

Caracterización de actividades de proteasa en el intestino medio de la larva de *Chrysoperla carnea* (Stephens)

Claudia de la paz González García³, Javier Castillo Castillo¹, Domancar Orona Tamayo², Dalia Rodríguez Ríos², Manuel Darío Salas Araiza³, Alejandro Hernández Morales¹, Gertrud Lund², José Eleazar Barboza Corona³, Gustavo Hernández Guzmán^{3*}

¹Universidad Autónoma de San Luís Potosí, Unidad Zona Huasteca. ²CINVESTAV Unidad Irapuato.

³Universidad de Guanajuato, División de Ciencias de la Vida, km 9.0 Carr. Irapuato-León, Irapuato, Guanajuato, México. CP 36500. +52-462-6241889 Ext. 5234. gustavohdz@ugto.mx

RESUMEN: Algunas proteasas provenientes de diferentes organismos se han identificado y caracterizado con la finalidad de ser aplicadas en Biotecnología. Las proteasas intestinales de insectos han llegado a ser una opción de estudio actualmente debido a que es un tema poco explotado y no se tienen muchas referencias al respecto. Mediante técnicas biotecnológicas se puede aumentar su producción y ser aplicadas en la industria de alimentos, farmacéutica y química. *Chrysoperla carnea* Neuroptera: Chrysopidae es uno de los insectos más utilizados en el manejo integrado de plagas, por su voracidad y fácil crianza. Las larvas de *C. carnea* inyectan una secreción que paraliza a la presa y digiere sus tejidos internos. Nuestro grupo de investigación ha estudiado el componente enzimático de esta secreción, mediante el análisis de proteínas en geles nativos 1D y 2D, acoplados a zimogramas con inhibidores específicos, reportando actividad de serina, cisteína y metaloproteasas en extractos crudos de intestino medio, de las cuales la más abundante es la proteasa tipo tripsina; el análisis de estas proteínas por espectrometría de masas sugiere similitudes con proteasas de insectos, ubicando a *C. carnea* como candidata a ser una fuente emergente de enzimas que pudieran emplearse en el área de Biotecnología de alimentos.

Palabras clave: Neuroptero, proteasas, intestino medio.

ABSTRACT: Some proteases from different organisms have been identified, characterized and applied in Biotechnology. Recently, proteases derived from insect intestines have been studied because it is an unexplored topic and there are not many references addressing this subject. By using biotechnological techniques, massive protease production could be applied in food, pharmaceutical and chemical industries, to mention a few. *Chrysoperla carnea* Neuroptera: Chrysopidae is used in integrated pest management programs because it is a highly voracious and easy rearing insect. *C. carnea* larvae inject a liquid secretion into prey in order to paralyze and digest internal tissues. Our research group is dedicated to study enzymatic fraction by using non-denaturing gels coupled to zymogram analysis. We reported serine-, cysteine- and metalloproteases activities in midgut crude extracts and most abundant are trypsin-like proteases; 2D zymogram were used to select specific spots and submitted to protein mass spectrometry analysis. The result showed up similarity to insect proteases, placing to *C. carnea* as a candidate to be an emerging source of enzymes with promising use in the Food Biotechnology area.

Keywords: Neuroptera, proteases, insect midgut.

Área: Microbiología y biotecnología

INTRODUCCIÓN

Las proteasas son enzimas que catabolizan a las proteínas mediante la hidrólisis de los enlaces entre cada aminoácido presente en proteínas y péptidos; a este proceso se le conoce como proteólisis. Las proteasas se clasifican en seis tipos de acuerdo a su sitio catalítico: serina, treonina, cisteína, aspartato, glutamato y metalo proteasas (Philipps, 2018). Recientemente, la proteasa intestinal de insectos ha ganado un interés en el campo de la biotecnología industrial y de los alimentos debido a sus capacidades alternativas a las proteasas microbianas (Kannan *et al.*, 2019).

Los insectos que necesitan proteína en su dieta emplean proteasas como enzimas digestivas y se encuentran en abundancia en la región del intestino medio (Cohen, 1995), algunas larvas de lepidópteros requieren una mezcla de enzimas que van desde las secretadas por glándulas salivales hasta del tracto digestivo como quitinasas y lipasas (Nation, 2016), endopeptidasas como serina

proteasas de tipo quimotripsina, así como aminopeptidasas y carboxipeptidasas. La mayoría de los artrópodos depredadores llevan a cabo digestión extraoral como estrategia para digerir presas de gran tamaño, es decir, licúan el contenido de la presa disolviendo los nutrientes antes de ser ingeridos. Un ejemplo de estos insectos y que es considerado como modelo dentro de la clasificación de depredadores polívoros, es *Chrysoperla carnea*. La forma larval en el tercer ínstar de este insecto es empleada en el manejo integrado de plagas por su alta voracidad, su fácil crianza en cautiverio, su capacidad depredadora y su resistencia a numerosos insecticidas (Mansoor *et al.*, 2017). Por medio de su mandíbula, inyecta un fluido paralizante, así como enzimas digestivas con la finalidad de inmovilizar a su presa y succionar el contenido interno hidrolizado, regurgitando y volviendo a succionar. Actualmente se cuenta con pocas referencias acerca de las diferentes enzimas digestivas producidas en el intestino medio de *C. carnea* y se carece por completo de su caracterización a nivel molecular. La exploración de nuevas actividades enzimáticas promete un sinnúmero de posibles y nuevas aplicaciones como enzimas industriales cuyo mercado mundial ha crecido de manera constante a lo largo de los años al ser empleadas en detergentes, biocombustibles, textiles, curtiduría, papel, síntesis orgánica (Kirk *et al.*, 2002). En la industria de los alimentos tanto para consumo humano como animal son ampliamente utilizadas, en el manejo de desechos de la industria pesquera (Sámano *et al.*, 2018) además de la producción de hidrolizados, por ser selectivas, reproducibles, rápidas, eficientes y carecer de subproductos indeseables (Zhang *et al.*, 2018; Singh *et al.*, 2019).

A pesar de que no se ha descrito formalmente la composición de la secreción digestiva de *C. carnea*, se ha reportado la presencia de serina y cisteína proteasas (Mulligan *et al.*, 2010); en nuestro equipo de investigación se ha estudiado el componente enzimático de la secreción, mediante el análisis de proteínas en geles 1D y 2D, zimogramas y caracterización con inhibidores específicos, reportando actividad de serina, cisteína, metalo proteasas, así como de lipasa. El análisis de los datos obtenidos por espectrometría de masas sugiere una similitud con una actividad de tipo tripsina presente en un escarabajo. Se continúa trabajando en la comparación con más bases de datos, así como para identificar los genes responsables de dichas actividades enzimáticas.

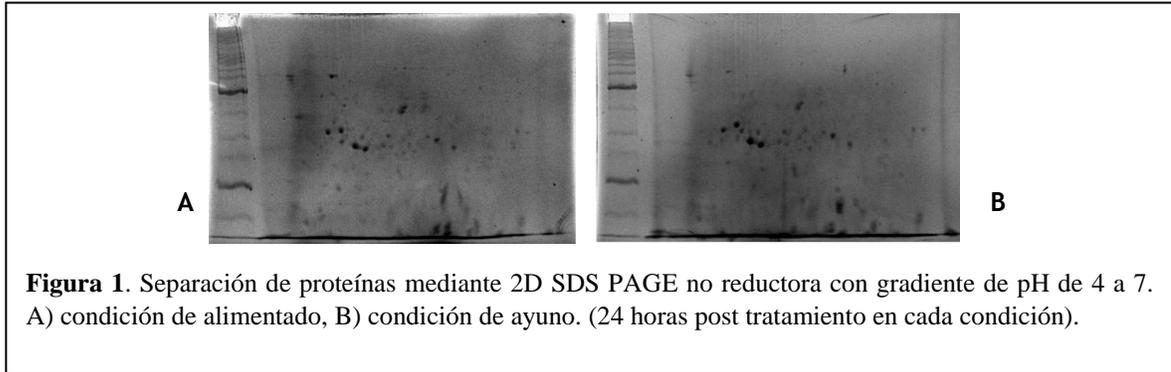
MATERIALES Y MÉTODOS

Las larvas de *C. carnea* fueron proporcionadas por el Laboratorio de Entomología del Departamento de Agronomía de la Universidad de Guanajuato Campus Irapuato-Salamanca, encontrándose todas en tercer ínstar. Se definieron dos condiciones: una en ayuno y otra de alimentación y se disectaron a las 24 horas posteriores a la alimentación. Cada una de las condiciones, así como de los tiempos se realizaron por triplicado. Se cuantificó la proteína de cada extracto crudo mediante el método de Bradford, utilizando un kit de Bio-Rad. Se llevó a cabo la separación de proteínas en geles de 1D utilizando el kit Mini-PROTEAN® 3 Cell de Bio-Rad™ para el sistema de búfer discontinuo SDS-PAGE. Las condiciones de electroforesis fueron a 12 mA/gel a 90V. Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie. Para la detección de proteasas, los geles estuvieron en contacto con gelatina al 0.12%. Para actividad de lipasas se empleó 4-Metil-umbeliferil-butirato (MUF).

Una vez que se definieron las diferentes actividades enzimáticas, se llevaron a cabo geles de 2D siguiendo las recomendaciones del manual 2-D Electroforesis Principios y Métodos de GE Healthcare, utilizando tiras Immobiline™ DryStrips a pH 3 a 10 y 4 a 7 y se establecieron las condiciones de enfoque isoeléctrico en un Ettan™ IPGphor 3 IEF System. Las imágenes fueron capturadas en un fotodocumentador ChemiDoc™ XRS+ System. El análisis de las imágenes 2D PAGE se realizó con el software Melanie™ 7.0 (Swiss Institute of Bioinformatics) se compararon los triplicados de cada condición y se construyó un gel patrón promedio, donde se ubicó la posición de los spots de interés que poseen actividad de proteasa los cuales fueron cortados manualmente y almacenados para su posterior análisis mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF). Los datos crudos fueron importados en el software Trans Proteomic Pipeline (TPP) (Pedrioli, 2010) en donde se realizó una comparación contra diferentes bases de datos generales como NCBI-NR para insecto, Chrysopidae, Neuroptera y Proteasas.

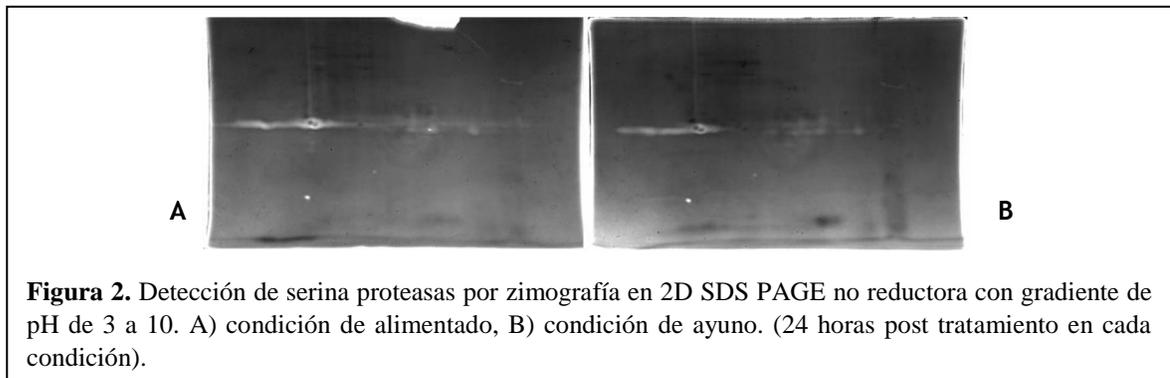
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el intestino medio de larva en tercer ínstar de *C. carnea* se identificaron dos tipos de proteasas (serina proteasa y metal proteasa) así como una lipasa. Mediante 2D SDS PAGE en condiciones no desnaturizantes y a un gradiente de pH 3 a 10 se obtuvo un patrón de spots, en su mayoría conglomerados, similar en las dos condiciones (ayuno y alimentación; 24 horas post tratamiento) alrededor de los 30 KDa y a un pH ácido; por lo que se procedió a ampliar el gradiente de pH de 4 a 7 observándose spots más definidos y de mayor tamaño a un pH entre 5 y 6 alrededor de los 30 KDa (**Figura 1**).

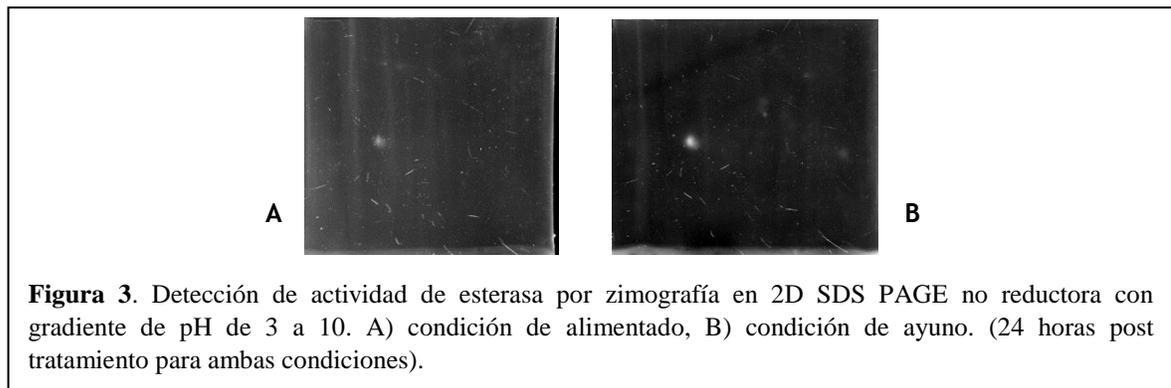


Se conoce que las serina proteasas del tipo tripsina tienen un peso entre 20 y 35 KDa y un punto isoeléctrico (PI) variable de entre 4 y 5 así como de 8 a 9 (Terra y Ferreira, 1994). En base a estas referencias, se sugiere la presencia de serina proteasas dentro de la aglomeración a pH ácido. Las metalo proteasas al igual que las carboxipeptidasas se presentan en un rango de peso molecular (PM) entre 20 y 50 KDa. Este estudio se repitió con apoyo de zimogramas a un rango de pH entre 3 a 10; el patrón de áreas de actividad fue similar en las dos condiciones, ambas comparten un área no resuelta con mayor actividad a pH ácido, pero con menor actividad a pH alcalino, localizadas alrededor de los 30 KDa. La ubicación de la zona de mayor catálisis coincide con el PM y PI de las serina proteasas particularmente con la enzima tripsina (**Figura 2**).

En la detección de lipasas (**Figura 3**) el patrón de actividad enzimática fue similar en las dos condiciones, compartiendo un área no resuelta con mayor actividad a pH ácido y a 30 KDa. Para



lipasas no se ha reportado un rango de PM específico ni información sobre PI sin embargo se conoce



que enzimas hidrolíticas con un sitio catalítico de serina presentan amplia especificidad de sustrato teniendo actividad de proteasas y lipasas. Estas enzimas presentan un rango de PM entre 22 y 60 KDa y un PI entre 4 y 6. (Akoh *et al.*, 2004). La ubicación de la zona de catálisis coincide con la de serina proteasa y al realizar el zimograma con MUF butirato como sustrato, se sugiere que se trata de una esterasa.

Para la identificación de proteínas se seleccionaron cinco spots en base a los resultados anteriores con un PM entre 27-28 KDa y un PI entre 5 y 6. Las muestras se analizaron por medio de espectrometría de masas y se obtuvieron los datos RAW que al ser comparados con diferentes bases de datos mediante la plataforma TPP se observaron altas coincidencias con proteasas presentes en insectos como de la proteína actina, como se muestra en la **tabla 1**.

Tabla I. Resultados del análisis con el software Trans Proteomic Pipeline. La probabilidad en la coincidencia de espectros de péptidos mostrada en este programa mientras más cercana esté a 1.0000 es más significativa. Las bases de datos empleadas en los spots 27,29 y 33 corresponden a NCBI-NR y para 32 y 34 a Neuroptera.		
Spot	Similitud	Probabilidad
27	Odorant-binding protein <i>Chrysopa pallens</i> (Neuroptera:Chrysopidae)	0.9366
29	Chemosensory protein <i>C. pallens</i>	0.9471
32	Actin <i>Chrysopa septempunctata</i> (Neuroptera:Chrysopidae)	1.0000
33	Tripsin <i>Onthophagus taurus</i> (Coleoptera:Scarabaeidae)	0.9958
34	Actin (<i>C.septempunctata</i>)	1.0000

Podemos concluir que la zona de catálisis que muestra actividad de proteasa y esterasa se encuentra ~30 KDa y a un pH entre 4 y 5. En la identificación de proteínas, se encontraron dos muestras que coincidieron con Actina, proteína presente en todas las células, esencial para la movilidad celular constituyendo el citoesqueleto y formando microfilamentos (Pollard y Cooper, 1986); al no encontrarse exactamente en la misma zona podría tratarse de isoformas. Los spots 27 y 29 presentaron semejanzas con proteínas de *Chrysopa pallens*; este insecto a diferencia de *C. carnea*, tanto la forma larval como el adulto son depredadores y si bien pertenecen a la misma familia, deben de presentar diferencias importantes a nivel genético. Finalmente, el spot 33 coincidió con una tripsina de *Onthophagus taurus*, un escarabajo pelotero, la cual es candidata a un estudio más profundo con el fin de poder ser aprovechada, ya que algunos autores concluyen que los insectos, son una potencial fuente de enzimas requeridas por la biotecnología industrial, siendo relevante su participación en el área alimentaria (Mika *et al.*, 2015; Kannan *et al.*, 2019).

BIBLIOGRAFÍA

- Akoh, C. C., Lee, G. C., Liaw, Y. C., Huang, T. H., y Shaw, J. F. (2004). GDSL family of serine esterases/lipases. *Progress in Lipid Research*, 43(6), 534-552.
- Cohen, A. C. (1995). Extra-oral digestion in predaceous terrestrial Arthropoda. *Annual Review of Entomology*, 40(1), 85-103.
- Kannan, M., Mubarakali, D., Thiyonila, B., Krishnan, M., Padmanaban, B., y Shantkriti, S. (2019). Insect gut as a bioresource for potential enzymes- an unexploited area for industrial biotechnology. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 18. doi.org/10.1016/j.bcab.2019.01.048
- Kirk, O., Borchert, T. V., y Fuglsang, C. C. (2002). Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(4), 345-351.
- Mansoor, M. M., Raza, A. B. M., Abbas, N., Aqueel, M. A., y Afzal, M. (2017). Resistance of green lacewing, *Chrysoperla carnea* Stephens to nitenpyram: Cross-resistance patterns, mechanism, stability, and realized heritability. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 135, 59-63.
- Mika, N., Gorshkov, V., Spengler, B., Zorn, H. y Rühl, M. (2015) Characterization of novel insect associated peptidases for hydrolysis of food proteins. *European Food Research and Technology*, 240 (2), 431-439.

- Mulligan, E. A., Ferry, N., Jouanin, L., Romeis, J., y Gatehouse, A. M. (2010). Characterisation of adult green lacewing (*Chrysoperla carnea*) digestive physiology: impact of a cysteine protease inhibitor and a synthetic pyrethroid. *Pest Management Science*, 66(3), 325-336
- Nation, J.L. (2016). Digestion. En Taylor & Francis Group, *Insect Physiology and Biochemistry* (33-64) USA: CRC.
- Philipps, W. P. (2018). Proteases—general aspects. In *Enzymes in Human and Animal Nutrition* (pp. 257-266).
- Pedrioli, P. G. (2010). Trans-proteomic pipeline: a pipeline for proteomic analysis. In *Proteome Bioinformatics*, Humana Press. 213-238.
- Pollard, T. D., y Cooper, J. A. (1986). Actin and actin-binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and functions. *Annual review of biochemistry*, 55(1), 987-1035.
- Sámano, A. C. H., Magaña, O. L., Zavaleta, M. F., García, X. G., López, R. E. A., Barrientos, R. G., y Legarreta, I. G. (2018). Potencial bioactivo y nutricional de los recursos pesqueros. En I. Guerrero, M. Rosmini y E. Armenta, *Utilización de pescados y mariscos: Tecnologías e Innovación* (p 33). Beau Bassin, Mauricio: Académica Española.
- Singh, R., Singh, A., & Sachan, S. (2019). Enzymes Used in the Food Industry: Friends or Foes? En *Enzymes in Food Biotechnology*. pp 827-843. Academic Press.
- Terra, W. R., y Ferreira, C. (1994). Review: Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 109B (1), 1–62. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(94\)90141-4](https://doi.org/10.1016/0305-0491(94)90141-4)
- Zhang, Y., He, S., y Simpson, B. K. (2018). Enzymes in food bioprocessing—novel food enzymes, applications, and related techniques. *Current Opinion in Food Science*, 19, 30-35.