

FILOGENIA Y MODELAJE MOLECULAR DE LA PROTEÍNA GluCl α DE *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel, 1858, DIPTERA: CALLIPHORIDAE), AGENTE CAUSAL DE MIASIS ORAL

Ignacio Martínez✉, Paulina Diaz-Garrido¹ y Marta Elena Castro-Manrreza²

¹Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Departamento de Inmunología. Avenida Universidad 3000, Col. Universidad Nacional Autónoma de México, Alcaldía Coyoacán, C. P. 04510, Ciudad de México.

²Carrera Cirujano Dentista. Lab 1 PB. Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. Batallón del 5 de mayo s/n Col. Ejército de Oriente, Alcaldía Iztapalapa, C.P. 09720, Ciudad de México.

✉ Autor de correspondencia: imm@biomedicas.unam.mx

RESUMEN. *Cochliomyia hominivorax* o gusano barrenador del nuevo mundo es una especie cuyas larvas pueden infestar la cavidad oral de diversos tipos de ganado, así como del humano, causando el padecimiento conocido como miasis oral. El tratamiento de la parasitosis incluye la administración de ivermectina, la cual se une a la subunidad alfa de los canales de cloruro activados por glutamato (GluCl α). La GluCl α de *C. hominivorax* fue caracterizada parcialmente en 2014. En el presente trabajo se analiza la filogenia, se ofrecen nuevos datos sobre sitios de unión a glutamato, ivermectina y colesterol, así como el primer modelo molecular tridimensional de la GluCl α de *C. hominivorax*.

Palabras clave: Filogenia, Neighbor joining, ivermectina, Glutamato, Colesterol.

Structural analysis and molecular modeling of the GluCl α protein of *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel, 1858, Diptera: Calliphoridae), causal agent of oral myiasis

ABSTRACT. *Cochliomyia hominivorax* or New World screwworm is a species whose larval stage can infest the oral cavity of diverse livestock, as well as humans, causing oral myiasis. The treatment of parasitosis includes the administration of ivermectin, which binds to the alpha subunit of chloride channels activated by glutamate (GluCl α). The GluCl α of *C. hominivorax* was partially characterized in 2014. In the present work the phylogeny of the protein is analyzed, new data on glutamate binding sites, ivermectin and cholesterol are offered, as well as the first three-dimensional molecular model of the GluCl α of *C. hominivorax*.

Keyword: Phylogeny, Neighbor joining, ivermectin, Glutamate, Cholesterol.

INTRODUCCIÓN

Cochliomyia hominivorax, o gusano barrenador del nuevo mundo (GBNM), es una especie de mosca endémica de América, cuyo apogeo como plaga, particularmente del ganado, ocurrió entre 1960 y 1980 (Gutierrez *et al.*, 2019). Recibió ese nombre debido a que las hembras depositan sus huevos en heridas abiertas y al eclosionar las larvas “barrenan” el tejido blando para alimentarse. Después de algunos días abandonan al hospedero para completar su ciclo de vida, pero para entonces pudieron causar un daño enorme, sobre todo si la cantidad de larvas infestantes fue alto. A partir de su erradicación masiva en los años 90’s, mediante la técnica del insecto estéril, el número de casos disminuyó hasta el punto de considerarla erradicada desde Norteamérica hasta Panamá (Gutierrez *et al.*, 2019). A pesar de ello, en algunas regiones del Caribe aún sigue siendo un problema veterinario y ocasionalmente se presentan brotes en los países donde ya ha sido erradicada (Dupuis *et al.*, 2018). En el caso de las infestaciones humanas, desde hace más de 10 años se han reportado casos de miasis oral humana principalmente en Brasil (De Araújo *et al.*, 2008; Gomez *et al.*, 2003; Gealh *et al.*, 2008; Lima Júnior *et al.*, 2010; Novo-Neto *et al.*, 2015; Ribeiro *et al.*, 2010) y Colombia (Duque y Ardila, 2011).

Durante mucho tiempo la remoción mecánica de las larvas era el primer abordaje para resolver la miasis. Sin embargo, este procedimiento era lento, en ocasiones doloroso para el paciente, y en algunos casos no aseguraba la eliminación de todas las larvas, por lo que se debía realizar una segunda sesión de tratamiento. A partir de 2004 el uso de la ivermectina (una lactona macrocíclica cuyo blanco son los canales de cloro sensibles a glutamato y que ya era empleada como tratamiento en otras parasitosis ocasionadas por invertebrados de los géneros *Strongyloides*, *Ancylostoma* y *Oncocerca*) demostró ser una herramienta eficiente para la total eliminación de las larvas y se convirtió en el tratamiento de elección para la miasis causada por esta especie (Gealh *et al.*, 2008; Osorio *et al.*, 2006; Sato *et al.*, 2009).

Los canales de cloruro regulados por glutamato están presentes en las membranas celulares del sistema nervioso y muscular. Están formados por pentámeros de dos subunidades GluCl α y GluCl β y abren un canal catiónico tras la unión de neurotransmisores como acetilcolina, serotonina, GABA o Glutamato (Degani-Katzav *et al.* 2016). La ivermectina actúa uniéndose a las subunidades alfa (GluCl α), lo cual mantiene los canales abiertos de forma no selectiva e irreversible, favoreciendo primero a la muerte celular y posteriormente a la parálisis y muerte de la larva (Victoria, 2010).

En años recientes se han comenzado a caracterizar las subunidades de los canales GluCl en diferentes organismos para establecer su papel en la resistencia a diferentes fármacos, incluida la ivermectina, y para identificar sitios de unión a nuevos insecticidas (Amanzougaghene *et al.*, 2018; Kato *et al.*, 2018). La estructura y características de la proteína GluCl α del GBNM ha sido descrita solo parcialmente (Lopes *et al.*, 2014). Sin embargo, la información más reciente de proteínas homólogas en otros insectos e invertebrados como *Anopheles gambiae* y *Caenorabditis elegans*, plantea la necesidad de un análisis más exhaustivo de las características de esta proteína en *C. hominivorax*. Por ello, el objetivo del presente trabajo fue establecer la filogenia y modelado molecular tridimensional de la proteína GluCl α de *C. hominivorax*, para contribuir al conocimiento de la proteína y a sus interacciones con ivermectina.

MATERIALES Y MÉTODO

Secuencias de GluCl α . Las secuencias de aminoácidos de las subunidades alfa de los canales de cloro sensibles a glutamato, de diversas especies, fueron obtenidas de GenBank: *Cochliomyia hominivorax* (AHA44472.1, AIE48254.1), *Lucilia cuprina* (AF081674.1), *Musca domestica* (AB177546.1), *Drosophila melanogaster* (NP650827.3), *Anopheles gambiae* (AGS43089.1), *Caenorhabditis elegans* (CAA50785.1), *Apis mellifera* (ABG75738.1), *Symbiodinium microadriaticum* (OLQ08835.1), *Stylonychia lemnae* (CDW71294.1), *Haemonchus contortus* (AF034609.1) y *Ancylostoma caninum* (FC542835.1).

Análisis filogenético. Las secuencias de aminoácidos fueron alineadas mediante el programa Clustal W. Posteriormente fueron empleadas para realizar un análisis de Neighbor joining (NJ) mediante el software MEGA6, considerando el modelo de *p-distancia* con un bootstrap de 10,000 réplicas y una cobertura del 95% en cada sitio analizado (Tamura, 2013). El árbol filogenético resultante fue visualizado mediante Figtree v1.4.3 (Rambaut, 2006).

Análisis estructural y modelaje tridimensional. Las estructuras secundaria y terciaria de la proteína, así como la identificación de los sitios de unión a glutamato e ivermectina y el modelaje tridimensional, fueron establecidos desde la plataforma en línea I-TASSER (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>). Para el análisis se empleó la secuencia de aminoácidos completa de la proteína GluCl α de *C. hominivorax* (GenBank AHA44472.1) en formato FASTA. La estructura tridimensional predicha fue visualizada mediante el software libre de manipulación de imágenes GNU GIMP 2.8 (<https://www.gimp.org/>). Para el modelado

tridimensional de GluCl α de *C. hominivorax* mediante I-TASSER, se compararon plantillas de la biblioteca PDB (Protein Data Base, <https://www.rcsb.org/structure/3rhw>), seleccionando aquellas de mayor probabilidad. La estructura tridimensional predicha fue comparada con otras ya descritas mediante TM-align y se estableció la identidad de aquellas con las que comparte más similitud (Yang *et al.*, 2015).

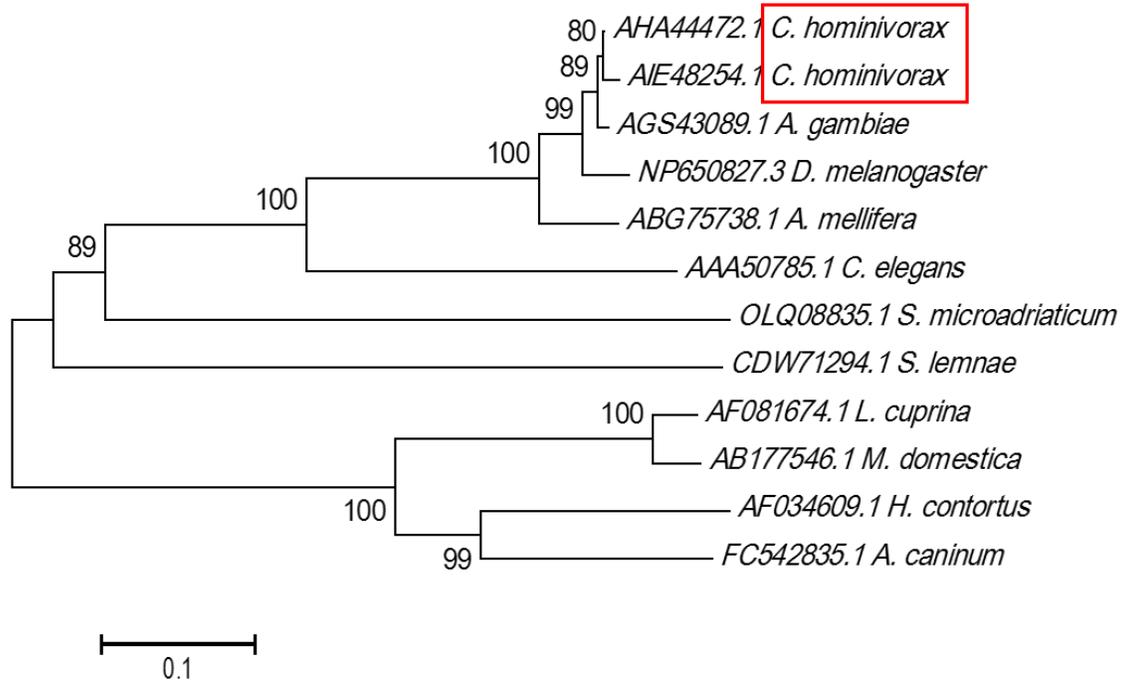


Figura 1. Filogenia de GluCl α de *C. hominivorax*. El análisis de Neighbor joining se realizó como se describe en materiales y método. Los valores de bootstrap en los nodos se obtuvieron partir de 10, 000 réplicas. Las distancias genéticas para el análisis evolutivo fueron determinadas por el método *p-distance*. La escala mostrada representa el número de diferencias en aa por sitio en la secuencia. Todas las posiciones con menos del 95% de cobertura fueron eliminadas. Un total de 182 posiciones fueron empleadas en la construcción del árbol.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En 2014 se clonaron las primeras secuencias de la proteína GluCl α de *C. hominivorax*, obtenidas a partir del RNAm de larvas L3, en el estado de Goiás, en Brasil (Lopes *et al.*, 2014). El primer análisis se realizó alineando la secuencia completa frente a sus homólogos en 3 especies: *L. cuprina*, *M. domestica* y *D. melanogaster*. Sin embargo, hasta la fecha no se ha realizado un análisis filogenético que incluya otros insectos e invertebrados. Mediante un análisis de NJ encontramos que la GluCl α de *C. hominivorax* es muy cercana a sus homólogos en *A. gambiae*, *D. melanogaster* y *A. mellifera* (Figura 1). Interesantemente también se encontró filogenéticamente relacionada con *C. elegans*, cuya subunidad alfa ha sido una de las mejor estudiadas en los últimos años (Hénin *et al.*, 2014).

Por otro lado, en el primer análisis estructural de la proteína se identificaron cuatro dominios transmembranales, dos sitios de unión a glutamato y varios de los *loops* involucrados en el plegamiento de la proteína (Lopes *et al.*, 2014). En el presente trabajo se empleó la plataforma en línea I-TASSER para el análisis y modelado molecular, esto junto con búsqueda bibliográfica sobre proteínas similares nos permitió identificar las secuencias correspondientes a las α -hélices de la GluCl α y tres nuevos sitios de unión a glutamato que podrían participar en la funcionalidad de la proteína (Figura 2).

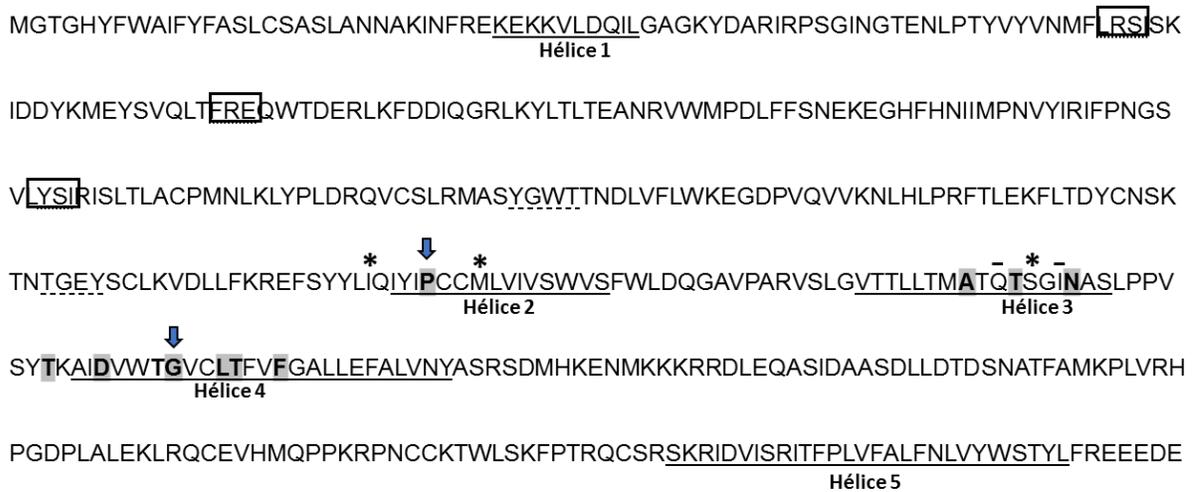


Figura 2. Análisis estructural de GluCl subunidad alfa (AHA44472.1) de *C. hominivorax*. Alfa-hélices (subrayadas), sitios de unión a glutamato descritos previamente (subrayado punteado) y predichos por el análisis I-TASSER (recuadros), aminoácidos de unión a ivermectina predichos por I-TASSER (Negritas resaltadas en gris), se incluyen los descritos previamente (flechas). También se incluyen los sitios de unión a colesterol (*). Los aminoácidos marcados con una línea superior indican los aminoácidos de unión a propofol.

Adicionalmente, estos sitios extra de unión a glutamato podrían servir como blancos terapéuticos de nuevos compuestos antagonistas como la fluxametamida (Asahi *et al.*, 2018). También se identificaron ocho aminoácidos adicionales con capacidad de unión a ivermectina, cuyo papel en la sensibilidad a este fármaco aún debe ser esclarecida. La presencia de más sitios de unión a ivermectina abre la posibilidad de reducir la dosis de fármaco para el tratamiento, que es la misma que se emplea para otras parasitosis, y de esta forma reducir los efectos colaterales (cefalea, diarrea, epigastralgia, náuseas, prurito) que actualmente afectan hasta a un 24% de los pacientes tratados (De Hollanda Ramirez *et al.*, 2005).

Recientemente se han identificado 6 residuos de unión a colesterol en la GluCl α de *C. elegans*, que al unirse con ese lípido abren el canal iónico (Hénin *et al.*, 2014). Nosotros identificamos 3 de esos residuos en *C. hominivorax* cuya función aún no ha sido descrita. Adicionalmente, una glutamina (Q) y una isoleucina (I) presentes en la hélice 3 son sitios de unión a Propofol (molécula con propiedades anestésicas). La presencia de estos dos residuos, particularmente la isoleucina, ha sido propuesta como un potenciador de la actividad del canal de iones (Lynagh y Laube, 2014). Este efecto podría deberse al papel que tiene propofol sobre diversos receptores GABA (relacionados con la GluCl α), pero cuyo mecanismo de acción aún no está bien comprendido.

Finalmente, el modelado molecular tridimensional de la proteína confirmó que las α -hélices predichas forman parte de la porción transmembranal. Asimismo, se observó que los dominios de unión a ivermectina se encuentran expuestos en dos de las hélices (Figura 3).

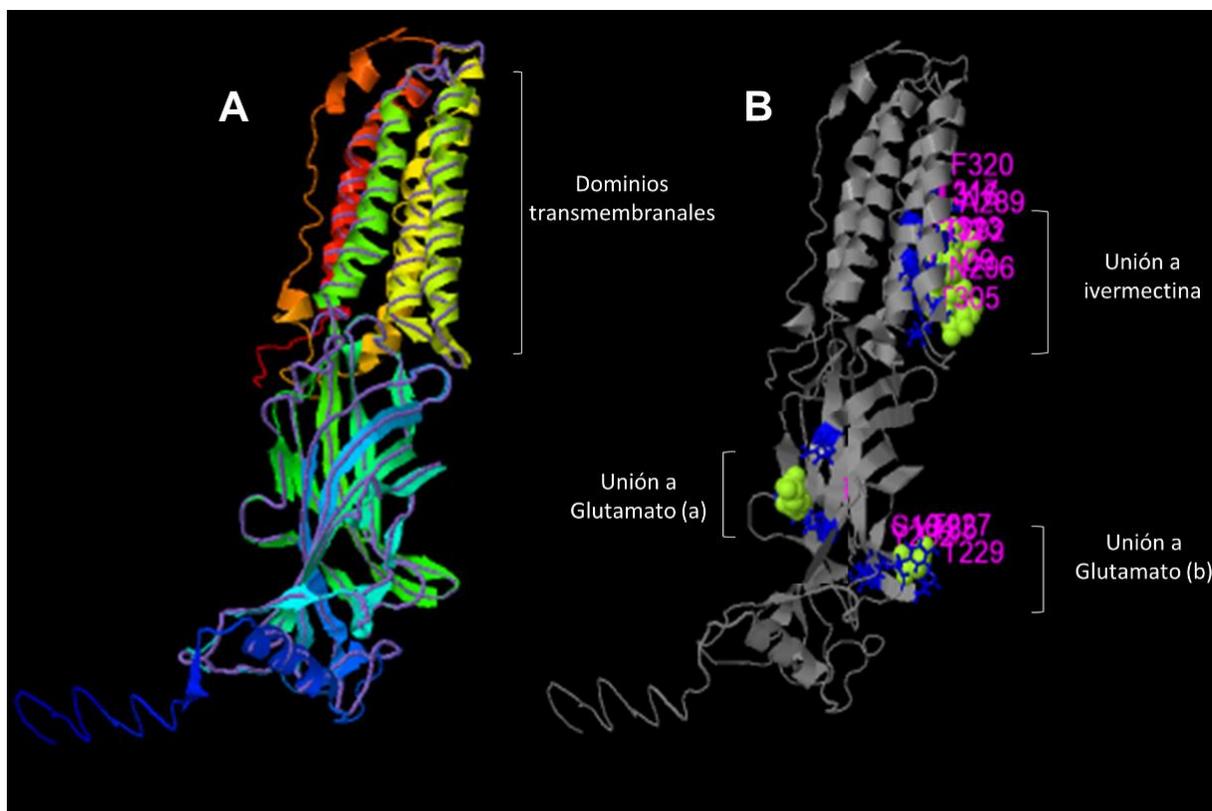


Figura 3. Modelo tridimensional de GluCl α de *C. hominivorax*. El modelado se realizó en la plataforma I-TASSER como se indica en materiales y método. A) Proteína completa mostrando las α -hélices (colores diferentes), las láminas beta y las secuencias lineales. B) Ilustrativo de los sitios de unión a ivermectina, a glutamato predichos por I-TASSER (a) y a glutamato previamente descritos (b).

Mientras que los dominios de unión a glutamato se encuentran a ambos lados de la proteína y alejados de los sitios de unión a ivermectina. La estructura tridimensional de GluCl α predicha por I-TASSER mediante TM-align fue comparada con todas las estructuras en la biblioteca PDB. Como resultado se obtuvo la identidad de las 3 proteínas con las cuales se encontró el más alto índice de similitud estructural que fueron la GluCl α de *C. elegans* (DOI: 10.2210/pdb3RIA/pdb), *Danio rerio* (DOI: 10.2210/pdb4COF/pdb) y humano (DOI: 10.2210/pdb4COF/pdb), en ese orden. La alta similitud entre las proteínas mencionadas sugiere una función similar.

CONCLUSIONES

La secuencia lineal de aminoácidos de GluCl α de *C. hominivorax* es muy similar a la de *A. gambiae*, *D. melanogaster* y *C. elegans*. Sin embargo, el análisis estructural y el modelaje tridimensional de la proteína indican que la forma funcional de la misma sería más parecida a su homóloga de *C. elegans* (nematodo). Los sitios predichos de unión al anestésico propofol y los nuevos sitios de unión a glutamato e ivermectina dan información valiosa para probar nuevos compuestos antagonicos y, posiblemente, hacer el tratamiento más eficiente.

AGRADECIMIENTOS

P. Diaz-Garrido es apoyada por una beca Doctoral del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (663015).

LITERATURA CITADA

- Amanzougaghene, N., Fenollar, F., Nappez, C., Ben-Amara, A., Decloquement, P., Azza S., Bechah, Y., Chabrière, E., Raoult, D., Mediannikov, O. 2018. Complexin in ivermectin resistance in body lice. *PLoS Genetics*, 14(8): 1-18. doi: 10.1371/journal.pgen.1007569.
- Asahi, M., Kobayashi, M., Kagami, T., Nakahira, K., Furukawa, Y., Ozoe, Y. 2018. Fluxametamide: A novel isoxazoline insecticide that acts via distinctive antagonism of insect ligand-gated chloride channels. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 151(1): 67-72. doi: 10.1016/j.pestbp.2018.02.002.
- De Araújo, R.J., Corrêa, A.M., Santos, W.R., Moreira, M.T. 2008. Advanced stage of oral myiasis in children: a clinical case report. *Quintessence International*, 39(1): 39-43.
- Degani-Katzav, N., Gortler, R., Gorodetzki, L., Paas, Y. 2016. Subunit stoichiometry and arrangement in a heteromeric glutamate-gated chloride channel. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 113(5): E644-E653. doi: 10.1073/pnas.1423753113.
- De Hollanda Ramírez, AM., Silva Rodríguez, AR., Zaracho, G. 2005. Ivermectina en el tratamiento de la miasis humana. *Anales de la Facultad de Ciencias Médicas (Asunción)*, 38(3): 62-71. Citado 13 de abril de 2019, de http://scielo.iics.una.py/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1816-89492005000200010&lng=es&tlng=es.
- Dupuis, J.R., Guerrero, F.D., Skoda, S.R., Phillips, P.L., Welch, J.B., Schlater, J.L., Azeredo-Espin, A.M.L., Pérez de León, A.A., Geib, S.M. 2018. Molecular Characterization of the 2016 New World Screwworm (Diptera: Calliphoridae) Outbreak in the Florida Keys. *Journal of Medical Entomology*, 55(4): 938-946. doi: 10.1093/jme/tjy078
- Duque, F.L., Ardila, C.M. 2011. Oral myiasis caused by the screwworm *Cochliomyia hominivorax* treated with subcutaneous ivermectin and creolin: report of six cases after trauma. *Dental traumatology*, 27(5): 404-407. doi: 10.1111/j.1600-9657.2011.01004.x.
- Gealh, W.C., Ferreira, G.M., Farah, G.J., Teodoro, U., Camarini, E.T. 2008. Treatment of oral myiasis caused by *Cochliomyia hominivorax*: two cases treated with ivermectin. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 47(1): 23-26. doi: 10.1016/j.bjoms.2008.04.009.
- Gomez R.S., Perdigão, P.F., Pimenta, F.J., Rios Leite, A.C., Tanos de Lacerda, J.C., Custódio Neto, A.L. 2003. Oral myiasis by screwworm *Cochliomyia hominivorax*. *British Journal of Oral Maxillofacial Surgery*, 41(2): 115-116.
- Gutierrez, A.P., Ponti, L., Arias, P.A. 2019. Deconstructing the eradication of new world screwworm in North America: retrospective analysis and climate warming effects. *Medical and Veterinary Entomology*, doi: 10.1111/mve.12362. [Epub ahead of print]
- Hénin, J., Salari, R., Murlidaran, S., Brannigan, G. 2014. A predicted binding site for cholesterol on the GABAA receptor. *Biophysical journal*, 106(9): 1938-1949. doi: 10.1016/j.bpj.2014.03.024.
- Kato, N., Furutani, S., Otaka, J., Noguchi, A., Kinugasa, K., Kai, K., Hayashi, H., Ihara, M., Takahashi, S., Matsuda, K., Osada, H. 2018. Biosynthesis and structure-activity relationship studies of okaramines that target insect glutamate-gated chloride channels. *ACS Chemical Biology*, 13(3): 561-566. doi: 10.1021/acscchembio.7b00878.
- Lima Júnior, S.M., Asprino, L., Prado, A.P., Moreira, R.W., de Moraes, M. 2010. Oral myiasis caused by *Cochliomyia hominivorax* treated nonsurgically with nitrofurazone: report of 2 cases. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*, 109(3): e70-e73. doi: 10.1016/j.tripleo.2009.11.014.

- Lynagh, T., Laube, B. 2014. Opposing effects of the anesthetic propofol at pentameric ligand-gated ion channels mediated by a common site. *Journal of Neuroscience*, 34(6): 2155-2159. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4307-13.2014.
- Lopes, A.M., de Carvalho, R.A., de Azeredo-Espin, A.M. 2014. Glutamate-gated chloride channel subunit cDNA sequencing of *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae): cDNA variants and polymorphisms. *Invertebrate Neuroscience*, 14(2): 137-146. doi: 10.1007/s10158-014-0172-6.
- Novo-Neto, J.P., Dos Santos, F.de S., Pontes, A.E., Ribeiro, F.S., Scannavino, F.L., Martins, A.T. 2015. Oral myiasis caused by *Cochliomyia hominivorax* in a disabled person. *Case Report Pathology*, 2015(1): 904658-904660. doi: 10.1155/2015/904658.
- Osorio, J., Moncada, L., Molano, A., Valderrama, S., Gualtero, S., Franco-Paredes, C. 2006. Role of ivermectin in the treatment of severe orbital myiasis due to *Cochliomyia hominivorax*. *Clinical Infectious Diseases*, 43(6): e57-e59. doi: 10.1086/507038
- Rambaut, A. 2006. *FigTree: tree figure drawing tool.*, FigTree, ed. (Edinburg, TX, USA., Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburg, USA.).
- Ribeiro, M.C., Pepato Ade, O., De Matos, F.P., Sverzut, C.E., Abrahão, A.A., Trivellato, A.E. 2010. Oral myiasis in an elderly patient. *Gerodontology*, 29(2): e1136-e1139. doi: 10.1111/j.1741-2358.2010.00432x.
- Sato, F.R., Perez, M.A., Santos, S.E., Moreira, R.W., de Moraes, M. 2009. Oral myiasis caused by *Cochliomyia hominivorax* treated with ivermectin and nitrofurazone: case report. *General dentistry*, 57(6): e55-e58.
- Victoria, J. 2010. Ivermectina: Sus Múltiples Usos, Seguridad y Toxicidad. *Revista Chilena de Dermatología*, 26(4): 358-368.
- Tamura K., Peterson, S.G., Filipski, D., Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12): 2725-2729. doi: 10.1093/molbev/mst197.
- Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., Zhang, Y. 2015. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nature Methods*, 12(1): 7-8. doi: 10.1038/nmeth.3213