

## GLUTATIÓN S TRANSFERASA COMO MARCADOR DE RESISTENCIA A LOS ACARICIDAS EN LA GARRAPATA DEL GANADO *Rhipicephalus microplus* (ACARI: IXODIDAE)

Estefan Miranda-Miranda✉, Hugo Aguilar-Díaz, César Alejandro Arreguín-Pérez, Bernardo Sachman-Ruíz, Manuel Fernández-Rubalcaba y Raquel Cossio-Bayugar

Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria. INIFAP. Boulevard Cuauhnahuac 8534 Col. Progreso, Jiutepec, Morelos México C. P. 62550.

✉ Autor de correspondencia: [miranda.estefhan@inifap.gob.mx](mailto:miranda.estefhan@inifap.gob.mx)

**RESUMEN.** Como un procedimiento alternativo al diagnóstico de la resistencia de *Rhipicephalus microplus* a los acaricidas, este trabajo hace la evaluación de un ensayo de zimogramas de la enzima glutatión S transferasa (GST) a partir de extractos obtenidos de diferentes estadios de desarrollo de la garrapata del ganado. Para este ensayo, se determinaron las movilidades electroforéticas relativas (Rf), los pesos moleculares en Daltons (PM) y las actividades enzimáticas específicas (AEE). Nuestros resultados en extractos de huevos no mostraron actividad enzimática, mientras que los extractos de larvas y adultos, mostraron que la presencia de dos isozimas con actividad GST con Rf de 0.43 y 0.62, que corresponde a un peso molecular de 45 y 22 kDa respectivamente. Por otra parte, en extractos obtenidos a partir de hemolinfa de adultos, se observó la presencia de una isozima con una Rf de 0.89 que corresponde a un peso molecular de 16 kDa. Así mismo, se identificaron AEE de 5.7  $\mu\text{Mol}/\text{min}$  en extractos de larvas y 12.6  $\mu\text{Mol}/\text{min}$  en la hemolinfa. Con estos resultados se demuestra que los zimogramas constituyen un método rápido, eficaz y económico, utilizado en la evaluación de la resistencia de garrapatas silvestres, alternativo al bioensayo que actualmente se utiliza, cuyo uso representa mayor costo y complejidad.

**Palabras clave:** Zimogramas, GST, xenobióticos, ectoparásito, bovinos.

### Glutathion S transferase as acaricide resistance marker in the cattle tick *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) (Canestrini, 1887)

**ABSTRACT.** A zymogram assay for Glutathion S Transferase (GST) was assessed, as an alternative diagnostics procedure for acaricide resistance detection in the cattle tick *Rhipicephalus microplus* using tick extracts from different developmental stages. GST is involved in the metabolic neutralization of toxins in a broad range of arthropods and associated with pesticide resistance in different agricultural and livestock plagues. GST zymograms were obtained and digital images and densitometric measurements were determined as well as molecular weight in kiloDaltons (kDa), relative electrophoretic motility (Rf) and Enzymatic specific activity (AEE). GST activity was identified at Rf 0.43 and 0.62 corresponding with a mass of 45 and 22 kDa respectively in larvae and adult extracts as well as a isozyme of 0.89 Rf and 16 kDa in adult hemolymph. A 5.7 and 12.6  $\mu\text{Mol}/\text{min}$  AEE was determined for larvae extracts and adult hemolymph respectively. Is our conclusion that the proposed zymogram assay can be used for acaricide resistance detection of enzymatic markers on different developmental stages of the cattle tick *R. microplus*.

**Keywords:** Zymograms, GST, acaricide resistance, xenobiotics, ectoparasite, bovine.

## INTRODUCCIÓN

La identificación de enzimas por electroforesis y/o zimogramas, implica la localización visual de las enzimas, a partir de su actividad enzimática específica sobre un sustrato cromogénico, posterior a su separación por migración electroforética (Miranda-Miranda *et al.*, 2006). Esta metodología permite la separación de los componentes proteicos mediante carga y/o masa molecular de manera tal, que es posible identificar una población heterogénea de enzimas en una gran variedad de muestras biológicas (Hunter y Market 1957; Gregory y Fridovich 1974). En 1959

Markert y Moller, introdujeron el concepto de isozima para designar diferentes isoformas moleculares de la misma enzima en muestras de un mismo individuo o para demostrar polimorfismos entre miembros de la misma especie, sentando las bases de procedimientos que en las últimas décadas se utilizan para una gran variedad de propósitos diagnósticos (Hodes y Retz 1981). Actualmente las técnicas zimográficas, son valiosas para determinar las diferencias genéticas en organismos de una misma especie que difieren en comportamiento y/o propiedades fenotípicas (Manchenko, 1994). Esto permite identificar las sutiles variaciones que hacen a los artrópodos resistentes a los tratamientos químicos algo urgente de aplicar en plagas agropecuarias, capaces de tolerar las formulaciones de pesticidas comerciales. Actualmente, la garrapata del ganado *Rhipicephalus microplus*, es uno de los organismos parásitos-vectores que actualmente presenta mayor resistencia a las formulaciones comerciales de acaricidas (Cossio-Bayúgar *et al.*, 2015). Esto ha dificultado su control y en consecuencia, el de las enfermedades que transmite al ganado bovino (Cossío-Bayúgar *et al.*, 2012). Debido al creciente problema de la resistencia de la garrapata, ha sido necesario diseñar complicados bioensayos que requieren meses de desarrollo e incontables horas/hombre de labor para identificar los niveles de resistencia a los diferentes químicos, ya que implican el cultivo de garrapatas aisladas de las explotaciones pecuarias y campo y cepas de referencia de garrapatas, tanto susceptibles, como resistentes a los diferentes productos (Stone, 1972). Algunas alternativas de evaluación de la resistencia de los aislados obtenidos en campo, lo constituyen los zimogramas, que han demostrado ser muy útiles y eficaces en la masificación de la detección de resistencia a los pesticidas en otros artrópodos, y actualmente se aplican en la identificación de cepas resistentes del mosquito hematófago *Culex pipiens*, y del áfido parásito de plantas *Myzus persicae*. (Karunaratne y Heminway, 2001; Field y Foster, 2002). Estos ensayos se basan principalmente en el análisis de enzimas metabolizantes de xenobióticos (EMX) ya que se ha demostrado que estas enzimas participan activamente en la resistencia de los artrópodos a los pesticidas (Cossío-Bayúgar *et al.*, 2008). El complejo EMX, incluye enzimas como citocromo P-450, las monoxigenasas dependientes de flavina, alcohol y aldehído deshidrogenasas, la glutación S transferasas y las carboxilesterasas (Miranda *et al.*, 2005), enzimas encargadas de la protección de los artrópodos a la acción tóxica de los xenobióticos naturales y que ahora constituyen su primera defensa contra los pesticidas (Miranda-Miranda *et al.*, 2006, 2009). Por lo anterior, es necesario identificar estas enzimas en extractos de garrapatas, con el fin de diseñar nuevos procedimientos diagnósticos que permitan evaluar los niveles de resistencia y su papel en otras rutas metabólicas que puedan ser blanco de nuevos compuestos acaricidas. Este trabajo tiene como objetivo, analizar la actividad de la EMX-GST, en muestras obtenidas de diferentes estadios de desarrollo de *R. microplus*, mediante un análisis basado en zimogramas.

## MATERIALES Y MÉTODO

**Cepas de garrapatas.** Se utilizaron garrapatas acaricida-susceptibles de *R. microplus*, cultivadas en el Cenid-Pavet del INIFAP ubicado en Jiutepec, Morelos, México. Se obtuvieron muestras de huevos, larvas y adultos acorde a los procedimientos descritos previamente (Cossío-Bayúgar *et al.*, 2005).

**Extractos.** Se procesaron larvas y huevos pesados en lotes de 100 mg y macerados en 1 ml de solución salina amortiguadora de fosfatos pH 7.2 (SSAF), acorde a procedimiento descrito previamente (Miranda-Miranda *et al.*, 2006). El extracto fue centrifugado a 14,000 x g durante 5 minutos y el contenido proteico fue determinado a partir del sobrenadante obtenido acorde al método descrito por Bradford (1976). Los extractos se almacenaron en alícuotas de 50 µl a -20°C. La hemolinfa de las garrapatas adultas es la única muestra libre de sangre de bovino que se puede obtener de esta fase de desarrollo mediante punción cuticular y colectada en solución 1:10 de buffer

de muestra para SDS-PAGE, acorde a lo publicado previamente (Miranda-Miranda *et al.*, 2006).

**Zimogramas en SDS-PAGE.** Se utilizó el método descrito por Laemmli (1970) en geles de 100 x 82 x 1.5 mm con 15 pozos de muestras con 75 µg de extracto de proteína por pozo. La separación electroforética se realizó a 15 mA durante 90 min. Los geles obtenidos se sumergieron en una solución agua-Tritón X-100 al 2.5 % en agitación constante, durante 15 minutos. Al término de la incubación, se realizaron dos lavados en una solución SSAF-Tritón X-100 0.2 %. La detección de GST se llevó a cabo mediante una reacción enzimática por la adición de sustrato GST hasta la aparición de bandas acorde al procedimiento previamente publicado (Manchenco, 1995; Cossío-Bayúgar *et al.*, 2003). Los zimogramas obtenidos, fueron documentados digitalmente en un procesador de imágenes Epichem (UVP LifeSciences), usando el software LabWorks 4.0 (UVP LifeSciences). Para la obtención de la densidad óptica de cada banda producto de la reacción enzimática, se llevó a cabo una calibración del programa a partir de la actividad enzimática específica, como se describió previamente (Miranda-Miranda *et al.*, 2006). Los zimogramas se complementaron con la determinación de la movilidad electroforética relativa (Rf) y la determinación del peso molecular (PM), a partir de Marcadores de peso Molecular comerciales preteñidos Page ruler con un rango de 11 a 170 kDa (Fermentas LifeSciences [www.fermentas.com](http://www.fermentas.com)).

## RESULTADOS

Los zimogramas no mostraron actividad en los extractos de huevos, pero aquellos obtenidos de los extractos de larvas y hemolinfa de garrapatas adultas, mostraron actividad específica para GST al usar el sustrato enzimático correspondiente. Así mismo, fue posible observar variaciones en la actividad específica de GST para cada estadio de desarrollo tanto a nivel de densidad óptica (DO), como en las movilidades electroforéticas. Cuando se comparó la actividad de la GST entre larvas y adultos, se identificó la actividad de GST en posición Rf 0.43, y 0.62 en ambas, correspondiendo con un PM de 45 y 22 kDa respectivamente (Fig. 1).

Las muestras obtenidas de hemolinfa de adultos mostraron, además de las anteriores, una isozima con una Rf de 0.89 que corresponde a un peso molecular de 16 kDa. Se identificó una AEE de 5.7 µMol/min en extractos de larvas y 12.6 µMol/min en hemolinfa de adultos. Los resultados de los SDS-PAGE y sus respectivos zimogramas, se muestran en la figura 1. Los datos de cada banda encontrada como el Rf, el peso molecular y el número de bandas obtenido para cada cepa, así como todos los análisis densitométricos obtenidos se resumen en el cuadro 1.

## DISCUSIÓN

Los zimogramas que actualmente se hacen para identificar marcadores enzimáticos de resistencia a los acaricidas en la garrapata del ganado *R. microplus*, se basan principalmente en la identificación de la enzima metabolizante de xenobióticos carboxil esterasa (CE) en extractos de larvas (Miranda-Miranda *et al.*, 2009) se usan solo extractos de larvas debido a que las garrapatas adultas son constituidas en un 90 % de su peso por sangre del hospedero material muy rico en toda clase de enzimas del complejo EMX del bovino y es muy difícil obtener una muestra de la garrapata adulta libre de enzimas contaminantes. Nuestro estudio describe por primera vez un procedimiento para hacer zimogramas de la enzima metabolizante de xenobióticos GST en muestras de hemolinfa de adultos material rico en hemocitos de la garrapata, algo importante ya que por primera vez se pueden obtener muestras de las garrapatas de campo de manera directa para ser analizadas en un zimograma de inmediato, a diferencia del procedimiento actualmente usado que requiere llevar los adultos al laboratorio para hacerlas ovipositar y esperar meses a que las larvas eclosionen para posteriormente hacer extractos de estas larvas que finalmente serán analizadas por zimogramas. Nuestro estudio por primera vez reporta un procedimiento de zimogramas de GST en garrapata

que junto con los zimogramas de CE actualmente en uso, incrementan la posibilidad de hacer un diagnóstico de resistencia a los acaricidas en *R. microplus* de manera más confiable. Nuestro estudio también reporta por primera vez el número de isozimas de GST presentes en diferentes fases de desarrollo de la garrapata del ganado que puede servir de referencia futura para el personal científico interesado en el tema.

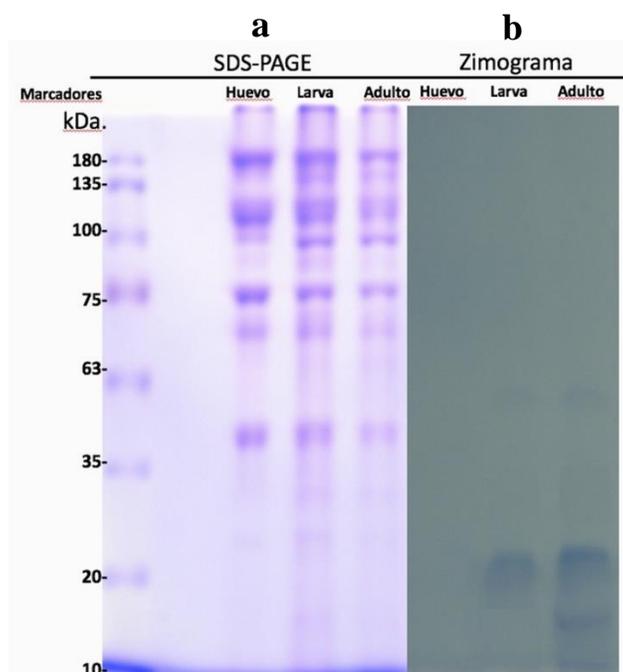


Figura 1. a) Electroforesis en SDS-PAGE de proteínas obtenidas de diferentes estadios de garrapatas (huevo, larva y adulto) teñidas con azul de Coomassie; b) Zimogramas con actividad de GST, obtenidos de proteínas de las muestras antes mencionadas (SDS-PAGE). La figura muestra tres bandas de isozimas con Rf's de 0.43, 0.62 y 0.89 y pesos moleculares en extractos proteicos de larva y adulto.

Cuadro 1. Relación de Isozimas de GST encontradas en extractos de diferentes estadios de desarrollo. Los valores obtenidos por densitometría se convirtieron a su correspondiente valor como actividad enzimática específica en  $\mu\text{Mol}/\text{min}$ . Las masas y movilidades electroforéticas de cada isozima encontrada, se representan en el cuadro.

	No. de Bandas	Rf.	D.O.	Masa kDa.	Actividad específica $\mu\text{Mol}/\text{min}$
Huevos	0	---	---	---	0.0
Larvas	2	0.43	0.1	45	2.5
		0.62	0.13	22	3.2
Adultos	3	0.45	0.1	45	1.9
		0.62	0.29	22	3.5
		0.89	0.20	16	7.2

## CONCLUSIONES

Nuestro estudio demuestra que las garrapatas repletas aisladas de campo, pueden aportar material diagnóstico por punción de la cutícula, procedimiento que simplifica la toma de muestra

en campo y disminuye considerablemente el tiempo del análisis. El procedimiento aquí descrito, constituye una herramienta útil en el diagnóstico de la resistencia a los acaricidas de la garrapata del ganado, es sencillo y eficaz y combina los valores obtenidos conjuntamente de zimogramas y sus respectivos densitogramas basados en la expresión y actividad enzimática de la GST. Así mismo, nuestro análisis arroja resultados cuantitativos que nos permiten realizar comparaciones más precisas de las actividades enzimáticas que existen entre las diferentes cepas de garrapatas, tanto susceptibles y como las que presentan resistencia. Finalmente, esta metodología nos permite la obtención de resultados cuantitativos en tiempos más cortos (días), reduciendo así los costos requeridos para el diagnóstico. Razón por la cual, dicho ensayo resulta una alternativa y/o complemento, en el estudio e identificación de las poblaciones de garrapatas susceptibles a los diferentes acaricidas.

### Literatura citada

- Bradford, M. A. 1976. Rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248–254.
- Cossío-Bayúgar, R., Castro-Saines, E., García-Vázquez, Z. and E. Miranda-Miranda. 2003. Gutathione peroxidase enzyme detection from susceptible and acaricide resistant *Boophilus microplus* ticks on SDS polyacrylamide Gels. In: V International Seminar of Animal Parasitology. (Mérida, Yucatán, México), 144–147.
- Cossío-Bayugar, R., Miranda-Miranda, M., Fernández-Rubalcaba, M., Narváez-Padilla, V. and Reynaud, E. 2015. Adrenergic ligands that block oviposition in the cattle tick *Rhipicephalus microplus* affect ovary contraction. *Scientific Report*, 5: 15109.
- Cossío-Bayúgar, R., Miranda, E., and J. P. Holman. 2005. Molecular cloning of a phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase gene from the tick, *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35: 1378–1387.
- Cossío-Bayúgar, R., Miranda-Miranda, E., Narváez-Padilla, V., Olvera-Valencia, F. and E. Reynaud. 2012. Perturbation of tyraminerpic/octopaminergic function inhibits oviposition in the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Journal of Insect Physiology*, 58(5): 628–33.
- Cossío-Bayúgar, R., Miranda-Miranda, E., Ortiz-Nájera, A., Neri-Orantes, S. and F. Olvera-Valencia. 2008. Cytochrome P-450 monooxygenase gene expression supports a multifactorial origin for acaricide resistance in *Rhipicephalus microplus*. *Research Journal of Parasitology*, 3(2): 59–66.
- Field, L. M. and S. P. Foster. 2002. Amplified esterase genes and their relationship with other insecticide resistance mechanisms in English field populations of the aphid, *Myzus persicae* (Sulzer). *Pest Management Science*, 58(9): 889–94.
- Gregory, E. M. and I. Fridovich. 1974. Visualization of catalase on acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 58: 57–62.
- Hodes, M. E. and J. E. Retz. 1981. A positive zymogram for distinguishing among Rnase and phosphodiesterase's I and II. *Analytical Biochemistry*, 110: 150–152.
- Huntern, R. L. and C. L. Market. 1957. Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. *Science*, 125(3265): 1294–1295.
- Karunaratne, S. H. and J. Hemingway. 2001. Malathion resistance and prevalence of the Malathion carboxylesterase mechanism in populations of mosquito vectors of disease in Sri Lanka. *Bulletin of the World Health Organization*, 9(11): 1060–1064
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680–685.
- Manchenko, G. P. 1994. *Handbook of detection of enzymes on electrophoretic gels*. Boca Raton Florida EUA; CRC Press, 568 p.
- Market, C. L. and F. Moller. 1959. Multiple form of enzymes: tissue ontogenetic, and species specific patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 45: 753–763.

- Miranda-Miranda, E., Liébano-Hernandez, E., López-Arellano, M. E., Mendoza-de-Gives, P. y R. Cossío-Bayúgar. 2006. Marcadores enzimáticos como indicadores de resistencia a los antihelmínticos en el nematodo parásito gastroentérico de ruminantes *Haemonchus contortus*. *Bioquimia*, 31(1): 6–12.
- Miranda-Miranda, E., Cossío-Bayúgar, R., Quezada-Delgado, M. D. R., Olvera, F. and S. Neri-Orantes. 2009. Age-induced carboxylesterase expression in acaricide-resistant *Rhipicephalus microplus*. *Research Journal of Parasitology*, 4(3): 70–78.
- Stone, B. F. 1972. The genetics of resistance by ticks to acaricides. *Australian Veterinary Journal*, 48: 345–537.