

DETECCIÓN INMUNOQUÍMICA DE ESTERASAS EN DOS CEPAS DE LA GARRAPATA *Boophilus microplus* (Acarii: Ixodidae) RESISTENTES A IXODICIDAS^a

Rodrigo Rosario-Cruz^b
Zeferino García-Vázquez^b
John George Edward^c

RESUMEN

Rosario-Cruz R, García-Vázquez Z, Edward JG. *Téc Pecu Méx* 2000;38(3)203-210. Se encontró una esterasa en *Boophilus microplus* con actividad incrementada, en dos cepas de garrapatas resistentes a acaricidas de la familia de los piretroides y organofosforados, que fue detectada después de ser separadas electroforéticamente. La proteína fue separada y utilizada en la preparación de un anticuerpo policlonal mono-específico. La especificidad de este anticuerpo fue probada mediante un ensayo de inmunoelectrotransferencia, en extractos totales de dos cepas de garrapatas resistentes, una a coumafos y otra a flumetrina, y una cepa susceptible a ambos compuestos. Las cepas de garrapatas resistentes mostraron una actividad de esterasa incrementada en relación con la cepa susceptible. El ensayo de isoelectroenfoque mostró diferencias en la expresión de varias isoformas con actividad de esterasa, que fueron detectadas en forma de escalera dentro del rango 4.5 a 5.0 de punto isoelectrónico. Los resultados sugieren que existen diferencias en la actividad enzimática que no son detectadas inmunológicamente, ya que en el ensayo de inmunoelectrotransferencia, no se encuentran diferencias entre los extractos. La presencia de isoformas con diferentes características fisicoquímicas, será de gran interés en el diagnóstico de la resistencia, ya que pueden ser utilizadas como blancos moleculares para el diagnóstico de resistencia a ixodidas.

PALABRAS CLAVE: Esterasas, Isoenzimas, Detección esterases, Resistencia acaricidas.

La resistencia a insecticidas es en general uno de los mayores obstáculos en el control de especies de insectos de importancia agrícola, médica y veterinaria. La Organización Mundial de la Salud ha denominado al fenómeno de resistencia a insecticidas como, "el pequeño gran obstáculo en la lucha contra los insectos vectores de enfermedades"⁽¹⁾. La garrapata *Boophilus*

microplus es uno de los más importantes vectores de enfermedades, entre las que se encuentran la babesiosis y la anaplasmosis en bovinos, produciendo importantes pérdidas en la industria ganadera. En México y en otros países de América Latina, la resistencia a acaricidas se ha convertido en un problema creciente. La resistencia de *Boophilus microplus* a organofosforados (OP's) tales como coumafos, clorfenvinfos, clorpirifos y recientemente a piretroides, se ha detectado en áreas en las cuales estos compuestos ya no son efectivos⁽²⁾.

Asociado al creciente problema de la resistencia a ixodidas, hay otro factor

^a Recibido el 22 de septiembre de 2000 y aceptado para su publicación el 3 de noviembre de 2000.

^b CENID-Parasitología Veterinaria. INIFAP-SAGAR Km. 11.5 carretera federal Cuernavaca-Cuautla 62550 Jiutepec, Morelos. rodrigor@pavet.inifap.conacyt.mx Correspondencia y solicitud de separatas.

^c USDA, ARS, Knippling Bushland US Livestock Insect Research Lab.

limitante, el diagnóstico de esta resistencia, ya que la única prueba aceptada es la del paquete de larvas (PPL)⁽³⁾, la cual es impráctica no sólo por la cantidad de muestras que pueden analizarse por unidad de tiempo, sino por el tiempo mismo que toma el realizarla, por lo cual, es necesario desarrollar un nuevo método diagnóstico basado en la detección de blancos moleculares.

Las esterasas son un grupo de enzimas fuertemente asociadas con el fenómeno de resistencia en *Boophilus microplus*⁽⁴⁾. Este grupo de enzimas ha sido reconocido como uno de los sistemas más importantes en el metabolismo de compuestos xenobióticos, y su mecanismo está asociado con la producción masiva de enzimas hidrolíticas y de secuestro en varias especies de insectos^(5,6).

La sobreexpresión de esterasas hidrolíticas y de secuestro ha sido descrita en mosquitos y áfidos resistentes a OP's^(5,6), así como la presencia de mutaciones de punto dentro del sitio activo de la acetilcolinesterasa ha sido descrita en la mosca de la fruta^(7,8). Por ejemplo, en *Myzus persicae*, se ha encontrado una sobreproducción de las esterasas E4 y FE4 capaces de degradar insecticidas. En estas dos enzimas la sobreproducción es promovida no sólo por amplificación del gene, sino por control transcripcional; aún cuando la determinación del número de copias del gene ha sido difícil, el mecanismo de control transcripcional está asociado con cambios en la metilación del DNA⁽⁹⁾, aunque se ha demostrado que el mecanismo de detoxificación mediado por esterasas es por hidrólisis del compuesto⁽⁵⁾

y por secuestro cuando el centro catalítico es carbamilado o fosforilado^(10,11).

El propósito del presente trabajo fue demostrar si el incremento en la actividad de esterasas encontrado en los extractos de *Boophilus microplus* analizados en geles de poliacrilamida con dodecil-sulfato de sodio (SDS-PAGE) se debe a un incremento en la cantidad de la enzima (mediante el uso de un anticuerpo policlonal) o es debido a la presencia de una o más esterasas (mediante la técnica de isoelectroenfoque).

Se obtuvieron tres cepas de garrapatas de colonias mantenidas en el Centro Nacional de Constatación en Salud Animal (CENAPA). La cepa resistente a OP's fue obtenida de la cepa mexicana Tuxpan, colectada en Tuxpan, Veracruz, la cual ha sido mantenida en el laboratorio desde 1982. La cepa resistente a piretroides, denominada Mora, se colectó en el municipio de Emiliano Zapata, Tabasco, México, y se ha mantenido desde 1993. Asimismo, se utilizó una cepa susceptible a ambos ixodicidas colectada en Coahuayutla, Guerrero.

El perfil toxicológico de cada una de las cepas de garrapatas *B. microplus* fue determinado por la prueba de PPL⁽³⁾, usando el ixodicida organofosforado coumafos y el compuesto piretroide flumetrina. Para determinar las dosis letales al 50% y los índices de resistencia, se utilizó el análisis Probit.

Para el análisis bioquímico se homogeneizaron 100 mg de larvas de 10 días de edad de cada una de las cepas, en morteros congelados a -70°C , en 2 ml de solución

DETECCIÓN INMUNOQUÍMICA DE ESTERASAS DE *Boophilus microplus*

amortiguadora de fosfatos pH 7.2. Los extractos fueron centrifugados a 100 xg durante 5 min y el sobrenadante colectado se fraccionó en alícuotas de 100 µl y se almacenaron hasta su uso a -70°C. Las proteínas totales se cuantificaron mediante el método de Lowry en cada uno de los extractos⁽¹²⁾, los cuales se analizaron electroforéticamente por SDS-PAGE⁽¹³⁾ bajo condiciones no reductoras, con una concentración de acrilamida para el gel concentrador de 4% y para el gel separador, del 10%. Se cargaron 50 µg de proteína de cada uno de los extractos en cada carril del gel, utilizando el sistema de minigeles (Hoeffer Mighty Small SE 250). Las proteínas del gel fueron teñidas con una solución de azul brillante de Coomassie R-250 al 0.1% en una solución conteniendo metanol al 20% y ácido acético al 10%.

Después de la separación por SDS-PAGE, los extractos proteicos fueron renaturalizados mediante la incubación de los geles en SAF pH 7.2, conteniendo tritón X-100 al 5% con tres cambios de 30 min cada uno^(14,15). La detección de la actividad enzimática se llevó a cabo incubando el gel en una solución de alfa-naftilacetato al 0.04% y 0.8 mg/ml de Fast Garnet GBC en SAF, como indicador para la detección de la actividad de esterasas, modificada de Dary *et al*⁽¹⁶⁾, hasta que las bandas con actividad se tiñeron de rojo.

Para el ensayo de inmunoelectrotransferencia (IET) se

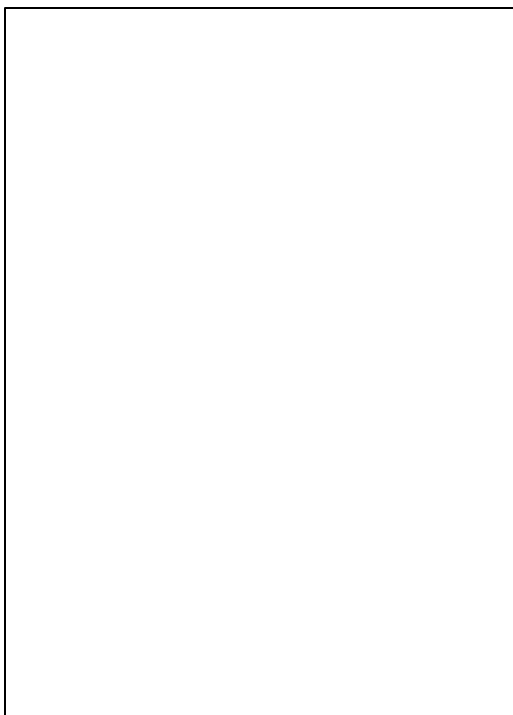
preparó un anticuerpo policlonal monoespecífico, inoculando 50 µg de proteína de la banda de 67 kilodaltones (KDa), separada por SDS-PAGE, en la cual se detectó la actividad de esterasa, en un conejo de la raza Nueva Zelanda, por vía subcutánea,. El inóculo se emulsificó con adyuvante completo de Freund. Se aplicaron tres dosis de refuerzo en intervalos de ocho días cada uno con la misma cantidad de proteína. La especificidad del anticuerpo se probó por IET⁽¹⁷⁾. Después de la separación electroforética, el gel se transfirió a una membrana de difluoruro de polivinilo, sobre la cual se hizo la detección de la proteína de interés, mediante el uso del anticuerpo producido en contra de la proteína con actividad de esterasa de 67 KDa y un segundo anticuerpo anti IgG de conejo marcado con fosfatasa alcalina. La reacción colorida se llevó a cabo utilizando 5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil fosfato y azul

Figura 1. Electroforesis de extractos proteicos de tres cepas de *Boophilus microplus*



Se encontraron diferencias en la banda de 67 kilodaltones (flecha) en la cual se localizó la actividad de esterasas (gel B). Cepas: susceptible (SS), Tuxpan (TX) y Mora (MO).

Figura 2. Perfil electroforético (A) e inmuno-electrotransferencia (B) del extracto protéico crudo de larvas de la cepa Tuxpan de *Boophilus microplus* de 10 días



Se utilizó un anticuerpo policlonal monoespecífico contra la banda de 67 kilodaltones la cual exhibe actividad de esterasa.

de tetrazolio como sustrato e indicador respectivamente.

La separación de las isoenzimas se llevó a cabo mediante la técnica de isoelectro-énfoque (IEE), utilizando un gel de poliacrilamida al 10% y una concentración de anfolinas al 2%, con un rango de pH de 3.5 a 10. Las soluciones de corrimiento fueron ácido acético (0.02 N) como anolito e hidróxido de sodio (0.02 N) como catolito. Se aplicaron 50 µg de proteína de cada uno de los extractos en cada carril.

El IEE se llevó a cabo en un equipo Mighty Small SE-250 de Hoefer. El gel fue precorrído durante una hora a 200 voltios y las muestras fueron isoelectroenfocadas por tres horas a 500 voltios a temperatura ambiente. Los geles fueron teñidos para la detección de la actividad de esterasas.

La resistencia a coumafos para la cepa Tuxpan y a flumetrina para la cepa Mora, fue confirmada por la prueba de PPL, obteniéndose un índice de resistencia para coumafos de 3.4, mientras que para la cepa Mora no se pudo determinar, ya que no se registró mortalidad en una concentración de flumetrina 20 veces mayor que la dosis recomendada.

En el análisis de SDS-PAGE se detectó una esterasa con un peso molecular aproximado de 67 KDa, que fue renaturalizable con el tratamiento con Tritón X-100. La actividad enzimática de esta proteína fue mayor en las dos cepas resistentes, con un incremento relativo mayor para la cepa Mora que para la cepa Tuxpan, mientras que en la cepa susceptible la actividad no fue detectable visualmente, aun cuando la cantidad de proteína cargada en cada carril de cada uno de los extractos fue homogénea (Figura 1).

El anticuerpo policlonal mostró una reacción altamente específica con la cepa resistente cuando se probó por IET (Figura 2); sin embargo el mismo anticuerpo no detectó ninguna diferencia cuando se utilizó en el ensayo de IET para analizar comparativamente las dos cepas de garrapatas resistentes y la cepa susceptible (Figura 3).

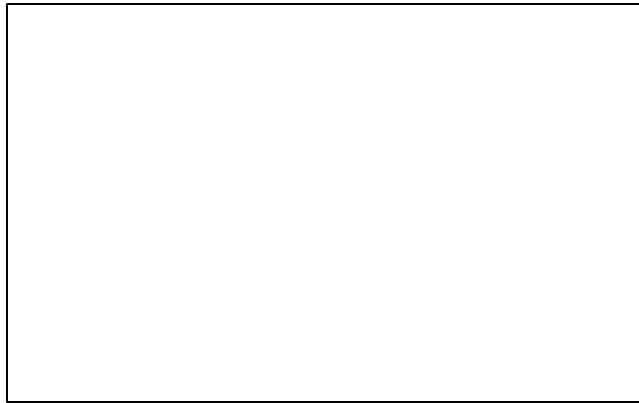
Por el contrario, el ensayo de isoelectro-énfoque mostró varias bandas dispuestas

en forma de escalera en las cepas resistentes, en un rango de punto isoeléctrico de 4.5 a 5.0 con actividad de esterases utilizando un rango de anfolinas de 3.5 a 10, por lo que las bandas se concentraron en una fracción bastante estrecha del gel en el cual se llevó a cabo el isoelectroenfoque (Figura 4).

La actividad incrementada de enzimas oxidativas e hidrolíticas ha sido asociada con resistencia a OP's y carbamatos^(18,19). Por ejemplo, en cepas de cucarachas resistentes y susceptibles a compuestos OP's, el análisis electroforético reveló diez isoenzimas diferentes en su composición y actividad^(20,21,22). Todas estas isoenzimas hidrolizaron el sustrato alfa naftilacetato a diferentes velocidades y se encontró que la producción incrementada de la esterasa E6 es responsable de la resistencia a OP's en este modelo⁽²²⁾.

En el caso de la garrapata *Boophilus microplus*, el estudio electroforético en los geles de SDS-PAGE también muestra una actividad incrementada de esterases, tanto en la cepa de garrapatas *B. microplus* resistentes a coumafós, como en la cepa resistente a flumetrina, en relación con la cepa susceptible. Sin embargo la detección inmunológica mediante la técnica de inmunoelectrotransferencia utilizando el anticuerpo policlonal no reveló diferencias entre las cepas, lo cual sugiere que la cantidad de proteína detectable contenida en la banda de 67 KDa en las tres cepas, es equivalente. De estos resultados se

Figura 3. Niveles de detección del ensayo de inmunoelectrotransferencia utilizando un anticuerpo policlonal (A) y el ensayo directo para la detección de la actividad enzimática utilizando alfa naftilacetato (B)

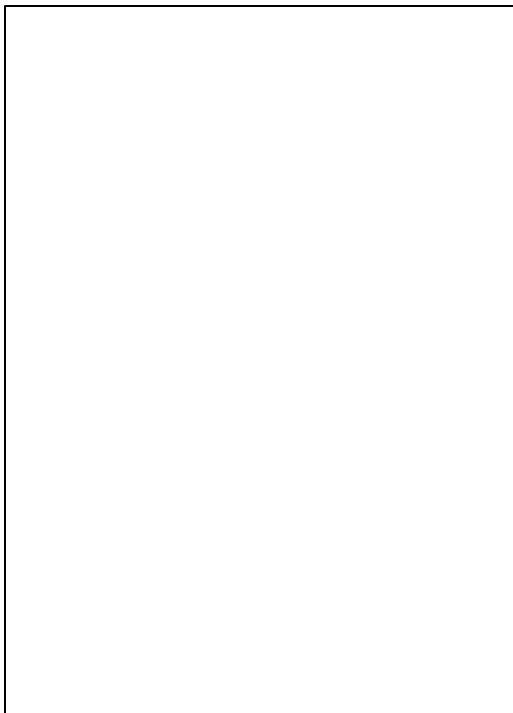


Cepas: susceptible (SS), Tuxpan (TX), Mora (MO).

infiere que por alguna razón, la misma cantidad de enzima, presenta diferencias catalíticas que se reflejan en la afinidad de la enzima por el sustrato, ya que aparentemente, no hay diferencias detectables en la cantidad de la proteína reconocida por el anticuerpo.

El principal mecanismo de resistencia de *B. microplus* mencionado en relación con la resistencia a ixodicidas OP's está asociado con la presencia de una acetilcolinesterasa insensible a los compuestos OP's⁽²³⁾. Sin embargo no existen evidencias de cambios estructurales que le confieran a esta enzima la característica de insensibilidad a los ixodicidas. Se han encontrado diferencias en la tasa de hidrólisis metabólica de coumafós entre cepas de garrapatas resistentes y susceptibles⁽²⁴⁾, lo cual sugiere que la presencia de actividad incrementada de esterases y la capacidad de detoxificación

Figura 4. Isoelectroenfoque en gel de poliacrilamida teñido para la detección de la actividad de esterasas



Se utilizó alfa naftilacetato en las tres cepas de *Boophilus microplus* y una concentración de anfolinas del 2.0% con un rango de pH de 3.5 a 10. MO= cepa Mora, TX= cepa Tuxpan y SS= cepa susceptible.

metabólica incrementada, están de alguna manera asociadas, ya que ambas características se encuentran en las cepas de garrapatas resistentes a compuestos OP's. Los resultados obtenidos confirman que la presencia de esterasas y la resistencia a ixodicidas se encuentran asociadas, ya que el análisis por isoelectroenfoque también muestra la presencia de varias isoenzimas con actividad de esterasa, lo cual refuerza el argumento sustentado por los hechos encontrados en el presente trabajo, sobre la detección de diferencias en la actividad

de esterasa, pero similitud en la cantidad de proteínas detectadas por el anticuerpo.

Resulta de especial interés el hecho de que recientemente se ha descrito en el insecto *Nilaparvata lugens*, un sistema de sobreproducción de esterasas asociadas con la resistencia a insecticidas, las cuales aparecen en forma de escalera en los geles de isoelectroenfoque, en un rango de punto isoelectroenfoque (pI) de 4.7 a 5.0 y con un rango de peso molecular entre 66 y 68 KDa⁽²⁵⁾, lo cual coincide con las características de las isoenzimas detectadas en el modelo de *B. microplus* arriba descritas, las cuales se encuentran en un rango de pI de 4.5 a 5.0 y un peso molecular en los geles de SDS-PAGE de 67 KDa aproximadamente. Estos datos podrían desde el punto de vista evolutivo, darnos un indicio de que esta familia de enzimas ha sido seleccionada como una característica evolutiva de adaptación a procesos de detoxificación, y que por lo tanto podría estar siendo regulada mediante los mismos mecanismos en diferentes especies de artrópodos.

La presencia de varias isoenzimas podría explicar esas diferencias encontradas entre las cepas resistentes y susceptibles en cuanto a la actividad enzimática en *B. microplus*, sin embargo, es necesario diseñar estrategias más precisas para corroborar la homogeneidad en la cantidad de proteínas detectadas por el anticuerpo policlonal, probablemente mediante la utilización de anticuerpos monoclonales. La implementación de ensayos prácticos por el momento podría sustentarse en la detección de la actividad general de esterasas mediante métodos directos, ya

que aparentemente la presencia de las enzimas de este grupo representan un marcador molecular confiable y su detección es relativamente fácil y rápida.

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto fue parcialmente financiado por el convenio de colaboración entre el INIFAP y ARS FG-MX 109 (MX-ARS10) y el CONACYT (3441P-B). Agradecemos al Dr. Salvador Neri Orantes a Minerva Santa María, Noe Soberanes, Alejandrina Ortiz y a todo el personal del Departamento de Pruebas Biológicas del Centro Nacional de Constatación en Salud Animal por la amable donación del material biológico utilizado en el presente estudio.

IMMUNOCHEMICAL DETECTION OF ESTERASES FROM THE CATTLE TICK *Boophilus microplus*

ABSTRACT

Rosario-Cruz R, García-Vázquez Z, Edward JG. *Téc Pecu Méx* 2000;38(3):203-210. An esterase from *Boophilus microplus* tick strain resistant to organophosphates was detected after SDS-PAGE. The protein showing activity was separated and used as an antigen to produce a polyclonal antibody. The polyclonal antibody was tested in a western blot for specific binding and three different *Boophilus microplus* tick strains were electrophoretically analyzed. The active protein showed differences in activity favoring the resistant tick strains but did not show any difference in a Western-Blot analysis when the same amount of protein was electrophoretically separated. The isoelectrofocussing however, showed differences in expression of esterase isozymes within a range of isoelectric point from 4.5 to 5.0. The evidences

suggest that differences in activity are due to the participation of isoforms which are not immunologically differentiated, since, the Western blot did not show any difference between strains. The presence of isozymes with different physicochemical features, will be of great interest in the diagnosis of resistance to ixodicides, since they can be used as molecular markers for acaricide resistance detection.

KEY WORDS: Esterases, Resistance, Acaricide resistance, Esterase detection.

LITERATURA CITADA

1. World Health Organization. 22nd Report by the Expert Committee on insecticides 1976:77.
2. Ortiz EM, Santamaria VM, Ortiz NA, Soberanes CN, Osorio MJ, Franco BR, Martínez IF, Quezada DR, Frago SH. Characterization of *Boophilus microplus* resistance to ixodicides in Mexico. III Seminario internacional de parasitología animal. Acapulco, Gro. Mexico. 1995:58-61.
3. Stone BF, Haydock KP. A method for measuring the acaricide susceptibility of the cattle tick *Boophilus microplus* (Can.). *Bull Entomol Res* 1962;(53):563-578.
4. Rosario CR, Miranda ME, Garcia VZ, Ortiz EM. Detection of esterase activity in susceptible and resistant *Boophilus microplus* tick strains. *Bull Entomol Res* 1997;(87):197-202.
5. Devonshire AL. The properties of a carboxylesterase from the peach-potatoe aphid *Myzus persicae* (Sulz.), and its role in conferring insecticide resistance. *Biochem J* 1977;(167):675-683.
6. Mouches C, Magnin M, Berge JB, De Silvestri M, Beyssat V, Pasteur N, Georghiou GP. Overproduction of detoxifying esterases in organophosphate-resistant *Culex* mosquitoes and their presence in other insects. *Proc Natn Acad Sci. USA.* 1987;(84):2113-2116.
7. Fournier D, Bride M, Hoffmann F, Karch F. Acetylcholinesterase: two types of modifications confer resistance to insecticide. *J Biol Chem* 1992;(15):14270-14274.
8. Mutero A, Pralavorio M, Bride J, Fournier D. Resistance-associated point mutation in insecticide-insensitive acetylcholinesterase. *Proc Natn Acad Sci. USA.* 1994;(91):5922-5926.
9. Field LM, Blackman RL, Tyler-Smith C, Devonshire AL. Relationship between amount of

- esterase activity and gene copy number in insecticide-resistant *Myzus persicae* (Sulzer). *Biochem J* 1999;(339):737-742.
10. Devonshire AL, Moores GD. A carboxylesterase with a broad substrate specificity causes organophosphorous, carbamate and pyrethroid resistance in peach potato aphids (*Myzus persicae*). *Pestic Biochem Physiol* 1982;(18):235-246.
 11. Cuany A, Handani J, Berge J, Fournier D, Raymond M, Georghiou GP, Pasteur N. Action of esterase B1 on chlorpyrifos in organophosphate resistant *Culex* mosquitoes. *Pestic Biochem Physiol* 1993;(45):1-6.
 12. Lowry OH, Rosenbroug NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;(193):265-275.
 13. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;(227):680-685.
 14. Lacks SA, Springhorn SS, Rosenthal AL. Effect of the composition of sodium dodecyl sulphate preparations on the renaturation of enzymes after polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem* 1979;(100):357-363.
 15. Lacks SA, Springhorn SS. Renaturation of enzymes after polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulphate. *J Biol Chem* 1980;(265):7467-7473.
 16. Dary O, Georghiou GP, Parson E, Pasteur N. Microplate adaptation of Gomori's assay for quantitative determination of general esterase activity in single insects. *J Econom Entomol* 1990;(83):2187-2192.
 17. Towbin TS, Gordon T. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedures and some applications. *Proc Natn Acad Sci. USA*. 1979;(76):4350-4354.
 18. Siegfried BD, Scott JG. Mechanisms responsible for propoxur resistance in the German cockroach. *Pestic Sci* 1991;(33):133-146.
 19. Scott JF, Lee STS. Purification and characterization of a cytochrome p-450 from insecticide susceptible and resistant strains of house fly, *Musca domestica* L., before and after phenobarbital exposure. *Arch Insect Biochem Physiol* 1993;(24):1-19.
 20. Prabhakaran SK, Kamble ST. Activity and electrophoretic characterization of insecticide resistant and susceptible strains of German cockroach. *J Econ Entomol* 1993;(86):1009-1013.
 21. Prabhakaran SK, Kamble ST. Subcellular distribution and characterization of esterase isozymes from insecticide resistant and susceptible strains of German cockroach (Dyctioptera: Blatellidae). *J Econ Entomol* 1994;(87):541-545.
 22. Prabhakaran SK, Kamble ST. Purification and characterization of an esterase isozyme from insecticide resistant and susceptible strains of German cockroach, *Blatella germanica* (L.). *Insect Biochem Mol Biol* 1995;(25):519-524.
 23. Wright FC, Ahrens EH. Cholinesterase insensitivity: a mechanism of resistance in Mexican Strains of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) against coumaphos. *J Med Entomol* 1988;(25):234-239.
 24. Bull DL, Ahrens EH. Metabolism of coumaphos in susceptible and multiresistant strains of *Boophilus microplus* (Acarii: ixodidae). *J Med Entomol* 1988;(25):94-98.
 25. Small GJ, Hemingway J. Differential glycosylation produces heterogeneity in elevated esterases associated with insecticide resistance in the brown planthopper *Nilaparvata lugens* Stal. *Insect Biochem Mol Biol* 2000;30(6):443-53.