

PRIMER REPORTE DE LA IMPLICACIÓN DE LOS N-GLICANOS SULFATADOS Y LA COMPOSICIÓN PROTEICA DE LAS SETAS URTICANTES DE *HYLESIA METABUS* EN EL LEPIDOPTERISMO Y EN LOS POSIBLES MECANISMOS DE DEFENSA.

ENTIDAD EJECUTORA PRINCIPAL: Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología

AUTORES PRINCIPALES

1. Gleysin Cabrera Hernández
2. Luis Javier González López

OTROS AUTORES:

1. Ulf Lundberg
2. Víctor Salazar
3. Raquel Montesino
4. Weston Struwe
5. David Harvey
6. Arielis Rodríguez-Ulloa
7. Melfrán Herrera
8. Yanet Támbra Hernández
9. Bruno Domon
10. Lesur Antoine
11. Madelón Portela
12. Annia González-Hernández
13. Mónica Rincón
14. Milagros del Valle Méndez
15. Wendy Machado
16. Sucel Palomares
17. Luis Ariel Espinosa
18. Rosario Durán
19. Ada Triguero
20. Yassel Ramos
21. Evelyn León
22. Vladimir Besada

23. Eva Vonasek

OTRAS ENTIDADES PARTICIPANTES:

1. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Venezuela
2. Coordinación de Vigilancia Entomológica. Gerencia de Saneamiento Ambiental y Control de Epidemias. Fundasalud. Venezuela.
3. Instituto Pasteur de Montevideo, Uruguay
4. Universidad de Oxford, Inglaterra
5. Laboratorio de Proteómica Clínica de Luxemburgo, Luxemburgo

Autor para la correspondencia:

Luis Javier González López
Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología.
Avenida 31 e/ 186 y 190. Cubacán. Playa
Email: luis.javier@cigb.edu.cu
Telefono: 7 271 6022, ext. 1122
FAX: 7 271 4764

RESUMEN:

Antecedentes: *Hylesia metabus* (Lepidoptera: Saturniidae) es una polilla neotropical que habita en el noreste de Venezuela en las zonas pantanosas del Delta del Orinoco. La hembra adulta posee unos "pelos urticantes" o "setas" que contienen una solución de composición proteica desconocida que al entrar en contacto con la dermis y la epidermis ocasiona el lepidopterismo en los humanos caracterizado por una dermatitis severa, inflamación, hemorragias focales, insomnio, intranquilidad, estado febril, entre otros síntomas. Este insecto posee fototropismo positivo por lo que golpea de manera incansable toda fuente de iluminación desprendiendo grandes cantidades de setas que obliga a los pobladores de las zonas afectadas y a los trabajadores de zonas de prospección petrolera a apagar toda fuente de iluminación nocturna. Las setas también son utilizadas para recubrir el nido y proteger los huevos fundamentalmente de depredadores e infecciones por hongos, y bacterias durante 26 días. El ciclo de vida de *H. metabus* dura aproximadamente 100 días por lo que los problemas antes mencionados son de naturaleza cíclica, causan grandes pérdidas económicas y constituye un problema de salud por lo que se considera una plaga que afecta a las poblaciones que viven en esas localidades. **Problema que se ha resuelto de acuerdo con los objetivos del trabajo:** En el presente estudio identificamos los componentes proteicos

y oligosacarídicos del veneno de *H. metabus* responsables de ocasionar el lepidopterismo en humanos y su posible relación con los mecanismos de defensa utilizados por esta polilla para proteger a la progenie. **Resultados:** Se identificaron utilizando las herramientas de la proteómica, glicómica y la bioinformática las proteínas presentes en el veneno de las setas de la hembra adulta de *H. metabus*. El rasgo distintivo de este veneno es la presencia de cinco proteasas del tipo S1A que representan el 65 % del veneno total, y que están *N*-glicosiladas con una mezcla de *N*-glicanos diantennados agalactosilados y fucosilados (G0F), neutros y sulfatados. En un modelo animal de lepidopterismo se demostró que la actividad proteolítica de una de las proteasas está relacionada con la erosión de los vasos sanguíneos y la aparición de hemorragias focales. En cambio la presencia de *N*-glicanos sulfatados en las dos proteasas que concentran la mayor parte de la actividad proteolítica del veneno total, son responsables de estimular la secreción del TNF- α en macrófagos y desencadenar la respuesta proinflamatoria típica del lepidopterismo. La composición proteica de las setas presentes en el nido de huevos reveló su relación con posibles mecanismos de defensa. Las proteínas de la hemolinfa (30 kDa y vitellogenina) detectadas pueden tener un rol en la respuesta a entomopatógenos (hongos y bacterias). También se identificó una quitinasa que puede estar relacionada con la respuesta antifúngica, y ser una molécula con potencialidades estimuladoras de la respuesta proinflamatoria y adjuvante ante los componentes del veneno así como potenciar los efectos adversos del lepidopterismo. La acción combinada de la quitinasa y las proteasas pudiera ocasionar daños del exoesqueleto de artrópodos que pretendan entrar al nido. En este trabajo por primera vez se informa la sulfatación de *N*-glicanos en insectos y su rol clave en el lepidopterismo ocasionado a seres humanos. Se informa por primera vez la composición proteica del veneno de la especie de *Hylesia* más nociva para los seres humanos. Se propone un método de diferenciación de *N*-glicanos fosfatados y sulfatados basado en las diferencias de la distribución isotópica del ion reportero de *m/z* 97. Estos hallazgos constituyen un primer paso para el futuro diseño racional de drogas y el control de plagas. Estos trabajos forman parte de un proyecto conjunto aprobado en la X Comisión Mixta Venezuela-Cuba y está avalado por dos publicaciones internacionales:

1-**Glycobiology** (2016) 26 (3): 230-250. [doi:10.1093/glycob/cwv096](https://doi.org/10.1093/glycob/cwv096)

2-**Journal of Proteomics** (2016) [doi:10.1016/j.jprot.2016.08.010](https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.08.010)

COMUNICACIÓN CORTA

Hylesia metabus es una polilla neotropical que habita en el noreste del continente sudamericano en la regiones pantanosas ricas en manglares en países como Venezuela, Surinam, Guyana Francesa e Inglesa, Trinidad y Tobago y Brasil. La hembra de *H. metabus* posee unos "pelos abdominales" conocidos también como setas que poseen sustancias urticantes de naturaleza desconocida. Cuando estas setas entran en

contacto con la dermis o la epidermis de un ser humano desencadena una dermatitis severa, caracterizada por un intenso escozor y la formación de vesículas eritomasas, la degeneración vascular, hemorragias focales, un proceso inflamatorio local, insomnio, intranquilidad, síntomas febriles ligeros **(1)**. Estos síntomas aparecen 6 a 12 horas después del contacto con las setas de la hembra y puede durar desde 5-10 días, aunque en algunos casos más complejos puede durar hasta meses. La aparición de estos síntomas no requiere una exposición previa y no hay un tratamiento médico específico que sea efectivo. Ni los antihistamínicos, ni los esteroides resuelven de manera efectiva los efectos adversos descritos. Esta condición médica se denomina lepidoperismo.

Cuando llega la época de apareamiento enormes cantidades de setas abdominales son dispersas por la hembra en el enjambre de insectos probablemente con el objetivo de impedir la irrupción de depredadores en este acto tan importante para la perpetuación de esta especie. Las setas son muy ligeras y pueden ser fácilmente dispersadas por el viento llegando a afectar extensas áreas incluso geográficamente distantes. Las setas mantienen sus propiedades urticantes durante meses en condiciones ambientales. Por otra parte, este insecto posee fototropismo positivo y golpea de manera incontrolada toda fuente de luz artificial en los horarios nocturnos desprendiendo grandes cantidades de setas, lo que obliga a los pobladores de las regiones afectadas apagar el alumbrado público y toda fuente de iluminación en el hogar. El ciclo de vida de este insecto dura aproximadamente 100 días por lo que los problemas antes citados son de naturaleza cíclica, causa interrupciones en las actividades docentes, comercio, agricultura, prospección petrolera y ocasiona considerables pérdidas económicas. El lepidopterismo causado por *H. metabus* constituye un problema de salud en Venezuela, de hecho este insecto es considerado como el más nocivo entre el género de *Hylesia* spp.

H. metabus en sus estadios larvales posee muchos enemigos naturales (avispa y moscas parasitoides, hongos, bacterias, etc) que causan grandes afectaciones a la población larval impidiendo que una fracción considerable (hasta un 90 %) de esta no llegue a su madurez reproductiva. En estos estadios las larvas no poseen el máximo poder urticante de sus setas, de hecho las larvas de *H. metabus* son un eslabón muy importante de la cadena alimenticia de los pantanos. Para compensar estas pérdidas de su población, *H. metabus* debe maximizar su eficiencia en las etapas reproductiva de su ciclo de vida, dígame **(I)** apareamiento, **(II)** nido de huevos y **(III)** eclosión. En particular en estos tres estadios están involucradas las setas urticantes de la hembras y constituyen parte importante en el mecanismo de defensa para ahuyentar a depredadores y defenderse de microorganismos entomopatógenos letales (hongos, bacterias, entre otros) que están presentes en su hábitat natural. Las elevadas temperaturas y humedad presentes en los pantanos son favorables para la proliferación de este tipo de infección. Osborn y colaboradores han encontrado 29 cepas bacterianas diferentes aisladas de larvas de *H. metabus* siendo *P.*

aeruginosa la más letal (2). La hembra de *H. metabus* a diferencia de otros lepidópteros pone todos los huevos (200-300) en una sola oviposición en un nido que recubre de sus setas urticantes hasta que ocurra la eclosión en los 26 días posteriores. Cualquier daño ocasionado al nido constituye una pérdida considerable de la progenie. El nido de huevos es una fuente más segura para obtener las setas urticantes pues estas se encuentran compactadas y aislándolas en esta etapa hipotetizamos que también podíamos obtener información sobre los mecanismos de defensa utilizados por este insecto en esta etapa de la vida.

Los humanos aunque no son depredadores, también interfieren directamente en el ciclo de vida de este insecto al utilizar trampas de luz, y usar controles biológicos de impacto ambiental no controlado como es el caso de utilizar aspersiones aéreas de la variante *kurstaki* de la bacteria *B. turingiensis*.

En este contexto se presentó un proyecto de investigación conjunto IVIC-CIGB aprobado en el marco de la X Comisión Mixta Cuba-Venezuela con el propósito de estudiar los componentes proteicos presentes en el veneno de *H. metabus* y su relación con el lepidopterismo y los mecanismos de defensa utilizados por este insecto. Para este estudio se utilizó la combinación de herramientas de la proteómica, la glicómica y la bioinformática.

El genoma de este organismo es desconocido por lo que se dificulta el proceso de identificación de proteínas en bases de datos de secuencias y para asignar un rol biológico a las proteínas presentes en el veneno es necesario identificar proteínas homólogas. Tampoco existía información del patrón de *N*-glicosilación de este insecto y sus diferencias con los humanos.

Un análisis por SDS-PAGE y espectrometría de masas reveló que un 65 % del contenido proteico del veneno de las setas presentes en el nido de *H. metabus* está formado por un conjunto de cinco serino proteasas del tipo S1A. Una de estas proteínas fue evaluada en un modelo de lepidopterismo y se demostró que la actividad proteolítica es la responsable de causar la erosión de tejidos y vasos sanguíneos y ocasionar hemorragias focales. Probablemente, la presencia de un conjunto de cinco proteasas diferentes puede contribuir a degradar un mayor número de sustratos proteicos. Por otra parte, se demostró que dos de estas proteasas están *N*-glicosiladas y poseen una mezcla de *N*-glicanos del tipo G0F neutros y sulfatados. Los *N*-glicanos neutros del tipo G0F no representan ninguna amenaza para nuestro sistema inmune pues están presentes en las estructuras *N*-enlazadas a las inmunoglobulinas G (IgG). Sin embargo, la sulfatación de *N*-glicanos puede transformar motivos estructurales comunes en estructuras únicas con roles biológicos bien definidos que potencialmente puedan ser reconocidos por un receptor o lectinas. En particular los *N*-glicanos sulfatados al ser inoculados en el modelo animal de lepidopterismo desencadenaron una potente respuesta inflamatoria al estimular la secreción de TNF- α en macrófagos activados. Este aspecto constituye una novedad científica por dos razones: (1) constituyó el primer reporte

de *N*-glicanos sulfatados en insectos y (II) se demostró que estos tienen un rol protagónico en desencadenar una respuesta inflamatoria típica del lepidopterismo. Este último hallazgo permite hipotetizar que posiblemente la sulfatación pudiera ser común a otros insectos que causan efectos adversos en humanos. Por otra parte, cuando *Hylesia metabus* alcanza la madurez sexual es precisamente cuando las setas poseen las maypres propiedades urticantes. Esto nos hace pensar que la maquinaria secretora unida con las setas S3 puede introducir en todas las proteínas que tengan sitios potenciales de *N*-glicosilación, *N*-glicanos sulfatados y puedan exacerbar las reacciones proinflamatorias sin necesidad de que sean proteasas. En las setas también se encontró una proteína de la hemolinfa de aproximadamente 180 KDa conocida como vitelogenina que juega un importante rol en los mecanismos de defensa al tener sitios de reconocimiento de secuencias de patógenos y al tener capacidad lítica puede desestabilizar la estructura de la membrana celular de microorganismos y causar su muerte. En el veneno también encontramos una proteína que tenía homología a quitinasas de otros insectos. La quitinasa es importante en la remodelación del exoesqueleto de insectos pero también es conocido que tienen capacidad de hidrolizar quitina que está presente en los hongos entomopatógenos del hábitat natural como es el caso de *B. bassiana* constituyendo así un posible mecanismo de defensa anti-fúngico.

Aunque experimentos adicionales restan para llegar a conclusiones, la combinación de esta quitinasa y las proteasas presentes en el veneno, pueden causar daños en el exoesqueleto de artrópodos compuesto principalmente de proteínas y quitina. Experimentos conductuales realizados por Rodríguez *et al.* (2) con hormigas demostraron que éstas evitan los huevos de *H. metabus* que están recubiertos de setas en cambio los huevos sin setas se los llevan. También la quitinasa de *H. metabus* puede precondicionar las setas al generar fragmentos de su propia quitina que pueden tener propiedades adjuvantes y potenciar la respuesta ante los antígenos presentes en el veneno al ser inyectados en el organismo afectado (3).

En este estudio se identificó otra proteína de la hemolinfa como es una proteína de 30 kDa a la que se le reporta propiedades de unión a *N*-glicanos que puede estar vinculada a la respuesta anti-fúngica. Se encontró en las setas una proteína conocida como microvitelogenina que aunque no es posible asignarle ningún rol en el mecanismo de defensa por el momento, si existen reportes de toxicidad causada en humanos por proteínas de la hemolinfa de insectos (4).

Después de estos resultados pensamos que *H. metabus* asume el riesgo de depositar todos los huevos en un mismo nido porque ha desarrollado un sistema eficiente que permite recubrirlo con las setas que contienen proteínas que le confieren protección contra patógenos y depredadores garantizando así el éxito reproductivo de la especie.

Nuestro trabajo nos permitió incluir por primera vez tres *N*-glicanos sulfatados de insectos en la glicobase que es una herramienta analítica muy utilizada por la comunidad científica en el campo de la glicobiología para el análisis estructural de *N*-glicanos. Esta inclusión se debe, a la

detallada caracterización realizada. En este caso se empleó la espectrometría MALDI-MS y ESI-MS/MS, análisis de permetilación, análisis estructural empleando la combinación de exoglicosidasas y NP-HPLC, determinación exacta de la masa molecular con errores inferiores a 1 ppm.

En nuestro trabajo se reporta por primera vez cómo la distribución isotópica del ion reportero de m/z 97 típico de los *N*-glicanos sulfatados y fosfatados contiene información que permite diferenciar en presencia de cuál modificación nos encontramos (fosfato o sulfato). Este resultado constituye un aporte metodológico.

Los resultados presentados en esta propuesta a Premio de la ACC en el 2016 están avalados por dos publicaciones en revistas internacionales arbitradas de impacto en el campo de la proteómica y la glicobiología:

1-Structural characterization and biological implications of sulfated *N*-glycans in a serine protease from the neotropical moth *Hylesia metabus* (Cramer [1775]) (Lepidoptera:Saturniidae). Gleysin Cabrera, *et al.* ***Glycobiology***. (2016) 26 (3): 230-250. [doi:10.1093/glycob/cwv096](https://doi.org/10.1093/glycob/cwv096)

2-Protein Content of the *Hylesia metabus* Eggnest Setae (Cramer [1775])(Lepidoptera:Saturniidae) and Its Association With the Parental Investment for the Reproductive Success and Lepidopterism. Gleysin Cabrera, *et al.* ***Journal of Proteomics***. Publicado online Agosto 2016. piiS1874-3919(16)30365-7 [doi:10.1016/j.jprot.2016.08.010](https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.08.010) [Epub ahead of print]

Referencias

- (1) A. E. Paniz-Mondolfi, A. M. Pérez-Alvarez, U. Lundberg, L. Fornéz, O. Reyes-Jaimes, M. Hernández-Pérez, E. Hossler, Cutaneous lepidopterism: Dermatitis from contact with moths of *Hylesia metabus* (Cramer [1775])(Lepidoptera: saturniidae), the causative agent of Caripito itch, *Int. J. Dermatol.* 50 (2011) 535-554.
- (2) F. Osborn, L. Berlioz, J. Vitelli-Flores, W. Monsalve, B. Blas-Dorta, V. Rodríguez- Lemoine, Pathogenic effects of bacteria isolated from larvae of *Hylesia metabus* Crammer (Lepidoptera: Saturniidae), *J. Invert. Path.* 80 (2002) 7–12.
- (3) J. Rodríguez, J. V. Hernández, L. Fornés, U. Lundberg, C. L. Arocha Piñango, F. Osborn, External morphology of abdominal setae from male and female *Hylesia metabus* adults (Lepidoptera:Saturniidae) and their functions, *Fla. Entomol.* 87 (2004) 30-36.

- (4) C. A. Da Silva, C. Chalouni, A. Williams, D. Hartl, C. G. Lee, J. A. Elias Chitin is a size-dependent regulator of macrophage TNF and IL-10 production. *J. Immunol.* 182 (2009) 3573–3582

- (5) E. W. Hossler, Caterpillars and moths: Part II. Dermatologic manifestations of encounters with Lepidoptera, *J. Am. Acad. Dermatol.* 62 (2010) 13-28