

Detección de las enzimas detoxificantes B esterasas en *Culex quinquefasciatus* (Say), *Boophilus microplus* (Canestrini), *Amblyomma cajennense* (Fabricius) y *Blatella germanica* (L) por medio de zimogramas

Mario Alberto Villarino Gutiérrez *,**
Gale Wagner G. **
Waghela Suryakant D. **

Abstract

Crude extracts of specimens of *Culex quinquefasciatus* (Say), *Boophilus microplus* (Canestrini), *Amblyomma cajennense* (Fabricius) and *Blatella germanica* (L) were analyzed for B esterase activity using polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). The crude extract of an organophosphate resistant strain of *B. microplus* larvae showed differences when compared to an organophosphate susceptible strain of *B. microplus* larvae. An intense band was also shown in *Cx. quinquefasciatus* organophosphate resistant strain. One band of different molecular weight was shown for the *A. cajennense* larvae crude extract as well as several bands in *Blatella germanica* adult crude extracts. Bovine serum and bovine red blood cells were used as the controls.

Keywords: B ESTERASES ACTIVITY, *BOOPHILUS MICROPLUS*, *AMBLYOMMA CAJENNENSE*, *CULEX QUINQUEFASCIATUS*, *BLATELLA GERMANICA*, ZYMOGRAMS.

Resumen

Extractos crudos de especímenes de *Culex quinquefasciatus* (Say), *Boophilus microplus* (Canestrini), *Amblyomma cajennense* (Fabricius) y *Blatella germanica* (L) fueron analizados por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida, para detectar actividad de B esterasas. Los extractos crudos de una cepa resistente a organofosforados de *B. microplus* presentaron diferencias en el patrón electroforético cuando fue comparado con una cepa susceptible a organofosforados de larvas de *B. microplus*. El extracto crudo de *Cx. quinquefasciatus* cepa florida presentó una banda de marcada actividad. En la muestra de *A. cajennense* se encontró una banda de diferente peso molecular; y en el extracto crudo de *Blatella germanica* se localizaron dos bandas de diferente peso molecular. Se utilizaron suero y eritrocitos de origen bovino como testigos.

Palabras clave: B ESTERASAS, RESISTENCIA A ORGANOFOFORADOS EN *BOOPHILUS MICROPLUS*, ACTIVIDAD DE B ESTERASAS EN *AMBLYOMMA CAJENNENSE*, ACTIVIDAD DE B ESTERASAS EN *CULEX QUINQUEFASCIATUS*, ACTIVIDAD DE B ESTERASAS EN *BLATELLA GERMANICA*, ZYMOGRAMAS.

Introducción

En los programas actuales de control de infestaciones por artrópodos, gran parte del control reside en la utilización de compuestos químicos. Estos compuestos, en su mayoría, funcionan como agentes intoxicantes.

cantes del sistema nervioso central impidiendo de alguna manera, la transmisión del estímulo nervioso, causando con esto inmovilización en el artrópodo y posteriormente la muerte.¹

El uso continuo de estos compuestos y principal-

Recibido el 2 de agosto de 1999 y aceptado el 7 de abril del 2000.

* Departamento de Parasitología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D.F.

** Departamento de Patobiología, Colegio de Medicina Veterinaria, Texas A&M University, College Station, Texas , 77843-4467, USA.

mente el de agentes organofosforados, ha ocasionado, en diversos géneros de artrópodos, resistencia hacia ellos, reduciendo considerablemente su eficacia durante su uso en programas de control.² Algunos de los mecanismos de resistencia adquiridos por los artrópodos, son: evitar el contacto del agente químico, desarrollar mecanismos bioquímicos que permiten la reducción de la penetración del compuesto a través de la cutícula, incrementar la detoxificación del agente químico e insensibilidad en el sitio activo.¹ Estos mecanismos han sido plenamente estudiados en el caso de mosquitos *Culex*³ y *Blatella*.⁴

El constante interés en el estudio de mecanismos de resistencia hacia acaricidas en garrapatas de importancia económica ha originado intensa investigación al respecto.⁵ La parasitosis del ganado bovino que ocasiona la garrapata *Boophilus microplus* (Acar: Ixodidae) está considerada entre las de mayor importancia, debido al daño directo ocasionado por la pérdida de sangre y a la transmisión de protozoarios parásitos (por ejemplo, *Babesia* spp).⁶ El control de infestaciones por esta garrapata en el ganado bovino se ha basado en el uso de acaricidas, principalmente compuestos organofosforados, los cuales fueron utilizados intensamente en México durante la puesta en marcha de la Campaña Nacional de Erradicación de la Garrapata (1974-1985).⁷ Sin embargo, la erradicación no pudo llevarse a cabo debido a la resistencia hacia este tipo de compuestos.⁸

Experimentos previos comprobaron que el mecanismo de acción de los acaricidas organofosforados se basa en la inhibición de la neuroenzima acetilcolinesterasa,⁹ confirmado posteriormente.¹⁰ El amplio uso de compuestos organofosforados ha conducido a la selección de cepas resistentes de la población original de garrapatas.¹¹

La resistencia hacia este tipo de agentes puede darse debido a alguno de los siguientes mecanismos: a) decremento en la penetración del compuesto a través de la cutícula, b) baja conversión metabólica de tioésteres en sus respectivos análogos oxidados los cuales son los agentes activos, c) presencia de mecanismos de acetilcolinesterasa menos sensible a la inhibición por agentes organofosforados que aquella presente en cepas susceptibles, y d) aumento en la capacidad para detoxificar el agente organofosforado.¹²

Investigaciones realizadas en Australia atribuyen resistencia a organofosforados en cepas nativas, debido a mecanismos de insensibilidad a la inhibición de acetilcolina.¹³ Sin embargo, investigaciones recientes, basadas en análisis de secuencias génicas no han podido descubrir variaciones que puedan sopor-

tar las causas de esta observación.¹⁴ Trabajos realizados en Australia comprobaron la presencia de mecanismos capaces de incrementar la detoxificación de agentes organofosforados.¹⁰

Recientemente se ha descrito la presencia de enzimas detoxificantes en cepas resistentes a organofosforados en larvas de *B. microplus*,¹⁵ identificadas como esterasas. El presente trabajo demuestra diferencias en actividad enzimática entre dos cepas de larvas de *Boophilus microplus* utilizando electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) y B naftilacetato como sustrato. También se analizaron extractos crudos del mosquito *Cx quinquefasciatus*, cucaracha común *B. germanica* y de la garrapata del bovino *A. cajennense* por ser considerados artrópodos de importancia económica.

Material y métodos

Material biológico

Se utilizaron 100 mg de larvas de *B. microplus* congeladas de las cepas México OP (resistente a coumaphos) y González (susceptibles a coumaphos), que fueron transportadas del laboratorio de USDA en Mission, Texas, al Colegio de Medicina Veterinaria, Universidad de Texas A&M en College Station Texas. Las larvas fueron pesadas, congeladas con nitrógeno líquido y maceradas en presencia de solución amortiguadora de fosfatos 0.15M pH 8.0 (SBF) con 1% triton x-100.* Se determinó la concentración de proteínas por la técnica de Bradford,¹⁶ usando albúmina bovina sérica como referencia.

De forma similar, se procesaron 100 mg de hembras *Cx. quinquefasciatus* no alimentadas de la cepa florida (600 veces resistente a malathion) y 100 mg de larvas de *A. cajennense*; de la cepa "la copita" sometidas de manera natural a piretroides; asimismo, se recolectó una hembra adulta *Blatella germanica* silvestre, que fue identificada, desinfectada y procesada de manera similar a las muestras anteriores. Se procesó sangre completa de un bovino clínicamente sano, para obtener plasma y paquete celular. La concentración de proteínas se determinó por la técnica de Bradford usando albúmina sérica bovina como referencia.

Electroforesis en gel de poliacrilamida

La electroforesis en gel de poliacrilamida se realizó por el método previamente descrito por Laemli¹⁷ usando un gel de gradiente 10%-20% de 8 x 10 cm a 150 voltios (0.040 mA) en una cámara para electroforesis Mini Protean II ** por 45 minutos con 20:g de proteínas por muestra aplicados en cada ranura. Se incluyeron 10 mL de marcador de amplio peso molecular como referencia. Una vez electroforado, el gel fue renaturalizado con 100 mL de s SBF pH 7.2 con 1% triton x-100 por 120

* Sigma, USA.

** Hoefer Laboratories, USA.

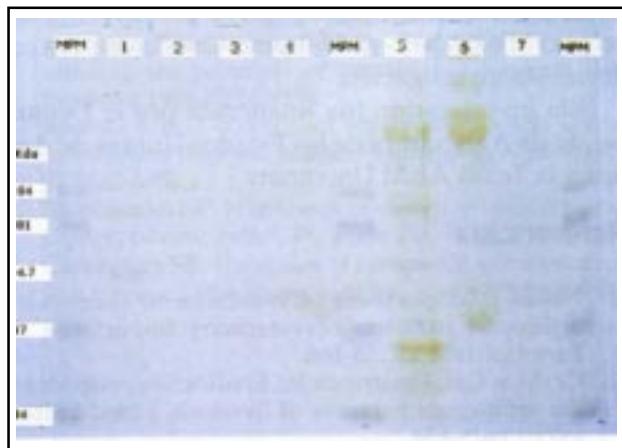


Figura 1. Actividad enzimática de B esterasas en gel de poliacrilamida. De izquierda a derecha: Marcador de peso molecular (MPM), *B. microplus* México OP (1), *B. microplus* OP susceptible (2), *Cx quinquefasciatus* OP resistente (3), *A. cajennense* (4), marcador de peso molecular (MPM), *Blatella germanica*, (5), suero bovino (6), paquete celular bovino (7), marcador de peso molecular (MPM) (foto tomada a 2x aumentos).

minutos con cambios de solución cada 30 minutos. Una vez renaturalizado, el gel fue incubado por 2.5 horas en 100 mL de SBF pH 7.2 con 10 mM B naphtilacetato* disuelto en 100:1 de acetona y 5 mM *fast garnet** como agente indicador.¹⁸ Una vez obtenida la reacción, el gel fue fotografiado (Figura 1) y la imagen procesada en el programa NIH Image para Macintosh** obteniendo perfiles densitométricos correspondientes (Figura 2).

Resultados

La actividad enzimática se observa como bandas de color rojo intenso debido a la hidrólisis de B naphtilacetato que produce naphtol, el cual provoca la precipitación del agente indicador *fast garnet*. Una banda rojo intenso de 64.7 kilodaltones (Kd) se encuentra en la cepa México OP, la cual está ausente en la cepa González. Una banda rojo intenso de 64.7 Kd se halla en *Cx. quinquefasciatus*. La muestra correspondiente a *A. cajennense* presenta una banda de actividad correspondientes a 63.5 Kd, mientras que la muestra correspondiente a *Blatella* presenta dos bandas, una de 70 y otra de 64.3 Kd, respectivamente. Las muestras de suero y glóbulos rojos bovinos no presentan bandas de color rojo intenso (Figura 1). En los análisis digitalizados por computadora, el incremento de color provoca un incremento en la intensi-

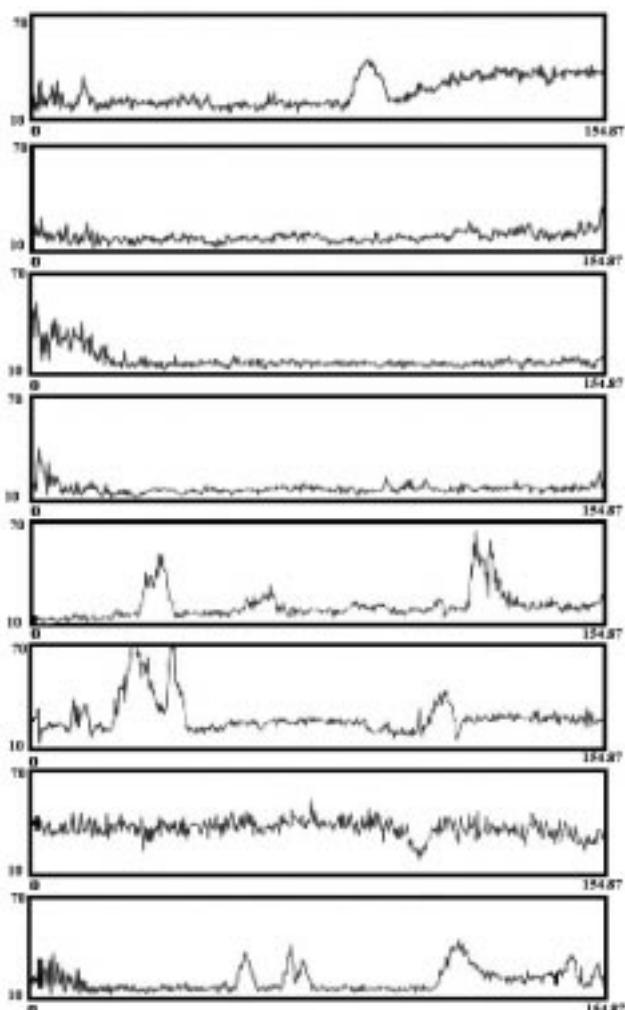


Figura 2. Perfiles densitométricos realizados con NIH para Macintosh correspondientes a la Figura 1: De arriba hacia abajo; extracto crudo de larvas *B. microplus* México OP, extracto crudo de larvas de *B. microplus* OP susceptible, extracto crudo de hembras no alimentadas de *Cx. quinquefasciatus* OP resistente, extracto crudo de larvas de *A. cajennense*, extracto crudo de *Blatella germanica*, suero bovino, paquete celular bovino, marcadores de peso molecular (distancia en milímetros, intensidad en pixeles).

dad de los pixeles, los cuales son registrados en forma de gráfica. La variación en la magnitud de la gráfica es directamente proporcional al incremento colorimétrico de la imagen procesada. Las diferencias en intensidad de las diferentes muestras, apreciadas en el gel, fueron registradas por el programa de computadora mediante una gráfica lineal en función milímetros/pixeles. Las diferencias encontradas en el gel están registradas en la gráfica correspondiente. La gráfica correspondiente a *B. microplus* coumaphos resistente muestra un incremento de gran magnitud (cerca de 40 pixeles/mm) ausente en la correspondiente al de la cepa coumaphos susceptible. Diversos incrementos en las gráficas correspondientes a las

* Sigma, USA.

** 1.63 Macintosh.

muestras de *Cx. quinquefasciatus*, *B. germanica*, *A. cajennense*, plasma y sangre reflejan a su vez las diferencias encontradas en el gel.

Discusión

La mayoría de los agentes químicos utilizados como tóxicos, destinados al control de artrópodos son derivados alkídlicos de complejos estéricos susceptibles a ser hidrolizados por esterasas.¹ Diversos autores describen la presencia de esterasas como mecanismo alterno potencialmente capaz de inducir resistencia.¹⁹ Las esterasas detectadas en este trabajo fueron clasificadas como B esterasas debido a su capacidad para hidrolizar B naphtilacetato.²⁰ Una mayor actividad está presente en la cepa coumaphos resistente de *B. microplus*, que no se encuentra en la cepa coumaphos susceptible. Las esterasas encontradas deben ser consideradas como posibles mecanismos capaces de degradar compuestos organofosforados cuya importancia en la presentación de resistencia debe ser cuidadosamente evaluada. Esta diferencia, de ser significativa, pudiera ser utilizada como indicador de resistencia a compuestos organofosforados en posibles pruebas futuras. Experimentos anteriores basados en detección de esterasas como agentes indicadores de resistencia en larvas de garrapatas han sido previamente descritos,²¹ pero en esa técnica se mencionan esterasas con afinidad por diferentes sustratos y no se concreta a ninguna en especial. Los resultados correspondientes a *Cx. quinquefasciatus* coinciden con los mencionados en la literatura, en donde se identifica al mecanismo de detoxificación basado en esterasas como el principal mecanismo de resistencia hacia organofosforados en esta especie. Los resultados correspondientes a *B. germanica* indican actividad de esterasas, las cuales han sido relacionadas previamente con resistencia a insecticidas.⁴ Este es el primer informe de actividad de B esterasas en *A. cajennense*, probablemente debido a la previa exposición a piretroides. Sin embargo, y debido a la ausencia de pruebas de resistencia que determinen el nivel de resistencia de *A. cajennense* procedente de la cepa "la copita", se recomienda mayor investigación al respecto.

Agradecimientos

Agradecemos la colaboración de los doctores Ron Davey, de la USDA Tick Research Unit, Mission Texas, J.K. Olson, y P.D. Teel, del Departamento de Entomología, de la Texas A&M University; asimismo, a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, de la UNAM, por el apoyo proporcionado al becario MVZ Mario A. Villarino Gutiérrez para conducir esta investigación.

Esta investigación fue financiada por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de América y la Texas A&M University.

Referencias

1. Nolan J. Mechanisms of resistance to chemicals in arthropod parasites of veterinary importance. *Vet Parasitol* 1985;18:155-166.
2. Graham OH, Hourigan JL. Eradication programs for the arthropods parasites of livestock. *J Med Entomol* 1977;13:629-658.
3. Hemingway J, Karunaratne SH. Mosquito carboxylesterases: a review of the molecular and biochemistry of a major insecticide resistance mechanism. *Med Vet Entomol* 1998;12:1-12.
4. Phabhakaran SK, Kamble ST. Purification and characterization of an esterase isozyme from insecticide resistant and susceptible strains of German cockroach, *Blattella germanica* (L.) *Insect Biochem Molecular Biol* 1995;25:519-524.
5. Devonshire AL. Role of esterases in resistance of insects to insecticides. *Biochem Soci Transactions* 1991; 19:775-779.
6. Nuñez JL, Muñoz ME, Moltedo HL. *Boophilus microplus* the common cattle tick. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 1985.
7. Trapaga BJ. Desarrollo de la campaña contra la garrapata en México. *Memorias del Seminario Internacional de Parasitología Animal*, 1986 septiembre 8-10; Cuernavaca (Morelos), México: Aguirre EJ, Cavazzani CA, García VZ, Nájera FR, Vega MC. Editores:1986.
8. Aguirre EJ, Sobrino AL, Santamaría E, Roman M, Hernández M, Ortiz A, Ortiz N. Resistencia de las garrapatas en México. *Memorias del Seminario Internacional de Parasitología Animal*, 1986 septiembre 8-10; Cuernavaca (Morelos), México: Aguirre EJ, Cavazzani CA, García VZ, Nájera FR, Vega MC. Editores:1986.
9. Casida JE. Esterase inhibitors as pesticide. *Science* 1964; 146:1011-1017.
10. Roulston WJ, Schuntner CA, Schnitzerling HJ. Detoxification as a mechanism of resistance in a strain of cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini) resistant to organophosphorous and carbamate compounds. *Austr Biol Sci* 1968;22:1585-1589.
11. Harrison IR, Palmer BH, Wilmshurst EC. Chemical control of cattle tick-resistance problems. *Pest Sci* 1973;4:531-542.
12. Fukoto TR. The chemistry and mode of action of organic phosphorous insecticides. *Adv Pest Control Res* 1957;1:147-192.
13. Lee RM, Batham P. The activity of organophosphate inhibition of cholinesterase in susceptible and resistant ticks (Acari). *Entomol Appl* 1966;9:13-24.
14. Baxter GD, Barker SC. Acetylcholinesterase cDNA of the cattle tick, *Boophilus microplus*: characterization and role in organophosphate resistance. *Insect Biochem Mol Biol* 1998;28:581-589.
15. Rosario-Cruz R, Miranda-Miranda E, García-Vázquez Z, Ortiz -Estrada M. Detection of esterase activity in susceptible and resistant strains of the cattle tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) *Bull of Entomol Res* 1997;87:187-202.
16. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-254.

17. Laemli UK. Cleavage of structural protein during assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* 1970; 227:680-685.
18. Manchenko GP. Handbook of detection of enzymes on electrophoretic gels. CRC press Fla, EUA, 1994.
19. Chounhury SR. The nature of nonspecific esterases: a subunit concept. *J Histochem and Cytochem* 1972;20:507-512.
20. Raymond M, Pasteur N, Georghiou GP, Mellon RB, Wirth MC, Hawley M. Detoxification esterases new to California in organophosphate resistance *Culex quinquefasciatus* (Diptera; Culicidae). *J Med Entomol* 1987;24:24-27.
21. Miranda-Miranda E, Cossio-Bayugar R, Tellez-Alanis M, García-Vázquez Z, Rosario Cruz R, Ortiz-Estrada M. An enzymatic marker for ixodicide resistance detection in the cattle tick *Boophilus microplus*. *Adv Agric Res* 1995;4(3):000-008.