hernández, García, Rojas, Hernández y Lanz, 2003; García, Aguilar, Celma, Lanz, Del Río y Hernández, 2003). El ácido carmínico está contenido en gránulos en células del cuerpo graso que, cuando entran en contacto con componentes propios de la pared celular bacteriana y de hongos, como el zymosan y la laminarina, entre otros, se liberan y su contenido se ennegrece, lo que sugiere una reacción similar a la melanización, la cual podría, además, depender de la ruta de la fenoloxidasas (FO) (Hernández *et al.*, 2003).

Del mismo modo, cuando a la HL de *D. coccus* se le agregan zymosan o péptidoglicanos, se activa la reacción de melanización con consumo del carmín. Sin embargo, cuando la HL es tratada con feniltiourea (FTU), un inhibidor específico de la FO, se inhibe el consumo de carmín y el oscurecimiento de la HL, lo que indica que el carmín es metabolizado por la FO. Una hipótesis que deriva de estas observaciones es que el pigmento, dada su estructura química, puede sufrir reacciones de oxidoreducción que generen especies ROS (García, Lanz, Rojas y Hernández, 2002).

Objetivo

La finalidad de este trabajo fue investigar si las células de cuerpo graso y HL de *D. coccus* producen O_2^- ante la presencia de zymosan, así como demostrar que el carmín es un generador de ROS.

Metodología

Reactivos. Los reactivos utilizados en este trabajo fueron de la más alta calidad y se obtuvieron de las compañías Sigma Chemical Co. (St. Louis Missouri) e Invitrogen™-Life Technologies, USA.

Insectos. Para este trabajo se utilizaron insectos adultos hembras de la especie *D. coccus*, cultivados en módulos de experimentación tipo cobertizo (Hernández *et al.*, 2003), ubicados en Coyotepec, Oaxaca, en terrenos de la compañía productora de grana Tlapanochestli (www.aztecolor.com).

Obtención de hemolinfa y células de cuerpo graso. La hemolinfa de *D. coccus* (HL) se obtuvo por medio de perfusión del hemocele del insecto con solución

salina amortiguadora de fosfatos (PBS 1X pH 7.3). La suspensión pigmentada se centrifugó a 1000 x g durante 5 min. El sobrenadante fue recuperado en tubos de microfuga y se utilizó para ensayos *in vitro* de detección de anión superóxido (O_2^-). La pastilla fue recuperada y resuspendida en 250 μ l de medio de cultivo para células de insecto (Grace; Sigma Chemical Co.).

Ensayos de detección de O_2^- en células de cuerpo graso y HL. Para la observación microscópica de la presencia de anión O_2^- , se tomaron 50 μ l de la suspensión de células y se colocaron sobre cubreobjetos impregnados con medio Grace, las preparaciones se incubaron a temperatura ambiente durante 10 min. Posteriormente, se verificó la presencia de O_2^- en hemolinfa y células de cuerpo graso a través de la reducción del colorante [4,5 dimetilthiazolil-2]-2,5 difenilbromuro de tetrazolium (MTT) (Sigma Chemical Co.), para este fin 2.8 mM de MTT se agregaron 50 μ l de HL obtenida por perfusión (46 μ g de proteína/ml) (Lanz *et al.*, 2002).

Para detectar la producción de anión O_2^- en la fase soluble de la HL, las muestras, previamente activadas con 10 μ l de zymosan (2 mg/ml) (Sigma Chemical Co.), fueron colocadas en una placa de polipropileno de 96 pozos e incubadas durante 30 min en oscuridad. Posteriormente, se leyó la absorbancia de la placa a 540 nm en un lector de ELISA (Labsystems Multiskan, Viena, Virginia). Para comprobar que se produce O_2^- como resultado de la melanización, se midió la reducción de MTT después de aplicar 120 U de la enzima SOD, inactivador específico del anión. Los experimentos se realizaron por triplicado. Muestras de HL en ausencia de MTT fueron introducidas como blanco.

Por otra parte, para identificar la presencia de O_2^- en células de cuerpo graso, las células se activaron con 5 μ l de zymosan (2 mg/ml) y, posteriormente, se les adicionaron 15 μ l de MTT 2.8 mM. Las células se incubaron a temperatura ambiente durante 10 min. Cada una de las preparaciones se observó bajo un microscopio óptico invertido (LEICA-DMLS) y se fotografiaron con un equipo Pentax 2X-M.

Ensayo de actividad de tirosinasa. Para evaluar si el carmín es un sustrato susceptible de oxidación por enzimas del tipo monoxigenasas (polifenoloxidasas) como la tirosinasa y, por tanto, un precursor potencial de síntesis de la melanina y de especies ROS, se realizó un ensayo de actividad usando tirosinasa

comercial purificada de *Agaricus bisporus* (Sigma Chemical Co.), empleando como sustrato 0.5 mg de carmín purificado (Sigma Chemical Co.) disueltos en 50 μ l de agua o 50 μ l del sobrenadante soluble en agua de 1 mg/ml de cochinilla seca pulverizada. A modo de control positivo, se usaron 4 mg/ml de L-DOPA, como sustrato precursor de melanina. Los 50 μ l de las soluciones de carmín se completaron con 100 μ l y se colocaron en reacciones independientes contenidas en una placa de 96 pozos (Falcon). A cada una de las muestras se les adicionaron 100 U de Tirosinasa, luego se incubaron a 37 °C durante 30 min y se leyeron a 420 nm (valores de $Abs_{400-500\text{ nm}}$ son indicadores de diversos tipos de melanina) (Ozeki, Ito y Wakamatsu, 1996), en un lector de placas de ELISA (Labsystems Multiskan). Los experimentos se realizaron por triplicado.

Análisis estadístico. El promedio y las desviaciones estándar de los diferentes grupos experimentales fueron comparados usando la prueba ANOVA de una sola vía, en donde la F_C fue comparada mediante una prueba de Tukey-Kramer ($P < 0.05$) (Fry, 1996).

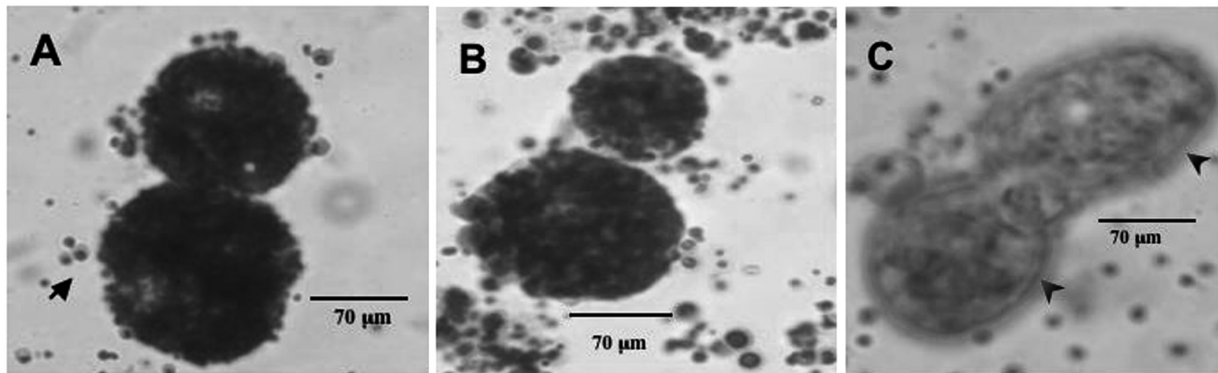
Resultados

Detección de O_2^- en células de cuerpo graso y hemolinfa. Con el fin de detectar la formación de anión superóxido en las células, se observó al microscopio la reacción del MTT, el cual, en presencia del radical, cambia de amarillo a azul violáceo (Lanz *et al.*, 2002). El zymosan indujo cambios en la coloración de las células de cuerpo graso de *D. Coccus*, tanto en la superficie, como en los gránulos contenidos en el interior (Figura 2). Las células de cuerpo graso incubadas sólo con el MTT no mostraron cambios en la coloración respecto a los activados con zymosan. Complementariamente, en un ensayo espectrofotométrico, se observó que el MTT fue reducido por la HL previamente activada con zymosan. Las reacciones fueron inhibidas en 63.5% por la enzima SOD, lo cual demuestra que el cambio se debió a la presencia del anión O_2^- generado. Esto indica que en ambos grupos de experimentos hay mecanismos enzimáticos generadores de ROS (Figura 3).

Actividad de tirosinasa sobre el carmín. En los insectos, el paso inicial de la síntesis de la melanina se genera por la oxidación de la L-Dopa a dopaquinona (precursor monomérico de la melanina), por la

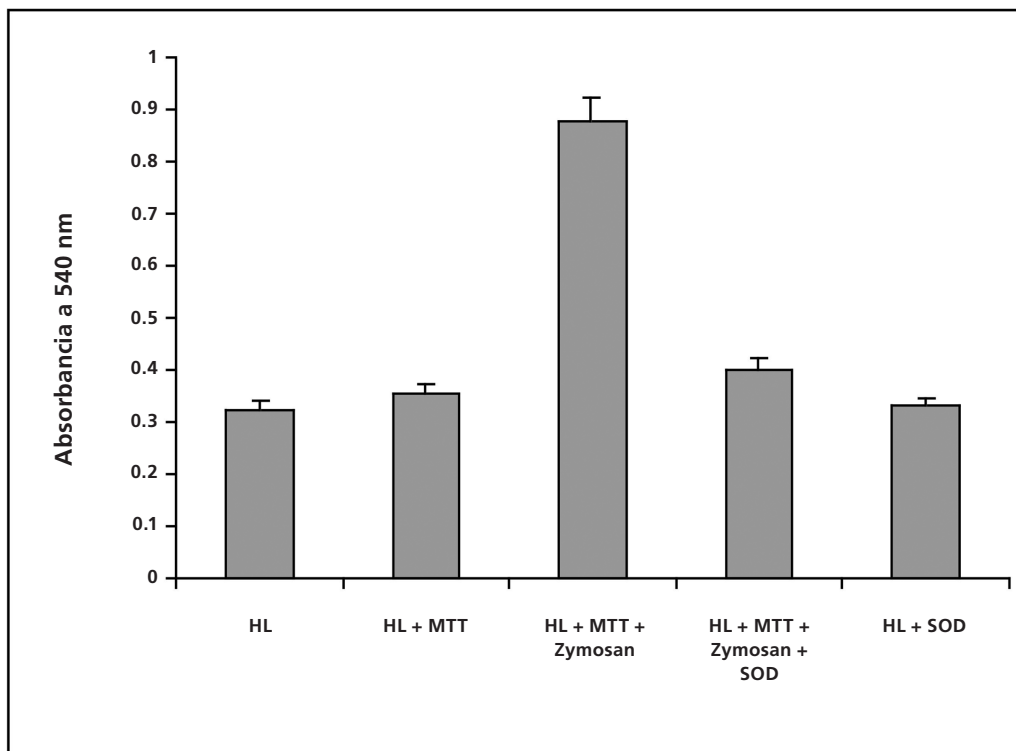
actividad de una monooxigenasa (enzimas tipo tirosinasa). En los ensayos espectrofotométricos, al carmín se le incubó con tirosinasa purificada de hongo (*Agaricus bisporus*) y se detectó un aumento en la absorbancia a 420 nm, indicativa de la formación de melanina (Figura 4).

Figura 2. Detección de anión superóxido (O_2^-) en las células de cuerpo graso de *D. coccus*



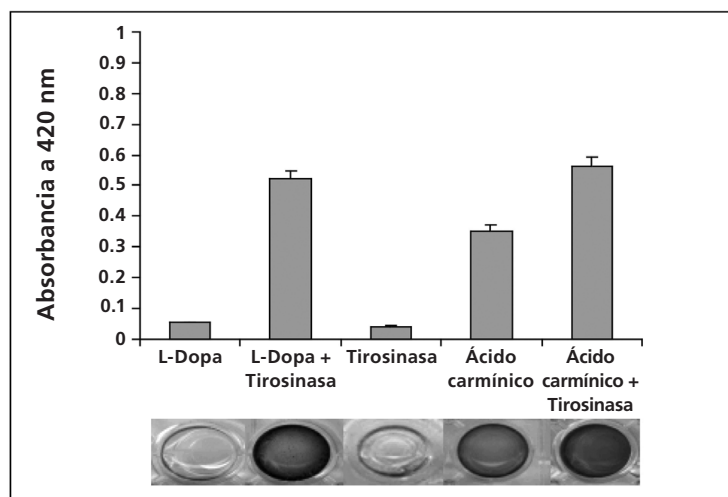
Panel A. Células de cuerpo graso. Panel B. Células de cuerpo graso + MTT. Panel C. Células de cuerpo graso activadas con zymosan en presencia de MTT. Las flechas indican la producción de O_2^- identificado por la reacción azul violáceo del MTT.

Figura 3. Medición espectrofotométrica de anión superóxido (O_2^-) generada en la HL de *D. coccus* por reducción del MTT



La reacción fue inhibida en un 63.5% por SOD (150 U). HL.- Hemolinfa. SOD.- Superóxido dismutasa. MTT.- [4,5 dimetilthiazolil-2]-2,5 difenilbromuro de tetrazolium ($F=14.14$, $P<0.05$, $n=4$).

Figura 4. Medición espectrofotométrica de la actividad de tirosinasa empleando un colorante carmín extraído de grana cochinilla seca (*Dactylopius coccus*) (F=16.91, P<0.05, n=4)




Discusión

En este trabajo se identificó que en la cochinilla del carmín (*D. coccus*) se producen moléculas citotóxicas, probablemente como mecanismo de defensa, en respuesta al reconocimiento de los componentes de la superficie de microorganismos invasores. Las células de cuerpo graso produjeron anión superóxido (O_2^-), que es una especie reactiva de oxígeno (ROS), al mismo tiempo que desapareció el carmín y apareció la melanina, lo que soporta nuevamente la hipótesis de la conversión del carmín a melanina.

La producción de O_2^- en los insectos ha sido reportada en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* (Nappi, Vass, Frey y Carton, 1995); en insectos vectores del género *Anopheles* (Lanz *et al.*, 2002), y en las larvas de lepidópteros como *Pseudoplusia includens* (Pech y Strand, 1995). En todos estos casos se ha demostrado que los compuestos precursores de la melanización son moléculas que al oxidarse generan las ROS. En otros insectos, se observó que la generación de ROS puede acoplarse a la producción de moléculas llamadas *especies reactivas de nitrógeno* (RNS), las cuales también vale la pena estudiar, por su potencial de actividad citotóxica ante microorganismos invasores. Por otra parte, es posible que éstas también jueguen un papel fundamental en la regulación de los mecanismos de transducción de señales involucrados en la regulación de péptidos antimicrobianos (Nappi *et al.*, 2000). En *Drosophila*, se ha demostrado que los factores de transcripción miembros de la vías *Rel* e *Imd* son activados por ROS y RNS, esto muestra que funcionan como mensajeros químicos además de componentes citotóxicos en el arsenal inmune de los insectos (Nappi y Vass, 2000).

Por otra parte, en *D. coccus*, los resultados sugieren fuertemente que el carmín, que químicamente es una antraquinona con tres grupos hidroxilo (OH^-) (Ackacha, Poléc-Pawlak y Jarosz, 2003), es una molécula potencialmente generadora de ROS. Además, estudios recientes realizados en cultivos de líneas celulares de ratón han demostrado que la unión de complejos de cationes como el Fe^{2+} con compuestos aromáticos polihidroxifenólicos derivados de la L-DOPA y otras catecolaminas son fundamentales para contener el crecimiento de patógenos invasores durante la respuesta inmune innata (Sorrentino, Small y Govind, 2002). Dada la conservación de los mecanismos de la respuesta innata, sería factible que, durante la melanización, estos complejos se formen también en los insectos y cumplan con una función de defensa. En este caso, sería importante demostrar el efecto microbicida de las ROS en la hemolinfa de *D. coccus*, como se ha hecho en *Drosophila*, en el mosquito *Anopheles gambiae* y en larvas de algunos Lepidópteros (Vizioli, Richman, Uttenweiler, Blass y Bulet, 2001).

Estudios realizados anteriormente por nuestro grupo demostraron la presencia del gen de la FO en *D. coccus*, lo que sugiere que esta enzima podría estar participando en los mecanismos de melanización de este insecto (García *et al.*, 2003). En este reporte se demostró que la tirosinasa puede usar al carmín como sustrato y producir un compuesto similar a la melanina. Para verificar que los productos generados de este modo, es decir, que utilizaron como sustratos a la L-DOPA y al carmín, son melanina, se sometieron a una hidrólisis alcalina empleando NaOH al 0.1% y en presencia de 0.05% de H₂O₂, lo que generó fragmentos que se evaluaron espectrofotométricamente a 325nm (Wakamatsu e Ito, 2002) (datos no mostrados). Este resultado demostró que el producto es melanina, sin embargo, queda por aclarar si se forman eu- o alomelaninas. Estos resultados, además, sugieren la presencia de una FO en *D. coccus*, con propiedades catalíticas similares a las descritas en otros grupos de insectos.

Actualmente, trabajamos para probar la función del anión superóxido y otras moléculas citotóxicas producidas por la cochinilla fina del nopal sobre microorganismos. 

Referencias

- Ackacha, M., Poléc-Pawlak, K. & Jarosz, M. (2003). Identification of anthraquinone coloring matters in natural red dyestuffs by high performance liquid chromatography with ultraviolet and electrospray mass spectrometric detection. *Journal Separation Science*, 26, 1028-1034.
- Carton, Y. & Nappi, A. J. (1992). Inheritance of cellular immune resistance in *Drosophila melanogaster*. *Heredity*, 69, 393-399.
- Chase, M. R., Raina, K., Bruno, J. & Sugumaran, M. (2000). Purification, characterization and molecular cloning of prophenoloxidases from *Sarcophaga bullata*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 30, 953-967.
- Fry, J. (1996). One way analysis of variance. In: Fry J. (Ed.) *Biological data analysis. A practical approach series* (pp. 1-11). Oxford: Oxford University Press.
- García, G. F., Aguilar, P., Celma, A., Lanz, H., Del Río, I. y Hernández, F. (2003). Identificación y caracterización del gen de la enzima profenoloxidasa en *Dactylopius coccus*. *Investigación Universitaria Multidisciplinaria, Universidad Simón Bolívar*, 2, 12-17.
- García, G. F., Lanz, H., Rojas, A. y Hernández, F. (2002). Efecto de los inhibidores de la síntesis de prostaglandinas en la coagulación del homóptero *Dactylopius coccus* (cochinilla del nopal). *Investigación Universitaria Multidisciplinaria, Universidad Simón Bolívar*, 1, 15-19.
- Hernández, H. F., García, G. F., Rojas, M. A., Hernández, M. S. & Lanz, M. H. (2003). Carminic Acid Dye from the Homopteran *Dactylopius coccus* Hemolymph Is Consumed During Treatment with Different Microbial Elicitors. *Arch. Insect Biochem. and Physiol.*, 54, 37-45.
- Lanz, M. H., Hernández, M. S., Ku, L. M., Rodríguez, M., Herrera, O. & Rodríguez, M. H. (2002). Superoxide Anion in *Anopheles albimanus* hemolymph and midgut is toxic to *Plasmodium berghei* ookinetes. *J. Parasitol.*, 88, 702-706.
- Llenderal, C. y Nieto, R. (1999). Características biológicas de la grana cochinilla del nopal (*Dactylopius coccus* Costa). En C. Llenderal y R. Nieto (Eds.). *Cria de la grana cochinilla del nopal para la producción de su pigmento* (pp. 23-30). México: Instituto de Fitosanidad, Colegio de Posgraduados.
- Nappi, A., Vass, E., Frey, F & Carton, Y. (2000). Nitric Oxide Involvement in *Drosophila* Immunity. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*, 4, 423-430.
- Nappi, A. J. & Vass, E. (2000). Cytotoxicity reaction associated with insect immunity: Signaling pathways and killing molecules. In G. Beck, Sugumaran and E. Koper (Eds.). *Phylogenetic Perspectives on the Vertebrate Immune system* (pp. 329-348). New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Nappi, A., Vass, E., Frey, F & Carton, Y. (1995). Superoxide anion generation in *Drosophila* during melanotic encapsulation of parasites. *Eur. J. Cell Biol.*, 68, 450-456.
- Nappi, A. J., Carton, Y. & Vass, E. (1992). Reduced cellular immune competence of temperature-sensitive dopadecarboxylase mutant strain of *Drosophila melanogaster* against the parasite *Leptopilina boulardi*. *Comp. Biochem. Physiol. B.*, 101, 453-460.
- Ozeki, H., Ito, S. & Wakamatsu, K. (1996). Chemical characterization of melanins in sheep wool and human hair. *Pigment Cell Res.*, 9, 51-57.
- Pech, L. L. & Strand, M. R. (1995). Encapsulation of foreign targets by hemocytes in the moth *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae) involves an RGD-dependent cell adhesion mechanism. *J. Insect Physiol.*, 41, 481-488.
- Schmitt, P. & Günter, H. (1984). A ¹H and ¹³C NMR Study of Carminic Acid. *Org. Mag. Res.*, 22, 446-449.
- Sorrentino, R. P., Small, C. N. y Govind, S. (2002). Quantitative analysis of phenol oxidase activity in insect hemolymph. *Biotechniques*, 32, 815-823.
- Sugumaran, M. & Nellaiappan, K. (1991). Lysolecithin a potent activator of prophenoloxidase from the hemolymph of the lobster, *Homarus americanus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 176, 1371-1376.
- Vizioli, J., Richman, A. M., Uttenweiler, J. S., Blass, C. & Bulet, P. (2001). The defensin peptide of the malaria vector mosquito *Anopheles gambiae*: antimicrobial activities and expression in adult mosquitoes. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 31, 241-248.
- Wakamatsu, K. & Ito, S. (2002). Advanced Chemical Methods in Melanin Determination. *Pigment Cell Res.*, 15, 174-183.