

ANÁLISIS PRELIMINAR DE LA DEGRADACIÓN DE LAS VITELINAS EN LA EMBRIOGÉNESIS TEMPRANA DE *Dactylopius coccus* COSTA

Arturo Ramírez-Cruz

Instituto Politécnico Nacional, Centro de
Educación Continua, Unidad Morelia. 58190.
Morelia, Michoacán
Correo electrónico: aramirez@ipn.mx

RESUMEN

Mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, bajo condiciones desnaturizantes, se realizó un análisis preliminar sobre la degradación de las vitelinas realizada por los embriones tempranos de la grana cochinilla *Dactylopius coccus*. Se observó que los embriones, desde la etapa de blástula temprana hasta al menos la etapa de la anatrepsis tardía, no realizaron ningún tipo de degradación de las vitelinas, lo que sugiere que estas proteínas deben ser degradadas y, en consecuencia, utilizadas por los embriones de esta especie, hasta etapas muy avanzadas de su desarrollo embrionario.

PALABRAS CLAVE: Desarrollo embrionario, grana cochinilla, proteínas hemolinfáticas.

ABSTRACT

Through polyacrylamide gel electrophoresis, under denaturing conditions, a preliminary analysis of vitellins degradation accomplished by early embryos of cochineal insect *Dactylopius coccus* was realized. It was observed that embryos since stage of early blastula until, at least, the stage of late anatrepsis, did not realize any type of vitellins degradation, which suggest that these proteins must be degraded, and in consequence, utilized by the embryos until advanced stage of its embryonic development.

KEY WORDS: Cochineal insect, embryonic development, hemolymphatic proteins.

INTRODUCCIÓN

Las vitelinas son una serie de lipoglicoproteínas presentes en el huevo de los insectos, formando parte de lo que se denomina como vitelo. Éstas se originan de las vitelogeninas, un grupo de glicolipoproteínas sintetizadas en el cuerpo graso, transportadas por la hemolinfa, que ingresan por endocitosis al huevo en desarrollo durante la llamada vitelogenénesis (Hagedorn y Kunkel, 1979; Raikhel y Dhadialla, 1992), siendo por ello proteínas de origen materno. Las vitelinas representan entre el 60 y 90% de las proteínas solubles del huevo de los insectos (Hagedorn y Kunkel, 1979). Durante el desarrollo embrionario, las vitelinas deben ser enzimáticamente degradadas para poder proporcionarles al embrión proteínas, lípidos y carbohidratos, principalmente (Sander *et al.*, 1985).

La grana cochinilla *Dactylopius coccus* Costa (Hemiptera: Dactylopiidae) es el insecto del cual se extrae el colorante rojo ácido carmínico. Este colorante actualmente tiene una gran variedad de usos en diferentes industrias, entre ellas la farmacéutica, la alimenticia, la de los cosméticos, y la textil, entre otras (Méndez-Gallegos *et al.*, 2003).

Debido a la importancia que representa *D. coccus*, hasta hace sólo pocos años ha tomado interés el estudio de algunas de las proteínas halladas en su hemolinfa, tal es el caso de la profenoloxidasas (Hernández-Hernández *et al.*, 2003), la óxido nítrico sintasa (García-Gil de Muñoz *et al.*, 2007), las lipasas (García-Gil *et al.* 2008), las vitelogeninas y las vitelinas, de las cuales, las vitelinas en los huevos de esta especie, se ha encontrado que están formadas por al menos tres subunidades proteínicas, cuyos pesos moleculares son de 48, 51 y 53 kilodaltones (kDa), respectivamente (Ramírez-Cruz, 2007). Por otra parte, se sabe que *D. coccus* es una especie ovovivípara (Llanderal y Nieto, 2001) y que todo el desarrollo embrionario se realiza intraováricamente (Ramírez-Cruz y Llanderal-Cázares, 2010).



Con la finalidad de contribuir al conocimiento de la biología de esta importante especie, el objetivo de este trabajo fue realizar un análisis preliminar de la degradación de las vitelinas efectuada por los embriones tempranos de *D. coccus*, desde la etapa de blástula temprana hasta la etapa de la anatrepsis tardía.

MATERIALES Y MÉTODOS

El método de crianza para la obtención de las hembras adultas de *D. coccus*, se describe en Ramírez-Cruz *et al.* (2008). Para determinar la dinámica de la degradación de las vitelinas, se emplearon embriones obtenidos de los ovarios de hembras adultas de 15 (n=4), 25 (n=4) y 30 (n=3) días de edad postemergencia, ya que se sabe que a los 15 días, sus ovarios contienen embriones en etapas tempranas de la segmentación (blástulas tempranas); a los 25 días, presentan desde blástulas medias, hasta embriones en anatrepsis temprana, mientras que a los 30 días de edad, sus ovarios contienen principalmente embriones en anatrepsis tardía (Ramírez-Cruz, datos sin publicar). Los ovarios fueron procesados para su estudio mediante la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) (Bollag y Edelstein, 1992; Gersten, 1996), para lo cual éstos se obtuvieron mediante la disección de las hembras adultas en solución de Ringer para insectos (Martínez, 2002); después cada par de ovarios se colocó por separado en tubos Eppendorf de 0.5 mL. Para obtener un extracto de los ovarios, éstos se trituraron dentro de los tubos con una varilla delgada de vidrio. Una parte de cada uno de los extractos se usó para calcular su concentración de proteínas mediante el método de Bradford, usando albúmina sérica bovina como patrón (Bio-Rad Protein Assay®). La parte restante del extracto de cada tubo se mezcló junto con 10 L de una solución de los inhibidores de proteasas, conteniendo EDTA 1M (sal disódica del ácido etilen diamino tetracético), pHMB 1M (ácido para-hidroximercuribenzoico) y PMSF 0.33 M (fenil metil sulfonil fluoruro) (Maizels *et al.*, 1991) y se centrifugó a 3000-4000 revoluciones por minuto durante cinco minutos. Después cada sobrenadante se recuperó en otro tubo Eppendorf de 0.5 mL, y se le adicionó en proporción 1:1 el regulador de muestra 2x, conteniendo solución reguladora Tris (hidroximetil) aminometano-HCl; solución de (SDS) dodecil sulfato de sodio al 10%; 2-mercaptoetanol; glicerol; azul de bromofenol. Se calentaron las muestras a 95°C durante 10 minutos, para posteriormente almacenarse a -20°C hasta su utilización. Los corrimientos electroforéticos se realizaron en condiciones desnaturizantes con SDS y 2-mercaptoetanol, aplicando 5 L de cada muestra sobre geles de poliacrilamida al 7.5 % (Gersten, 1996) y con un voltaje de 200 voltios durante 1

hora. Los marcadores de peso molecular usados fueron: Miosina (200 kDa); -galactosidasa (116 kDa); fosforilasa B (97 kDa); albúmina sérica (66 kDa); ovoalbúmina (45 kDa) (Bio-Rad SDS-PAGE Weight Standards®). Finalmente los geles se tiñeron con azul de Coomassie al 0.2% y se destiñeron con una mezcla de metanol, ácido acético y agua; el cálculo de los pesos moleculares de cada una de las fracciones proteínicas se realizó graficando los Rf de los marcadores de peso molecular contra el logaritmo de su peso molecular (Bollag y Edelstein, 1992).

RESULTADOS.

Los patrones electroforéticos de los embriones en etapa de blástula temprana (15 días de edad postemergencia de las hembras adultas), mostraron claramente las tres fracciones proteínicas correspondientes a sus vitelinas cuyos pesos moleculares son de 48, 51 y 53 kDa (Figura 1); la fracción proteínica de 48 kDa fue la más tenue por ser la de menor concentración con relación a las otras dos fracciones proteínicas. Desde esta edad se observan además dos bandas proteínicas muy tenues y menores a 45 kDa, cuyos pesos aproximados son de 32 y 38 kDa, respectivamente (Figura 1).

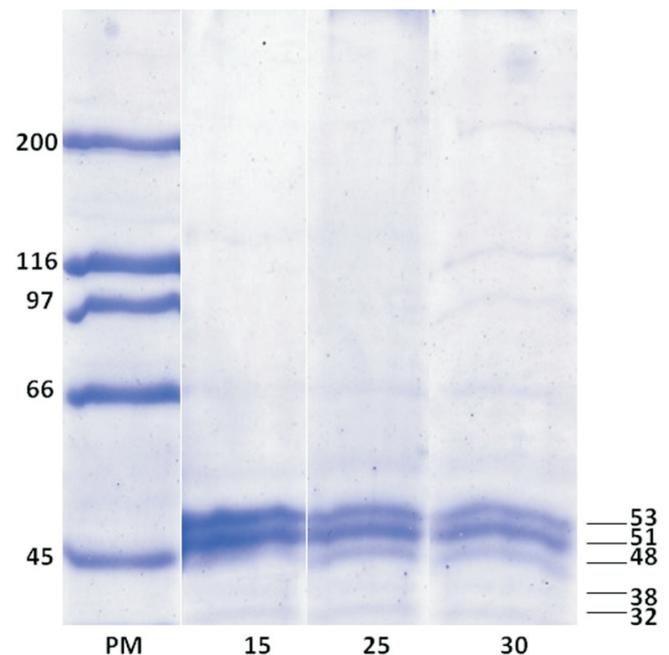


Figura 1. Patrones electroforéticos de embriones contenidos en ovarios de hembras adultas de *Dactylopius coccus*, de 15, 25 y 30 días de edad postemergencia. 48, 51 y 53, corresponden a pesos moleculares (kDa) de subunidades proteínicas de las vitelinas; 35 y 38 corresponden a pesos moleculares (kDa) de subunidades proteínicas embrionarias. PM: marcadores de peso molecular en kDa.

Por otra parte, los patrones electroforéticos de las tres fracciones vitelínicas observados desde blástulas medias hasta la anatrepsis temprana (25 días de edad postemergencia de las hembras adultas) fueron semejantes a los observados a los 15 días de edad; las tres fracciones vitelínicas se observaron sin cambios aparentes, y tampoco hubo aparición de nuevas bandas proteínicas menores a 48, 51 o 53 kDa, que sugirieran proteólisis de dichas proteínas (Figura 1).

Del mismo modo, los patrones electroforéticos de las tres fracciones vitelínicas de los embriones en anatrepsis tardía (30 días de edad postemergencia de las hembras adultas), tampoco mostraron cambios en lo referente a dichas proteínas (Figura 1), las cuales se mantienen hasta esta edad aparentemente intactas, es decir, sin señales de degradación enzimática embrionaria.

DISCUSIÓN

Las tres fracciones proteínicas de 48, 51 y 53 kDa, correspondientes a las vitelinas de *D. coccus* (Ramírez-Cruz, 2007), se aprecian claramente en los patrones electroforéticos de las blástulas tempranas presentes en los ovarios de *D. coccus* de 15 días de edad. Por otra parte, las bandas proteínicas de 32 y 38 kDa que se observan a partir de esta edad (y hasta el día 30 de edad), no corresponden a productos de degradación temprana de las vitelinas, ya que los vitelófagos (las células encargadas de la degradación del vitelo) en los embriones de los insectos se presentan a partir de la etapa de blástula tardía (Klowden, 2007); dichas bandas proteínicas corresponden más bien a proteínas embrionarias. Por otra parte, a pesar de que los ovarios de las hembras adultas de *D. coccus* presentan embriones en etapas de blástula tardía (a los 25 días de edad) o incluso etapas tan avanzadas como la anatrepsis tardía (a los 30 días de edad), tampoco fue posible detectar proteólisis de las vitelinas, lo cual indica que al menos hasta la anatrepsis tardía, los embriones de *D. coccus* no hacen uso de las vitelinas como fuente de proteínas para su metabolismo, y que dicha degradación debe realizarse sólo hasta etapas muy avanzadas de su embriogénesis, tal como sucede en el hemíptero *Rhodnius prolixus* Stal (Triatominae), para el que se ha determinado que las vitelinas comienzan a ser usadas por el embrión hasta muy avanzado su desarrollo (al finalizar la catatrepsis), cuando una degradación alta de sus vitelinas se realiza dentro del tubo digestivo (Oliveira *et al.*, 1989).

Se sabe que en general, durante la embriogénesis temprana en insectos y en otros artrópodos, las reservas proteínicas del vitelo permanecen prácticamente intactas, y que es hasta las últimas fases de su desarrollo cuando el embrión realiza un notable uso de dichas reservas, e incluso aún en las

etapas postembrionarias recién emergidas, cantidades apreciables de vitelo permanecen sin ser utilizadas (Sander *et al.*, 1985; Yamashita e Indrasith, 1988; Valle, 1993). Sin embargo, esto no es una regla, ya que en el caso de los embriones de *Drosophila melanogaster* Meigen (Diptera, Drosophilidae), cuya embriogénesis dura tan sólo 24 horas (Campos-Ortega y Hartenstein, 1985), la degradación de las vitelinas comienza poco después de que el huevo ha sido fecundado (Bownes y Hames, 1977); esta degradación tan temprana seguramente se debe a la extremadamente breve duración de su desarrollo embrionario.

A pesar de que la mayor parte de las reservas de vitelo en el huevo de los insectos son de naturaleza proteínica (alrededor del 90 % de la proteína total del huevo), éstas son las últimas reservas en ser utilizadas, siendo los carbohidratos y los lípidos las primeras fuentes energéticas en ser metabolizadas por el embrión (Sander *et al.*, 1985); particularmente se sabe que en el lepidóptero *Antheraea mylitta* Drury (Saturnidae), los carbohidratos son usados principalmente durante el desarrollo embrionario temprano (gastrulación y blastocinesis) y los lípidos se utilizan durante el desarrollo embrionario tardío (histogénesis y crecimiento) (Pant *et al.*, 1979). Algo semejante ocurre en el lepidóptero *Heliothis virescens* (Fabricius) (Lepidoptera), en el que los lípidos y carbohidratos se usan durante todo el desarrollo embrionario como fuente importante de energía, mientras que las proteínas sólo se usan de manera muy limitada (Cohen y Patana, 1985). En este sentido, Sander *et al.* (1985), indicaron que el uso tardío de las reservas proteínicas, como fuente de energía durante la embriogénesis en los insectos, posiblemente se debe a los problemas que implica la acumulación de los desechos nitrogenados producto del metabolismo oxidativo de las proteínas.

CONCLUSIONES

Durante la embriogénesis temprana de *D. coccus*, al menos hasta la etapa de la anatrepsis tardía, no hay indicios de que sus embriones realicen proteólisis de sus vitelinas, lo cual indica que el embrión aún en esta etapa no hace uso de estas proteínas como fuente proteínica para su desarrollo; ello sugiere que esas proteínas son usadas durante etapas más tardías de su desarrollo embrionario. Es necesario profundizar en este estudio para conocer el momento y la dinámica precisos de la degradación proteolítica de las vitelinas durante la embriogénesis de *D. coccus*, así como los mecanismos implicados en ello.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bollag, D. M., S. J. Edelman. 1992. Protein Methods. Wiley-Liss.

- New York.
- Bowen, M., B. D. Hames. 1977. Accumulation and degradation of three major yolk proteins in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Zoology* 200: 149-156.
- Campos-Ortega, J., A. V. Hartenstein. 1985. *The Embryonic Development of Drosophila melanogaster*. Springer-Verlag, Berlin.
- Cohen, A. C., R. Patana. 1985. Chemical composition of tobacco budworm eggs during development. *Comparative Biochemistry and Physiology* 81B: 165-169.
- García-Gil de Muñoz, F., H. Lanz-Mendoza, F. C. Hernández-Hernández. 2007. Free radical generation during the activation of hemolymph prepared from the homopteran *Dactylopius coccus*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 65: 20-28.
- García-Gil, F., J. P. Orduña-Villalobos, C. Rangel-Martínez, I. del Río-Dueñas, F. C. Hernández-Hernández. 2008. Caracterización enzimática de la hemolinfa en la cochinilla del nopal *Dactylopius coccus*. En: *Grana Cochinilla y Colorantes Naturales* (Eds. Llanderal, C, D. H. Zetina, A. L. Viguera, L. Portillo). Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México, pp. 27-28.
- Gersten, D. M. 1996. *Gel Electrophoresis Proteins. Essential Techniques*. John Wiley and Sons, Oxford.
- Hagedorn, H. H., J. G. Kunkel. 1979. Vitellogenin and vitellin in insects. *Annual Review of Entomology* 24: 475-505.
- Hernández-Hernández, F., F. García-Gil de Muñoz, A. Rojas-Martínez, S. Hernández-Martínez, H. Lanz-Mendoza. 2003. Carminic acid dye from the homopteran *Dactylopius coccus* hemolymph is consumed during treatment with different microbial elicitors. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 54: 37-45.
- Klowden, M. J. 2007. *Physiological Systems in Insects*. 2nd edition. Academic Press, San Diego, California.
- Llanderal, C. C., R. Nieto H. 2001. Características biológicas de la grana cochinilla del nopal *Dactylopius coccus* Costa. En: *Producción de Grana Cochinilla* (Eds. Llanderal, C., R. Nieto H.). Instituto de Fitosanidad, Colegio de Postgraduados, Texcoco, Estado de México, pp. 23-30
- Maizels, R. M., M. L. Blaxter, B. D. Robertson, M. E. Selkirk. 1991. Parasite antigens. Parasite genes. *A Laboratory Manual for Molecular Parasitology*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Martínez M., I. 2002. Técnicas básicas de anatomía microscópica y de morfometría para estudiar los insectos. *Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa* 30: 187-195.
- Méndez-Gallegos, S. de J., T. Panzavolta, R. Tiberi. 2003. Carmine cochineal *Dactylopius coccus* Costa (Rhynchota: Dactylopiidae): significance, production and use. *Advance in Horticultural Science* 17: 165-171.
- Oliveira, P. L., P. M. Dansa De Alencar, H. Masuda. 1989. Vitellin processing and degradation during embryogenesis in *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochemistry* 19: 489-498.
- Pant, R., S. Kumar, S. D. Singh. 1979. Changes in carbohydrates and lipids during embryonic development of *Antheraea mylitta* (Lepidoptera). *Journal of Biosciences* 1: 27-33.
- Raikhel, A. S., T. S. Dhadialla. 1992. Accumulation of yolk proteins in insects oocytes. *Annual Review of Entomology* 37: 217-251.
- Ramírez-Cruz, A. 2007. Vitelogeninas y vitelinas de la grana cochinilla *Dactylopius coccus* Costa (Hemiptera: Dactylopiidae). *Entomología Mexicana* 6: 939-941.
- Ramírez-Cruz, A., C. Llanderal-Cázares, R. Racotta. 2008. Ovariole structure of cochineal scale insect, *Dactylopius coccus*. *Journal of Insect Science* 8:20.
- Ramírez-Cruz, A., C. Llanderal-Cázares. 2010. Biología reproductiva de la hembra de *Dactylopius coccus* Costa. En: *Conocimiento y Aprovechamiento de la Grana Cochinilla del Nopal* (Eds. Portillo, L., A. L. Viguera). Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México, pp. 13-16.
- Sander, K., H. O. Gutzeit, H. Jäckle. 1985. *Insect Embryogenesis: Morphology, Physiology, Genetical and Molecular Aspects*. In: *Comprehensive Insects Physiology, Biochemistry and Pharmacology* (Eds. Kerkut, G. A., L. I. Gilbert). Pergamon Press, New York, pp. 319-385.
- Valle, D. 1993. Vitellogenesis in insects and other groups-a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 88:1-26.
- Yamashita, O., L. S. Indrasith. 1988. Metabolic fates of yolk during embryogenesis in arthropods. *Development, Growth and Differentiation* 30: 337-346.

