

Descripción inicial de las actividades de coagulación y hemoaglutinación de la hemolinfa de la cochinilla del nopal (*Dactylopius sp.*) y la almacenada por su depredador (*Laetilia coccidívora*)

Lorena González, Mónica Alba, Fernando García, Humberto Lanz, Alberto Rojas, Ignacio del Río y Fidel Hernández

RESUMEN

En este trabajo se describen las funciones de coagulación y aglutinación del sistema inmune de las cochinillas del nopal (Homóptera; Dactylopiidae), cuya hemolinfa (HL) contiene ácido carmínico: pigmento de interés comercial. Se observó que una reacción de coagulación de la hemolinfa es inducible por componentes de pared celular bacteriana y hongos, e interrumpida por inhibidores de serina y cisteína proteasas y de la fenoloxidasas. La hemolinfa de *Dactylopius sp.* almacenada por el depredador *Laetilia coccidívora* conserva la capacidad de coagulación. Se encontró que durante la coagulación, que involucra al ácido carmínico, se acumulan agregados fibrilares y que esta actividad depende de la profenoloxidasas. También se observó actividad de hemoaglutinación de la hemolinfa de *Dactylopius sp.*, lo cual sugiere la presencia de lectinas.

INTRODUCCIÓN

Los insectos denominados “cochinillas del nopal” pertenecen al género *Dactylopius* (Homóptera), son considerados parásitos de los cultivos de nopal (*Opuntia sp.*) y producen ácido carmínico. Se han descrito varias especies de cochinilla, pero generalmente son agrupadas en dos tipos: la grana fina (*D. coccus*), la cual es de reproducción moderada y alta productora de colorante –por lo que es cultivada para la obtención del carmín comercial–, y la grana silvestre (*Dactylopius sp.*), conformada por varias especies que se multiplican y dispersan rápidamente, y que además destruyen sus plantas huéspedes, lo que ocasiona considerables pérdidas económicas entre los productores de nopal, tuna y carmín (Llenderal y Nieto, 1999).

La introducción de partículas ajenas al cuerpo de los invertebrados activa los mecanismos de defensa inmune; sin embargo, las inmunoglobulinas o los tipos y receptores celulares específicos que caracterizan al sistema de los vertebrados no han sido detectados en los invertebrados (Hernández, Gollas y Vargas, 2000). En los artrópodos, los principales mecanismos inmunes conocidos son la fagocitosis, el sistema de la profenoloxidasas (proFO), el sistema de coagulación, la encapsulación, la melanización y la síntesis de péptidos antimicrobianos. Todos estos sistemas dependen de reacciones en cascada, las cuales son activadas por la presencia de componentes micóticos y bacterianos, como Lipopolisacá-

ridos (LPS), β 1,3 glucanos, además de otros componentes de la pared celular de estos organismos; y son bloqueados por inhibidores de proteasas y de síntesis de prostaglandinas (PGS) (Fig. 1) (Ashida y Yamazaki, 1990; Sugumaran y Kanost, 1991).

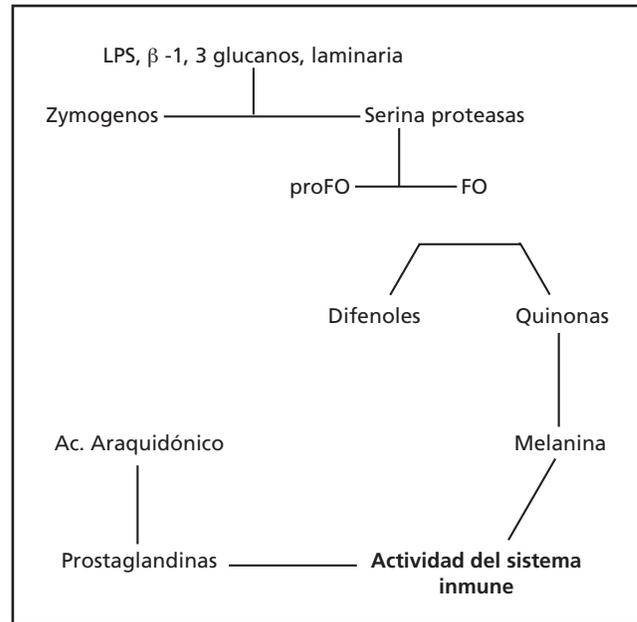
En la respuesta inmune en invertebrados participan proteínas capaces de reconocer azúcares denominadas lectinas, las cuales actúan, entre otras funciones, como moléculas de reconocimiento de agentes extraños. Estas moléculas son polivalentes y son capaces de aglutinar bacterias y eritrocitos (Azuma, M. *et al.*, 1996). En la cucaracha *Blaberus discoidalis* las lectinas también son capaces de activar el sistema de la proFO (Chen, Durrant, Newton y Ratcliffe, 1995).

El sistema inmune de la “cochinilla” ha sido poco estudiado; sin embargo, existe la propuesta de que el ácido carmínico, presente en la hemolinfa, realiza un papel, no definido, en la defensa del insecto (Eisner y Nowicki, 1980). A pesar de la posible actividad del ácido carmínico como agente defensivo de la “cochinilla”, el gusano telero (*Laetilia coccidivora*), predador importante de ésta, es capaz de tomar el colorante, almacenarlo en un divertículo de su tubo digestivo y posiblemente usarlo para su propio provecho (Eisner y Nowicki, 1980).

OBJETIVO

Por lo anteriormente expuesto, el objetivo de esta investigación es estudiar las respuestas de coagulación y hemoaglutinación en la hemolinfa de *Dactylopius sp.*, así como medir los efectos de activadores e inhibidores del mecanismo de la proFO y de la síntesis de la PGS en la respuesta de coagulación. Cabe señalar que durante el estudio se observó que la respuesta de coagulación se conserva en la hemolinfa pigmentada almacenada por *L. coccidivora*.

Fig. 1. Inmunidad en insectos



Los activadores LPS, β -1,3 glucanos y laminarina (componentes de pared celular bacteriana y hongos), activan una serie de reacciones enzimáticas en cascada (serina proteasas) que a su vez activan la profenoloxidasa (proFO) a su estado funcional: fenoloxidasa (FO). La FO actúa sobre compuestos fenólicos desencadenando una serie de reacciones químicas que culminan con la síntesis de melanina (Söderhall, Cerenius y Johansson, 1994).

MATERIAL Y MÉTODO

Reactivos: los reactivos utilizados en este trabajo fueron de la mejor calidad. Se obtuvieron de las compañías Sigma Chem. (St. Louis Missouri), y en el caso de los reactivos para electroforesis, de la BIO-RAD (Hércules, California).

Insectos: se utilizaron insectos de las especies *Dactylopius sp.* (cepa SC-1) y *L. coccidivora* (cepa LC-1) cultivados en módulos de experimentación tipo cobertizo, ubicados en Coyotepec, Oaxaca, en te-

rrenos de la compañía productora de grana Tlapanochestli.

Obtención de hemolinfa: la hemolinfa de *Dactylopius sp.* se obtuvo por medio de perfusión del hemocele del insecto con solución salina (NaCl a 0.9%). La suspensión pigmentada del divertículo de *L. coccidivora* se obtuvo por disección y ruptura del tubo digestivo en solución salina. Ambas suspensiones se centrifugaron a 1,000 xg durante 5 min.

Pruebas de coagulación: para estudiar la coagulación de la hemolinfa se diseñó un sistema *in vitro* que, en su forma final, consistió en lo siguiente: a muestras alícuotas de 100 µl de hemolinfa perfundida se les añadieron los activadores de la coagulación: galactosamina (25 µg/ml final), laminarina (25 µg/ml final), zymosan (25 µg/ml final) y LPS (10 µg/ml final), disueltos en solución salina (Lanz, Hernández, Garrido, Tsutsumi y Aréchiga, 1993). Las muestras se incubaron a 37 °C durante 2 min; posteriormente se centrifugaron a 10,000 rpm y se leyó la absorbancia del sobrenadante a 495 nm. Todos los ensayos se realizaron siempre por duplicado en juegos formados por alícuotas control y experimentales, que permitieron establecer comparaciones en las reacciones. Los valores de cada experimento se normalizaron 100% respecto a la muestra control interna.

En otros ensayos se estudió el efecto sobre la coagulación de la hemolinfa activada con laminarina del inhibidor de la síntesis de PGS Dexametasona (20 µg/ml); los inhibidores de serina proteasas tosil fenil clorometil cetona (TPCK) (10 mM) y tosil lisil clorometil cetona (TLCK) (10 mM) (Benyon y Salvesen, 1989); y el inhibidor de la fenoloxidasas, feniltiourea (PTU) (2 mM) (Lanz *et al.*, 1993).

Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS: los sobrenadantes de las pruebas de coagulación de la

hemolinfa se analizaron por electroforesis vertical en geles al 10% (PAGE-SDS 10%) siguiendo los métodos reportados por Smith (1989).

Hemoaglutinación: las pruebas de hemoaglutinación utilizando la hemolinfa de *Dactylopius sp.* y *L. coccidivora* se realizaron en placas de microtitulación de 25 pozos (Falcon), colocando muestras alícuotas de 100 µl de hemolinfa perfundida en cada pozo y añadiendo diferentes diluciones de eritrocitos de humano, ratón y conejo (Lanz, 1992).

RESULTADOS

- *El ácido carmínico de la hemolinfa de Dactylopius sp. y L. coccidivora se consume durante la reacción de coagulación.* Inicialmente, la hemolinfa pigmentada de *Dactylopius sp.* y *L. coccidivora* se incubó durante 30 min, en ausencia y presencia del activador galactosamina. En estas condiciones se apreció visualmente la desaparición del color rojo, por lo que se realizó el espectro de absorción en un rango de 400 a 800 nm. Se observó la disminución de la densidad óptica alrededor de 530 nm, lo que indicó la pérdida del colorante ácido carmínico del sobrenadante de la muestra (Fig. 2). Por otra parte, se observó que la reacción llega a término muy rápidamente, por lo que en ensayos posteriores la incubación duró sólo 2 min.

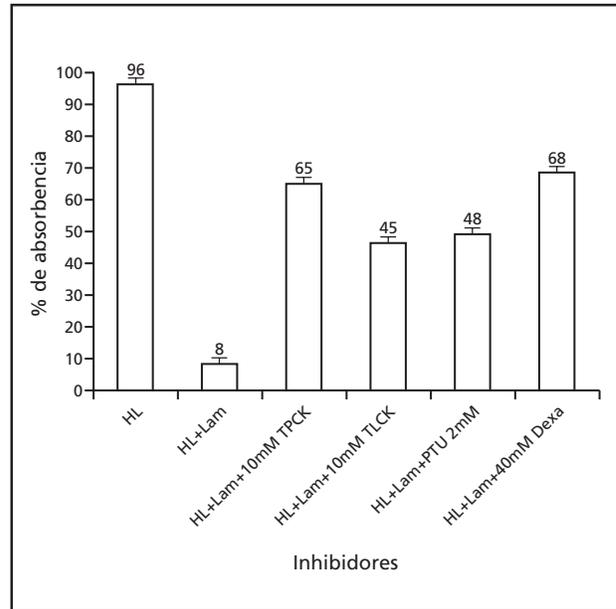
- *La coagulación de Dactylopius sp. se detiene usando inhibidores de serina y cisteina proteasas y de síntesis de prostaglandinas (PGS).* La hemolinfa de *Dactylopius sp.* se activó con 10 mM de laminarina, en presencia de los siguientes inhibidores de la respuesta inmune: TPCK, TLCK, PTU y Dexametasona. La absorbancia fue medida a 495 nm. Se observó la inhibición de la formación de coágulos y el mantenimiento del color en la muestra, lo que

sugiere que el mecanismo está relacionado con las cascadas de coagulación y de la proFO (Fig. 3).

- *Las proteínas de la hemolinfa son secuestradas durante la reacción de coagulación.* La hemolinfa se incubó con los inhibidores de proteasas: TPCK, TLCK y PTU. Posteriormente, se agregó laminarina (10 mM) a 37 °C durante 2 min; y las proteínas solubles de la hemolinfa se analizaron mediante PAGE-SDS. Se observó que en la hemolinfa control aparecen bandas en el rango de 70 a 30 kDa, en tanto que después de la reacción de coagulación sólo persiste un doblete de aproximadamente 35 kDa (Fig. 4).

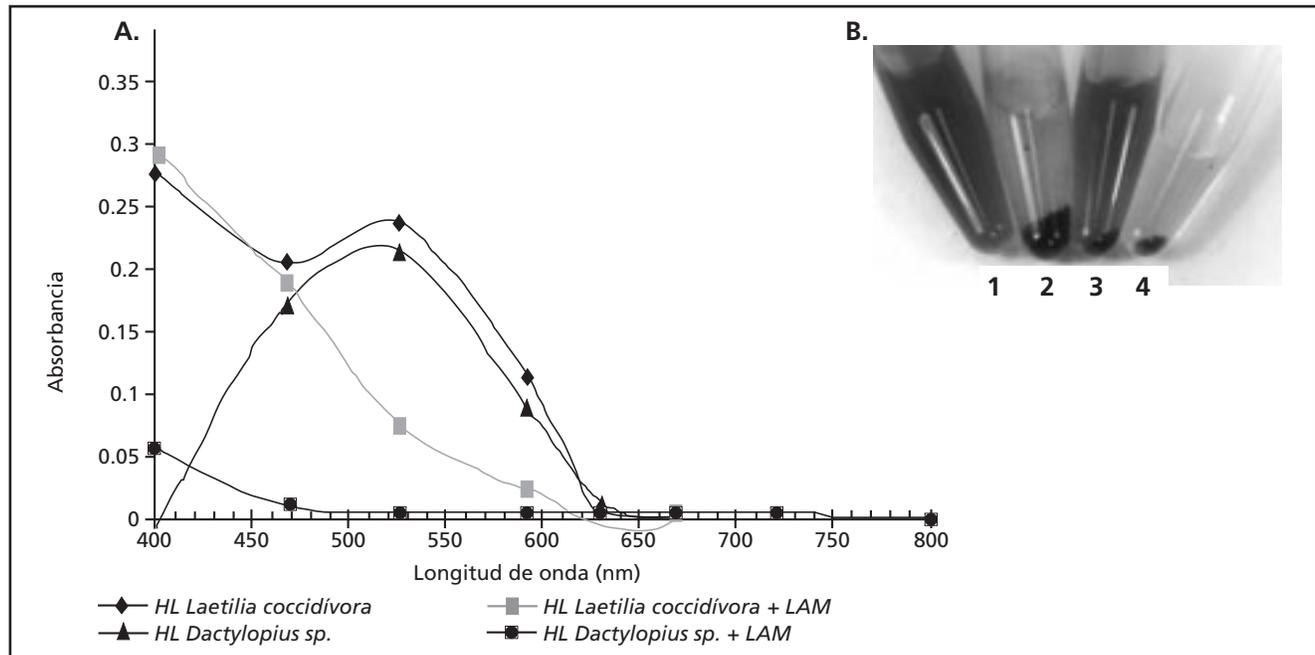
- *Ensayo de hemoaglutinación con hemolinfa de Dactylopius sp. y eritrocitos de humano, ratón y conejo.* En la placa de microtitulación se observó que la hemolinfa de *Dactylopius sp.* produce aglutinación con eritrocitos de humano, ratón y conejo (diluciones 1:2 a 1:16) sugiriendo, por lo tanto, la presencia de lectinas. (Fig. 5).

Fig. 3. Efecto de los inhibidores de la pFO y coagulación sobre la hemolinfa de *Dactylopius sp.*



HL.- Hemolinfa, lam.- laminarina, TPCK, TLCK.-inhibidores de serina y cisteína proteasas, PTU.- inhibidor de la fenoloxidasa (FO), Dexa.- Dexametasona.

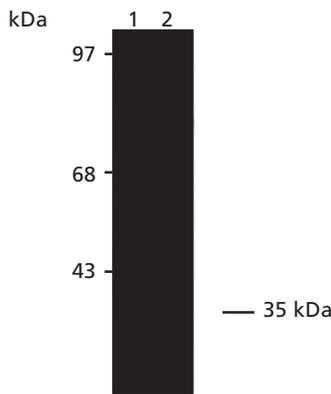
Fig. 2. Consumo del ácido carminico de la hemolinfa de *Dactylopius sp.* y *L. coccidivora* durante la respuesta inmune



A. La absorbancia se midió en un rango de 400 a 800nm. Se aprecia el consumo del ácido carminico (495 nm) cuando se agrega el activador.
B. Se observó macroscópicamente la formación de un agregado fibrilar (coágulo) que indica el secuestro de proteínas y consumo del colorante. De izquierda a derecha: Tubo 1: HL control. Tubo 2: HL de *Dactylopius sp.* + LAM a los 10 min de reacción. Tubo 3: HL de *L. coccidivora* + LAM a los 10 min de reacción. Tubo 4: HL de *L. coccidivora* + LAM a los 20 min de reacción.

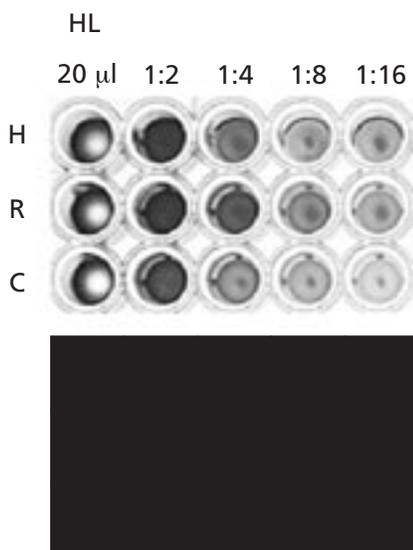
Los inhibidores del sistema de la proFO utilizados en la respuesta de coagulación de *Dactylopius sp.* (TPCK, TLCK, PTU y Dexametasona) no permitieron la formación de un coágulo. El colorante permaneció en la muestra, lo que sugiere que el mecanismo está relacionado con las cascadas de coagulación y de la proFO.

Fig. 4. Patrón electroforético de las proteínas solubles del plasma de *Dactylopius sp.*



Las proteínas solubles del plasma mostraron patrones de bandas conservadas entre 70 y 30 kDa mediante PAGE-SDS. Al incubar las proteínas en presencia de laminarina (10 mM a 37 °C durante 2 min) permanece un doblete de aproximadamente 35 kDa. Carril 1: proteínas del plasma incubadas en condiciones de coagulación pero en ausencia de laminarina. Carril 2: proteínas del plasma después de la coagulación inducida por laminarina.

Fig. 5. Ensayos de hemoaglutinación utilizando hemolinfa de *Dactylopius sp.*



La hemolinfa de *Dactylopius sp.* produce aglutinación con eritrocitos de humano, ratón y conejo sugiriendo, por lo tanto, la presencia de lectinas.

(H) humano, (R) ratón, (C) conejo, (*) control, (-/+) aglutinación escasa, (+) aglutinación.

DISCUSIÓN

En la hemolinfa de *Dactylopius sp.* se observó que el color rojo desaparece durante la coagulación activada por laminarina y galactosamina, y esto nos sugirió la posibilidad de usar la desaparición del carmín como un indicador de la reacción de la coagulación. Por este motivo el espectro de absorción de las muestras se hizo antes y después de la coagulación y se observó la desaparición de la absorbancia en el rango entre 490-550 nm lo cual corresponde a la absorbancia del ácido carmínico. En contraste, no se identificó coagulación o secuestro de carmín en presencia del activador LPS en el rango entre 50 µg y 1 mg.

Estas observaciones indican que en este insecto, como en otros artrópodos, la coagulación se activa por azúcares que son componentes regulares de la pared de hongos; sin embargo, la reacción no es inducida por LPS, componente de la pared de bacterias Gram (-), lo que contrasta con lo que ocurre en otros invertebrados (Ashida y Yamazaki, 1990). Asimismo la hemolinfa pigmentada recuperada de *L. coccidivora* sigue activa para realizar la coagulación por inducción con galactosamina, lo que sugiere que durante el almacenamiento en el depredador la hemolinfa no es modificada.

Para conocer la posible relación entre la coagulación de la hemolinfa de *Dactylopius sp.* y el sistema de la proFO, se estudió el efecto de inhibidores de este proceso en la coagulación. Se observó que la Dexametasona (200 - 250 µg), inhibidor de las primeras reacciones enzimáticas en la síntesis de prostaglandinas, bloqueó la coagulación de la hemolinfa en ambas especies, lo que demuestra que la coagulación y la ruta de la proFO en *Dactylopius sp.* dependen de prostaglandinas.

Tanto en la hemolinfa de *Dactylopius sp.*, como en la recuperada de *L. coccidivora*, los inhibidores de proteasas TLCK, TPCK y el inhibidor directo de la fenoloxidasa, PTU, bloquearon las reacciones en cascada de la proFO (Boigegrain, Matras, Bréhelin, Paroutaud y Coletti, 1992) y evitaron tanto la coagulación como el secuestro del ácido carmínico de la hemolinfa, tanto de *Dactylopius sp.* como de *L. coccidivora*, indicando la participación de la proFO en ambos procesos y sugiriendo que el ácido carmínico participa en la coagulación.

Por otra parte, la hemolinfa de *Dactylopius sp.* perdió la mayoría de las proteínas al formarse los coágulos, pero conservó algunas moléculas alrededor de 35 kDa. Cabe la posibilidad de que la formación del coágulo involucre a numerosas proteínas inmovilizándolas inespecíficamente.

Se ha propuesto que la respuesta inmune en invertebrados depende de la presencia de moléculas denominadas lectinas. Para conocer la presencia de moléculas de este tipo en la hemolinfa de *Dactylopius sp.* y en la hemolinfa recuperada de *L. coccidivora* se hicieron ensayos de hemoaglutinación que resultaron positivos, lo que sugiere la presencia de receptores específicos para azúcares, como ha sido descrito para *Manduca sexta* (Minnick, Rupp y Spence, 1986).

Quedan muchas cuestiones por confirmar con relación al papel de los componentes de la hemolinfa de *Dactylopius sp.*, tales como si el carmín tiene participación activa como metabolito en la interacción de las vías de coagulación y proFO de la cochinilla, lo cual es posible dado que se conoce que varios difenoles y quinonas, compuestos con grupos reactivos similares a los que posee el ácido carmínico, son sustratos de la FO y participan en la formación de coágulos y cápsulas (Söderhall *et al.*, 1994).

Por otra parte, cabe resaltar que el estudio de la hemolinfa de *Dactylopius sp.* –fuente del colorante ácido carmínico, de gran interés comercial–, así como los mecanismos de supervivencia del insecto, aportará nuevos conocimientos que podrán ser útiles para mejorar el cultivo y la producción de este valioso producto.*

BIBLIOGRAFÍA

- Azuma, M., Kojima, T., Yokoyama, I., Tajiri, H., Yoshikawa, K., Saga, S. y Del Carpio, C. A. (1999). Antibacterial activity of multiple antigen peptides homologous to a loop region in human lactoferrin. *J. Pept. Res.*, 54, 237-241.
- Ashida, M. y Yamazaki, H. (1990). *Biochemistry of the phenoloxidase system in insects: With special reference to its activation*. Berlin: Springer-Verlag.
- Benyon, R. y Salvesen, G. (1989). *Commercially available protease inhibitors*. En: Benyon, R. J. and Bond, J. S. (Eds.), *Proteolytic enzymes. A practical approach*, (pp. 241-249). Oxford: University Press.
- Boigegrain, R., Matras, H., Bréhelin, M., Paroutaud, P. y Coletti Previero, M. (1992). Insect immunity: two proteinase inhibitors from hemolymph of *Locusta migratoria*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 189, 790-793.
- Chen, C., Durrant, H., Newton, P. y Ratcliffe, N. (1995). A study of novel lectins and their involvement in the activation of the prophenoloxidase system in *Blaberus discoidalis*. *Biochemical Journal*, 310, 23-31.
- Eisner, T. y Nowicki, T. (1980). Red Cochineal Dye (Carmine Acid): Its role in nature. *Science*, 208, 1039-1041.
- Hernández López, J., Gollas, T. y Vargas Albores, F. (2000). El sistema de activación de la profenoloxidasa de crustáceos: un modelo de reconocimiento y defensa de los invertebrados. *Ciencia*, 51(1), 21-26.
- Lanz, C. J. (1992). *Inmunidad celular en crustáceos: caracterización morfofuncional de las células sanguíneas del acocil procambarus clarki*. Tesis de doctorado, Instituto Politécnico Nacional.
- Lanz, H., Hernández, S., Garrido Guerrero, E., Tsutsumi, V. y Aréchiga, H. (1993). Prophenoloxidase system activation in the crayfish *Procambarus clarki*. *Developmental and Comparative Immunology*, 17, 399-406.
- Llenderal, C. y Nieto, R. (1999). Características biológicas de la grana cochinilla del nopal (*Dactylopius coccus* Costa). En: Llenderal, C. y Nieto, R. (Eds.), *Cría de la grana cochinilla del nopal para la producción de su pigmento*, (pp. 23-30). México: Instituto de Fitosanidad, Colegio de Posgraduados.

*Este trabajo fue apoyado por la división de investigación de la Universidad Simón Bolívar, el laboratorio de Entomología Molecular del Departamento de Patología Experimental, CINVESTAV-IPN y el proyecto #990205 de CEGEPI.

- Minnick, M. F., Rupp, R. A. y Spence, K. D. (1986).
 A bacterial-induced lectin which triggers hemocyte
 coagulation in *Manduca sexta*. *Biochemical and
 Biophysical Research Communications*, 137, 729-735.
- Smith, J. (1989). Electrophoretic Separation of Proteins.
 En: Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D.,
 Seidman, J., Smith, J., y Struhl, K. (Eds), *Current protocols
 in molecular biology*, (10.2.1-10.2.9). Nueva York: Green
 Publishing and John Wiley and Sons.
- Söderhall, K., Cerenius, L. y Johansson, M. (1994).
 The prophenoloxidase activating system and its role in
 invertebrate defence. *Annals of the New York Academy
 of Sciences*, 15, 155-161.
- Sugumaran M. y Kanost, M. R. (1991). Regulation of Insect
 Hemolymph Phenoloxidases, *Biochem. Biophys. Res.
 Commun*, 176, 317-338.