

CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS DE HUEVECILLO Y LARVA DE MOSCA DOMÉSTICA *Musca domestica* Y SU POTENCIAL USO TERAPEUTICO

Moyira Osny Aquino-Gil¹, Carlos Josué Solórzano-Mata², Víctor Manuel Aquino-Gómez¹, Socorro Pina-Canseco⁴ Edgar Zenteno-Galindo³ y Yobana Pérez-Cervera². ¹Instituto Tecnológico de Oaxaca, Av. Ing. Victor Bravo Ahuja No. 125 esq. Calz. Tecnológico C.P. 68000, Oaxaca, Oax ²Facultad de Odontología UABJO, Av. Universidad S/N, Hacienda de 5 Señores, 68120 Oaxaca ³Facultad de Medicina, UNAM, Circuito Interior, Ciudad Universitaria, Av. Universidad 3000 C.P. 04510, México D.F. ⁴Facultad de Medicina, UABJO. Ex Hacienda de Aguilera s/n Carretera a San Felipe del Agua, Oaxaca, Oax. Email: moaging@gmail.com, yobanper@gmail.com.

RESUMEN: En la actualidad los estados biológicos de *M. domestica* han sido estudiados por sus propiedades terapéuticas, debido a que presentan importantes efectos citotóxicos en células cancerígenas. En este trabajo se caracterizaron las proteínas de huevecillo y larva de *M. domestica* por electroforesis undimensional y Western Blot. Se identificaron proteínas en un rango de 14-200 KDa en el estado de huevecillo y se identificaron glicoproteínas con las lectinas *Arachis hypogaea* (PNA) y *Amaranthus leucocarpus* (ALL). Además se evaluó la actividad antiproliferativa y viabilidad celular sobre la línea celular de cáncer cervicouterino HeLa con el extracto crudo de huevecillo en concentraciones de 50 y 100 ug/ml, reduciendo considerablemente el porcentaje de proliferación y viabilidad celular a 12, 24 y 48 horas.

Palabras clave: *M. doméstica*, proteínas, citotóxico.

Protein characterization of house fly *Musca domestica* eggs and maggot and its potential therapeutic purpose

ABSTRACT: Actually, *M. domestica* has been studied for its potential therapeutic proprieties because its biological stage have been shown cytotoxicity effects in cancer cells. In the present work, house fly *Musca domestica* eggs and maggots proteins have been characterized by unidimensional electrophoresis and western blot. Protein expression with range of 14-200 KDa has been identified in house fly eggs and glycoproteins identification by *Arachis hypogaea* (PNA) y *Amaranthus leucocarpus* (ALL) lectins. In addition, antiproliferative activity and cellular viability of this crude extract against cervical cancer cells (HeLa) was determinated with a colorimetric assay using violet crystal and tripan blue, wich showed antiproliferative effect with 50 and 100 µg/ml in different times.

Key words: *M. domestica*, Protein, cytotoxicity.

Introducción

Los insectos representan alrededor del 80% de todas las especies animales y deben haberse producido muchos factores naturales que asistieron su supervivencia durante las numerosas agresiones ambientales que han ocurrido en los últimos 4 500 millones de años de su evolución. Recientemente, este hecho ha sido reconocido por un número de empresas creadas para explotar los productos naturales de los insectos utilizando modernas técnicas moleculares y bioquímicas (Ratcliffe *et al.*, 2011). Hoy en día se sabe que los insectos mismos parecen constituir una fuente muy importante de recursos para la investigación farmacológica debido a su historia co-evolutiva con las plantas y productos defensivos que éstas producen (Ramos-Elorduy, 2000).

El uso terapéutico de insectos y de productos derivados de ellos es conocido como entomoterapia (Carrera, 1993). La mosca doméstica o mosca común, es una especie que constituye un problema de salud pública en aquellas áreas urbanas y explotaciones animales con un manejo sanitario inapropiado. Como especie polífaga es atraída a diferentes sustratos: alimentos, desperdicios, secreciones y excretas para alimentarse (Román, *et al.*, 2004). Su ciclo biológico consta de 4 estados biológicos: adulto, huevecillo, larva y pupa (Aquino-Gómez, 2005). En este trabajo se estudiaron los

extractos de diferentes estados biológicos de *M. doméstica*, con el fin de identificar actividad biológica para alguno de ellos.

Materiales y Método

Crianza masiva de mosca doméstica *Musca domestica* en sus diferentes estados biológicos.

Las muestras de huevo y larvas de mosca domestica fueron adquiridas del Laboratorio de Aprovechamiento Integral de los estados biológicos de la mosca doméstica *Musca domestica* ubicado en el Instituto Tecnológico de Oaxaca, que se encuentra dirigido por el Ing. Víctor Manuel Aquino Gómez.

Preparación de la muestra (extracto crudo). Las muestras se trituraron en solución tampón Ripa Tris pH 7.6 10 mM, NaCl 0.15 M, EDTA 0.001 M, Tritón X100 1%, NaDoc 0.5%, SDS 0.1%, Inhibidor de proteasas 0.5% a 4°C y se sometieron a centrifugación a 13000 rpm por 10 minutos a 4°C. 3.

Cuantificación de proteínas. Para la cuantificación de proteínas se utilizó el método de Ácido Biccinconínico (BCA), por triplicado a una absorbancia de 562 nm, según instrucciones de kit comercial.

Caracterización de proteínas por Electroforesis Unidimensional SDS-PAGE. Las muestras se trataron con buffer de muestra Laemmli 1X y se calentaron a 95°C por 10 min. Se corrieron 20 µg de proteína en SDS-PAGE en condiciones reductoras con geles al 10% y se tiñeron con azul de Coomassie.

Análisis por Western Blot. Después de la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa y bloqueadas en solución de albumina sérica bovina (BSA) al 5%. Posteriormente fueron incubadas con las lectinas: *Arachis hypogaea* (PNA) y *Amaranthus leucocarpus* (ALL) ambas en concentraciones de 5 µg/ml a 4°C. Las membranas tratadas fueron reveladas utilizando el Kit Opti-4CN (Bio-Rad).

Actividad biológica del extracto crudo de estados biológicos de *M. domestica*. Se utilizó como modelo de estudio la línea celular de cáncer cervicouterino HeLa, las cuales fueron sembradas en placas de 96 pozos con una densidad de 5000 células/pozo en medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con Suero Fetal Bovino al 7% a 37°C con 5% CO₂. Posterior a deprivación de 12 horas se inocularon concentraciones de proteína de extracto crudo de 50 y 100 µg/ml a las 12, 24 y 48 horas, evaluando Viabilidad celular por exclusión de azul tripano en el cual posterior al tratamiento se tomó una solución 1:1 de suspensión celular y colorante azul tripano al 0.4% contando el número de células viables en cámara de Neubauer, también se evaluó proliferación celular por el método de cristal violeta en el cual después de tratamiento de fijación con Glutaraldehído al 1.1%, se añadió a las muestras solución de Cristal Violeta al 0.1% y se reportó la lectura de absorbancia a 595 nm.

Resultados y su Discusión

Preparación y obtención de extracto crudo. Las muestras de estados biológicos de huevo y larvas de *M. doméstica* se recolectaron y limpiaron por tamizaje retirando el exceso de medio de cultivo. Durante el proceso de obtención de los extractos crudos de los estados biológicos de huevecillo y larvas, se observó una rápida degradación de proteínas en los estadios posteriores a huevecillo, esto debido a que existen diferentes enzimas como una respuesta adaptativa (Oppert, *et al.*, 1993) lo cual implica que los insectos tienen una gran cantidad de enzimas digestivas que les permiten su adaptación a los alimentos que ellos consumen. Se conocen cuatro tipos de enzimas proteolíticas que están presentes en los insectos como las serin proteasas y sus dos diferentes subclases tripsina y

quimiotripsina (Johnston *et al.*, 1995) y con menos actividad las aspartil proteasas y metaloproteinasas (Chambers *et al.*, 2003).

Cuantificación de Proteínas: Debido a la presencia de detergentes en el tampón de lisis que se utilizó para la obtención de extracto crudo se utilizó el método de Ácido Biccinconinico (BCA). A partir de un análisis de regresión lineal, se obtuvieron las concentraciones de proteína correspondiente cada uno de los estados como se muestra en el cuadro 1 y figura 1, donde se muestra una mayor concentración en huevecillo y días 4 y 5.

Cuadro 1. Concentración de proteínas de estadios larvarios de <i>M. doméstica</i> .	
Muestra	Concentración mg/ml
Huevo	20.7
Larva Día 1	16.08
Larva Día 2	18.6
Larva Día 3	17.7
Larva Día 4	23.9
Larva Día 5	26.6

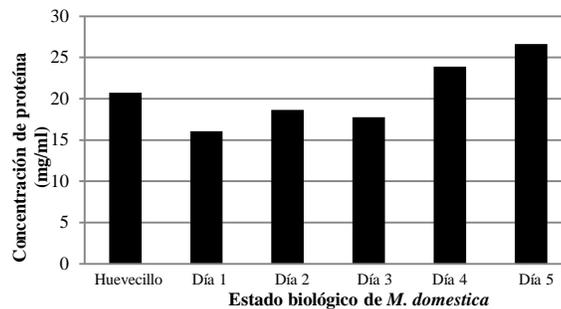


Figura 1. Histograma de la relación de concentración y peso de muestras de extractos crudos de estados larvarios de *M.*

En la figura 2, se puede observar la expresión de proteínas en relación a la concentración obtenida por la cuantificación y el peso con el cual se obtuvieron los extractos, donde los extractos de huevecillo, día 4 y 5 presentan mayor relación en comparación con los días 1, 2 y 3.

Electroforesis unidimensional SDS-PAGE. Con la finalidad de conocer la complejidad molecular de proteínas del extracto crudo de las muestras de huevecillo y larvas de *M. doméstica* se realizó una electroforesis unidimensional SDS-PAGE bajo condiciones reductoras con marcador molecular de amplio espectro. Se presentan a continuación los resultados obtenidos del gel al 10% de electroforesis SDS-PAGE y la expresión de las proteínas de los estados biológicos de *M. doméstica*. En la Figura 1 se observa que el extracto crudo de huevecillo presenta una gran diversidad de proteínas de diferentes pesos moleculares, con un rango de 14 KDa hasta 200 KDa aproximadamente, concentradas de manera importante en los rangos de 45 hasta 200 KDa, mientras que en días en los que se reproduce la larva de mosca 1, 2, 3, 4 y 5 existe una menor expresión de proteínas y solo se observan de bajo peso molecular de entre 45 y 14 KDa aproximadamente, esto también puede deberse a factores como degradación de proteínas debido a la naturaleza sensible de las muestras o la presencia de proteasas en las larvas, que a pesar del uso de diferentes inhibidores, no presentaban un perfil electroforético reproducible. Para la realización de los siguientes experimentos se decidió utilizar el estado de huevecillo, que presentó mayor estabilidad y reproducibilidad en su perfil electroforético de proteínas.

Análisis de proteínas por Western Blot Con el objetivo de reconocer modificaciones posttraduccionales tipo *O*-Glicosilación en los estados biológicos, se utilizó la técnica de Western Blott, donde las membranas transferidas fueron incubadas con dos tipos de lectinas, *Arachis hypogaea* (PNA) y *Amaranthus leucocarpus* (ALL) realizada a los estados de huevecillo y larva.

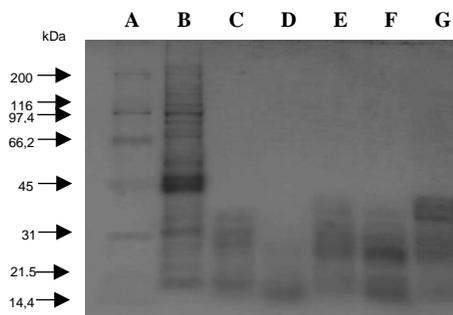


Figura 2. Perfil electroforético de los estados biológicos de huevecillo y larvas de *M. domestica*. Se realizó un gel SDS-PAGE al 10% y se depositaron 20 µg de cada estado donde carril A= Marcador de peso molecular, carril B= Huevecillo, carril C= Día 1, carril D= Día 2, carril E= Día 3, carril F= Día 4, carril G= Día 5.

En la figura 3, se puede observar una mayor señal el estado de huevecillo, donde el reconocimiento de la lectina PNA se da en pesos moleculares de entre 97 y 21 KDa, así como también se observa una señal poco visible en los días de reproducción de larva correspondiente a los días 1, 2, 3, 4 y 5. Se sabe que una lectina es una proteína o glicoproteína de origen no inmune que tiene la capacidad de reconocer de manera específica carbohidratos de la superficie celular o en suspensión, aglutinan células y precipitan glicoconjugados, las lectinas poseen por los menos dos sitios de reconocimiento a carbohidrato (Hernández *et al.*, 2005). La gran importancia de las lectinas se debe fundamentalmente a sus propiedades biológicas como la interacción con grupos sanguíneos específicos, aglutinación de linfocitos, eritrocitos, espermatozoides, plaquetas, bacterias y células tumorales, etc. (Sharon y Lis, 2004). La lectina PNA tiene la capacidad de reconocer Gal, Galb3GalNAcα (Antígeno T) (Ambrosi *et al.*, 2005). Por otro lado, la lectina *Amaranthus leucocarpus* (ALL) interactúa específicamente con GalNAc y se ha demostrado que es una herramienta útil para reconocer O-glicanos en diferentes tejidos y células tumorales (Zenteno y Ochoa, 1988). En el análisis por Western Blott, utilizando la lectina ALL, se observa solo el reconocimiento de la lectina en el estado de huevo, donde la señal mayor se presenta en las bandas con pesos moleculares de 97 y 66 KDa. (Fig. 3)

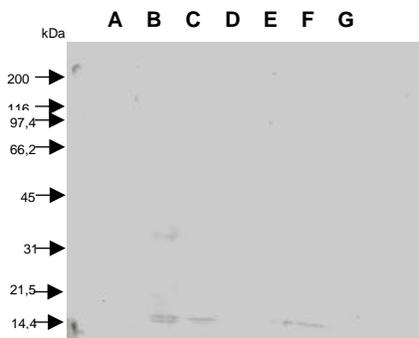


Figura 2. Western Blot de huevecillo y larvas de *M. domestica* con la lectina *Arachis hypogaea* (PNA) donde carril A= Marcador de peso molecular, carril B= Huevecillo, carril C= Día 1, carril D= Día 2, carril E= Día 3, carril F= Día 4, carril G= Día 5.

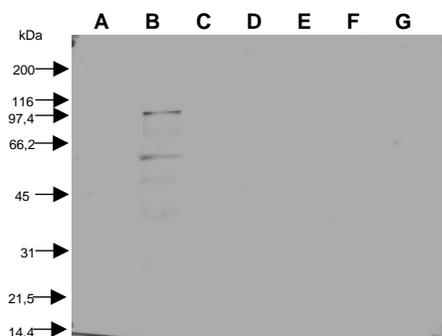


Figura 3. Western Blot de huevecillo y larvas de *M. domestica* con las lectina *Amaranthus leucocarpus* (ALL) donde carril A= Marcador de peso molecular, carril B= Huevecillo, carril C= Día 1, carril D= Día 2, carril E= Día 3, carril F= Día 4, carril G= Día 5.

Evaluación de la actividad biológica de los extractos crudos de estados biológicos de huevecillo de *M. doméstica*. El efecto producido por el extracto crudo de huevecillo de *M. domestica* en células de cáncer cervicouterino HeLa de concentraciones 50 y 100 µg/ml se demuestra en las

figuras 4 y 5 para el análisis de viabilidad por exclusión de azul tripano, dicho colorante permite diferenciar las células viables (no teñidas) de las no viables (teñidas) debido a que es una amina orgánica con carga neta negativa que no penetra al interior de las células que presentan sus membranas íntegras, mientras que las células dañadas rápidamente lo incorporan al citoplasma (Freshney, 2005) . Se utilizó como control negativo células HeLa en privación. Para la concentración de 50 µg/ml se observa en la figura 4 un efecto poco significativo para el tratamiento de 12 horas del 97.3% en comparación con el control negativo que reportó 98.7%, sin embargo, a las 24 horas el efecto es más visible debido a que el porcentaje disminuye hasta un 88.5% y a las 48 horas, 84.4%. El mayor efecto fue detectado en la concentración de extracto de 100 µg/ml, donde a las 12 horas presenta un porcentaje de 32.3%, pero en los siguientes tratamientos la viabilidad células fue cero como se observa en la figura 5.

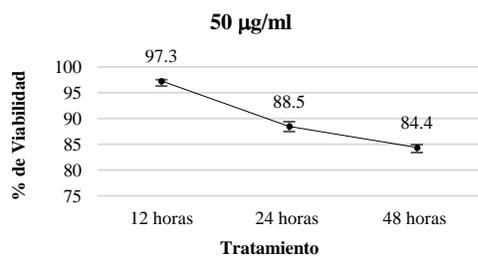


Figura 4. Porcentaje de Viabilidad de Células HeLa por efecto del extracto crudo de *M. domestica* a 50 µg/ml de concentración.

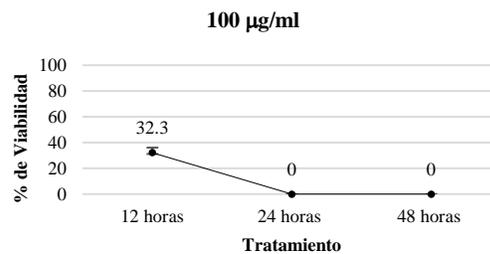


Figura 5. Porcentaje de Viabilidad de Células HeLa por efecto del extracto crudo de *M. domestica* a 100 µg/ml de concentración.

En la medición del efecto anti proliferativo por incorporación de cristal violeta donde las células no viables no son capaces de incorporar el colorante a sus membranas (Ishiyama *et al.*, 1996) que presentan las células HeLa en presencia del extracto crudo, que se observa en las figuras 6 y 7, donde a la concentración de 50 µg/ml no presentó un efecto significativo con un porcentaje de proliferación del 96.1, con respecto al control negativo que se consideró como 100% por no contar con el tratamiento, sin embargo existió una disminución en los tratamientos a las 24 y 48 horas del 89.5 y 82.7% respectivamente. El mayor efecto se encontró en la concentración de 100 µg/ml donde el porcentaje de proliferación a las 12 horas fue de 75.3%, mientras que para los tratamientos a las 24 y 48 horas fue de 87.8 y 77.8%.

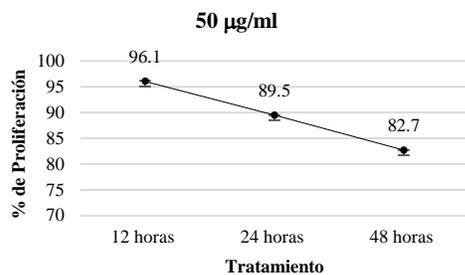


Figura 6. Porcentaje de Proliferación de células HeLa por efecto del extracto crudo de huevecillo de *M. domestica* a 50 µg/ml de concentración.

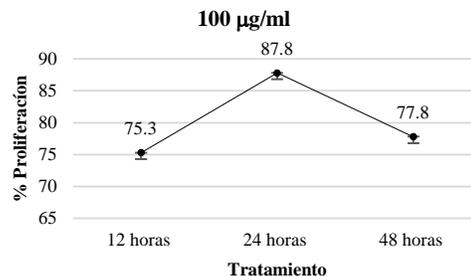


Figura 7. Porcentaje de Proliferación de células HeLa por efecto del extracto crudo de huevecillo de *M. domestica* a 100 µg/ml de concentración.

Conclusiones

Se obtuvo el perfil electroforético de los estados biológicos de *M. doméstica*, demostrando que las proteínas son altamente susceptibles a degradación en el caso del estado de larva, debido a la carga

enzimática que presentan como respuesta adaptativa, por lo que se dio seguimiento a la muestra de huevecillo del cual se preservaron mejor las proteínas con un perfil desde los 14 KDa hasta 200 KDa. Además se demostró en la muestra de huevecillo la expresión de las lectinas *Arachis hypogaea* (PNA) y *Amaranthus leucocarpus* (ALL) que tienen la capacidad de reconocer la modificación postraduccional de O-glicosilación. Cabe señalar que el extracto también presentó actividad citotóxica en la línea celular de cáncer cervicouterino HeLa, con lo que se demuestra que el extracto crudo de huevecillo de *M. domestica* puede ser utilizado como un importante tratamiento en este tipo de enfermedades.

Agradecimientos

Agradecemos al Centro de Investigación Facultad de Medicina UNAM-UABJO, al Dr. Pedro Hernández Cruz, Dra. Itandehui Belem Gallegos Velasco, Dra. Margarita Cabrera Bravo por todas las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico brindado.

Literatura Citada

- Ambrosi, M., Cameron, N. R., and Davis, B. G. 2005. Lectins: tools for the molecular understanding of the glycode. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 3(9), 1593–608. doi:10.1039/b414350g
- Aquino Gómez, V. M. 2005. Manual de capacitación. Curso control integrado de la mosca de los establos. (pp. 3–4).
- Carrera, M. 1993. Terapéutica entomológica. *Revista Brasileira de Entomologia*, 37, 193–198.
- Chambers, L., Woodrow, S., Brown, A. P., Harris, P. D., Phillips, D., Hall, M., D.I., P. (2003). Degradação de extracelular matrix components by defined proteinase from greenbottle larva *Lucilia sericata* used in the clinical debridement of non-healing wounds. *British Journal of Dermatology*, 148, 14–23.
- Freshney, I. 2005. *Culture and animal cells: A manual of Basic Technique*. USA: Editorial John Wiley y Sons, Inc.
- Hernández C., P., Pérez C., E., Martínez M., L., y Martínez, G. 2005. Las lectinas vegetales como modelo de estudio de las interacciones, 24(1), 21–27.
- Ishiyama, M., Tominaga, H., Shiga, M., Sasamoto, K., Ohkura, Y., and Ueno, K. 1996. A combined assay of cell viability and in vitro cytotoxicity with a highly water-soluble tetrazolium salt, neutral red and crystal violet. *Biology Pharm Bull*, 19(15), 18–20.
- Johnston, K. A., Lee, M. J., Brough, C., Hilder, V. A., Gate-House, K. M. R., and Gatehouse, J. A. 1995. Protease activity in the larval midgut of *Heliothis virescens*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 25, 375–384.
- Oppert, B., Morgan, T. D., Culbertson, C., and Kramer, K. J. (1993). Dietary mixtures of cysteine and serine proteinase inhibitors exhibit synergistic toxicity toward the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 105, 379–385.
- Ramos Elorduy, J. 2000. La etnoentomología actual en México en la alimentación humana, en la medicina tradicional y en la reciclaje y alimentación animal. In Congreso Nacional de Entomología. pp. 3–46.
- Ratcliffe, N. A., Mello, C. B., Garcia, E. S., Butt, T. M., and Zambuja, P. 2011. Insect natural products and processes: new treatments for human disease. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 41(10): 747–69. doi:10.1016/j.ibmb.2011.05.007
- Román, E. M. De, Tkachuk, O., y Roman, R. 2004. Detección de agentes bacterianos en adultos de *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) recolectadas en Maracay, Estado Aragua, Venezuela. Estudio preliminar. *Entomotropica*, 19(3), 161–164.

- Sharon, N., and Lis, H. 2004. History of lectins: from hemmagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*, 14(11), 53R–62R.
- Zenteno, E., and Ochoa, J. L. 1988. Isolation and characterization of *Amaranthus leucocarpus* lectin. *Phytochemistry*, 27, 313–317.