

Efectos del E-64 sobre parámetros reproductivos de *Boophilus microplus*

✉ Aymé Fernández-Calienes¹, Judith Mendiola¹, Jorge Fraga¹, Andrés Camejo², Israel García¹, Rafael de la Vega²

¹Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"
Autopista Novia del Mediodía Km 6 1/2 No. 251, AP 601, Marianao 13, Ciudad de La Habana, Cuba
Fax: (53 7) 2046051; E-mail: ayme@ipk.sld.cu

²Laboratorios Biológicos y Farmacéuticos, Boyeros, Ciudad de La Habana, Cuba

RESUMEN

En este trabajo se ensayó la inyección de E-64, inhibidor específico de cisteína peptidasas, en hembras vitelógenas de la garrapata *Boophilus microplus*, con el objetivo de determinar su efecto sobre el desarrollo ovárico y la oviposición. En los grupos inyectados con el inhibidor, se obtuvo una reducción significativa de la eficiencia de la puesta de los huevos, del peso del ovario, del contenido de vitelina en el ovario y de las actividades cisteína peptidasas semejantes a la cathepsina L y a la cathepsina B. Los resultados demostraron la importancia de las cisteína peptidasas en los eventos reproductivos de *B. microplus*.

Palabras clave: *Boophilus microplus*, E-64, cisteína peptidasas, ovario, vitelina, huevos, reproducción

Biotechnologia Aplicada 2005;22:207-210

ABSTRACT

Effects of E-64 on reproductive parameters of *Boophilus microplus*. In this work we assayed the injection of E-64, an specific cysteine peptidases inhibitor, in vitellogenic females of the tick *Boophilus microplus*, with the aim to determine the effect caused on the ovaric development and oviposition. A significant reduction of the lay eggs efficiency, the ovary weight, the ovary vitellin content and the cysteine peptidase cathepsin L and cathepsin B-like activities was obtained in the inhibitor injected group. These results show the relevance of cysteine peptidases in the reproductive events of *B. microplus*.

Key words: *Boophilus microplus*, E-64, cysteine peptidases, ovary, vitellin, eggs, reproduction

Introducción

Las garrapatas son ectoparásitos obligados de los vertebrados terrestres. *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) (Canestrini, 1887) es un ectoparásito de los animales bovinos, de considerable importancia veterinaria y ampliamente distribuido en las regiones tropicales y subtropicales. La proteína recombinante Bm 86 se utilizó para producir la primera vacuna comercial contra *B. microplus*, y los resultados han demostrado la posibilidad de controlar poblaciones de garrapatas por la vía inmunológica. Sin embargo, la vacunación con Bm 86 no suprime el uso de acaricidas para lograr un control eficiente de esta garrapata [1] y, por otra parte, no existe similitud de secuencia aminoacídica entre este antígeno y alguna proteína de función conocida, lo que pudiera dificultar la búsqueda de antígenos eficaces en otras especies [2].

Las cisteína peptidasas están involucradas en importantes funciones en organismos parásitos, entre ellas se incluyen la adquisición de nutrientes, la invasión de células del hospedero, la evasión inmune, la patogénesis y la virulencia. Algunas de estas enzimas se han considerado blancos potenciales hacia los cuales debe dirigirse la quimioterapia antiparasitaria, teniendo en cuenta los potentes efectos ejercidos por inhibidores de esta clase de peptidasas sobre los parásitos [3-5].

Estudios en nuestro laboratorio demostraron la presencia de cisteína peptidasas en el intestino, la hemolinfa, el ovario y los huevos de *B. microplus* [6-9].

La inyección directa en garrapatas ixodidas, tanto de compuestos antiparasitarios como de anticuerpos monoclonales antiagentes de estas especies, se ha

ensayado en hembras repletas con el propósito de evaluar su efecto sobre la formación de los huevos [10, 11].

Teniendo en cuenta, fundamentalmente, la relación previamente reportada entre la ovogénesis y la presencia de cisteína peptidasas en el ovario de *B. microplus* [9], se decidió evaluar el efecto de la inyección de un inhibidor específico de esta clase de peptidasas, el E-64, sobre el desarrollo ovárico y la oviposición en garrapatas hembras repletas (*B. microplus*).

Materiales y métodos

Reactivos

De Sigma Chemical Co., EE.UU. se obtuvieron el inhibidor trans-epoxisuccinil-L-leucilamida-(4-guanidino)-butano (E-64), el dimetilsulfóxido (DMSO), los sustratos N-carbobenzoxi-fenilalanil-arginil-4-metoxi-β-naftilamida (Z-Phe-Arg-2NA) y N-carbobenzoxi-arginil-arginil-4-metoxi-β-naftilamida (Z-Arg-Arg-2NA), así como los reactivos para desarrollar la actividad enzimática.

Garrapatas

La cepa de *B. microplus* (libre de *Babesia*, sp.) se mantuvo por pases sucesivos sobre ganado Holstein en los Laboratorios Biológicos y Farmacéuticos (LABIOFAM). Las hembras repletas se colectaron manualmente.

Inyección de E-64 en hembras de *Boophilus microplus*

Treinta garrapatas adultas repletas se procesaron antes de las 24 horas posteriores al desprendimiento

1. Labarta V, Rodríguez M, Penichet M, Leonart R, Luaces L, De la Fuente J. Simulation of control strategies for the cattle tick *Boophilus microplus* employing vaccination with a recombinant Bm 86 antigen preparation. *Vet Parasitol* 1996; 63:131-60.

2. Willadsen P. Novel vaccines for ectoparasites. *Vet Parasitol* 1997;71:209-22.

3. Wasilewski MM, Lim KC, Phillips J, McKerrrow JH. Cysteine proteinase inhibitors block Schistosoma hemoglobin degradation *in vitro* and decrease worm burden and egg production *in vivo*. *Mol Biochem Parasitol* 1996;81:179-89.

4. Semenov A, Olson JE, Rosenthal PJ. Antimalarial synergy of cysteine and aspartic protease inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;2254-58.

5. Sajid M, McKerrrow JH. Cysteine proteases of parasitic organisms. *Mol Biochem Parasitol* 2002;120:1-21.

6. Mendiola J, Alonso M, Marquetti MC, Finlay CM. *Boophilus microplus*: multiple proteolytic activities in the midgut. *Exp Parasitol* 1996;82:27-33.

7. Fernández-Calienes A, Mendiola J, Hernández H. Actividad cisteína proteínica en hemolinfa de hembras repletas de *Boophilus microplus* durante el periodo de pre-oviposición-oviposición. *Rev Cub Med Trop* 1999;51(3):20-3.

8. Fernández-Calienes A, Mendiola J, Hernández H, de la Vega R. Cisteína y serino proteinasas en huevos de *Boophilus microplus*. *Acarol* 2003;XLIII:229-38.

del ganado bovino. El inhibidor E-64 se disolvió en DMSO y se diluyó luego en solución salina fisiológica hasta una concentración de 200 μ M. Una solución de DMSO de igual proporción (1%) en solución salina fisiológica se utilizó como control del solvente. Después de pesadas individualmente, se inyectaron las garrapatas con 1.5 μ L de cada solución con una microjeringuilla SGE, Australia, según el método de Toro-Ortiz *et al.* (1997).

Efecto de la inyección del inhibidor E-64 sobre la eficiencia de la oviposición de *B. microplus*

Para determinar el efecto del inhibidor E-64 sobre la puesta de huevos de *B. microplus*, las hembras se dividieron en 3 grupos: control sin inyectar (n=5), inyectadas con DMSO (n=5) y con inhibidor (n=5). Después de inyectadas, se colocaron en recipientes individuales y se incubaron a 30 °C y 90% de HR durante dos semanas. Se pesó la puesta total de huevos de cada una, y para realizar la comparación entre los tratamientos, se calculó la eficiencia de la puesta (EP=peso huevos/peso garrapata).

Efecto de la inyección del inhibidor E-64 sobre el desarrollo ovárico

Para determinar el efecto de la inyección del E-64 sobre el peso del ovario, el contenido de vitelina y las actividades cisteíno peptidasas del ovario se utilizaron 15 garrapatas, se dividieron en 3 grupos, como en el experimento anterior. Las garrapatas se incubaron a 30 °C y 90% de humedad relativa hasta la disección de los ovarios, 48 horas después de la inyección del inhibidor (día 2 de preoviposición). Se pesaron individualmente los ovarios y se midió el tamaño de tres de sus ovocitos mayores con un micrómetro ocular.

La medición del contenido de vitelina se realizó mediante el cálculo de la diferencia entre la absorbancia, a 400 nm (cerca al máximo de absorción del grupo hemo de la vitelina) y a 500 nm (longitud de onda para la cual no hay absorción de luz por parte del grupo hemo), de un extracto preparado a partir de la homogeneización manual de cada ovario y se expresó en unidades de absorbancia [10].

La actividad enzimática de los extractos frente a Z-Phe-Arg-2NA y Z-Arg-Arg-2NA se determinó con el empleo de una mezcla de reacción formada por 50 μ L de extracto crudo, 150 μ L de tampón (100 mmol/L de ácido cítrico, 200 mmol/L de fosfato disódico, pH 4.0 y 6.5) y 5 μ L de sustrato (0.5 mmol/L en el ensayo). A cada ensayo se le incorporó L-cisteína 5 mmol/L para mayor sensibilidad. Esta mezcla se incubó a 37 °C ajustando las condiciones temporales para garantizar el trabajo con velocidades iniciales. La 2-naftilamina liberada por la acción de la enzima se determinó por un método indirecto: la reacción se detiene por la adición de 200 μ L de reactivo de acoplamiento, el cual contiene Fast Garnet GBC, que al acoplarse con la 2-naftilamina liberada forma un azocompuesto rojo. La cantidad de producto se midió a 520 nm en un espectrofotómetro Ultraspec III, Pharmacia, Suecia. Se realizó una curva empleando 2-naftilamina como patrón, cuya cotangente fue de 1.48×10^{-2} μ mol. Una unidad (U) de actividad enzimática representa la producción de 1 nmol de 2-naftilamina/min/mL de enzima en el ensayo [12].

Análisis estadístico

Los resultados se estudiaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) de clasificación simple, y posteriormente, en caso de que fueran significativas las diferencias ($p < 0.05$), se empleó la prueba de mínimos cuadrados para comparar entre sí las medias de cada experimento. Los resultados se expresaron como valor medio de cada grupo $\pm$ la desviación estándar.

Los experimentos descritos en este trabajo, para determinar los efectos del E-64 sobre la Eficiencia de la Puesta y sobre el desarrollo ovárico, se realizaron dos veces. Se muestran los resultados de uno de ellos por haberse encontrado las mismas diferencias estadísticamente significativas entre los grupos al repetir los experimentos.

Resultados

Para determinar el efecto de un inhibidor de cisteíno peptidasas sobre los parámetros que representan la reproducción de *B. microplus*, se inyectó E-64 en garrapatas hembras adultas repletas (teleoginas), estadio en que se inicia la vitelogénesis o síntesis de las principales proteínas de la yema de los huevos.

Cada experimento se realizó con el empleo de controles, sin inyectar e inyectados con el solvente del E-64, DMSO, sin mostrar diferencias significativas entre estos grupos en ningún caso.

La eficiencia de la puesta de huevos se afectó significativamente ($p < 0.05$) al inyectar el E-64 (Figura 1), reflejado por una disminución en la relación de la masa de huevos puestos por las garrapatas tratadas, con respecto a su peso corporal de 0.5316 ± 0.1082 en el grupo inyectado con DMSO a 0.3016 ± 0.075 en el grupo inyectado con el inhibidor para una reducción del 43.3%.

En el grupo inyectado con E-64 disminuyó significativamente ($p < 0.05$) el peso del ovario, de 0.0227 ± 0.00416 g en el grupo inyectado con el solvente a 0.00835 ± 0.00335 g en el grupo inyectado con el inhibidor (Figura 2) para una reducción del 63.25%. La medición de los ovocitos mayores no mostró diferencias significativas entre los grupos (Tabla 1), lo que sugiere que la disminución en el desarrollo ovárico y en la puesta de los huevos se debe a la maduración

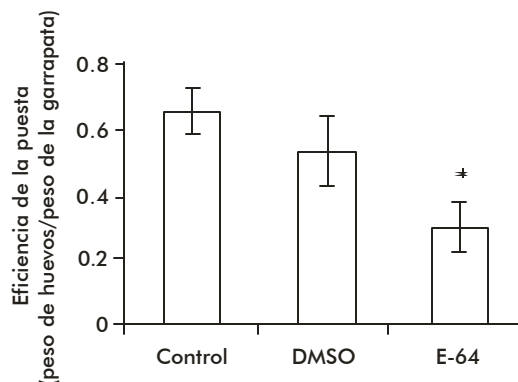


Figura 1. Efecto de la inyección de E-64 en teleoginas de *B. microplus* sobre la eficiencia de la puesta de los huevos (n=5 para cada grupo). (*) Indica una diferencia estadísticamente significativa comparada con el grupo control (prueba de mínimos cuadrados, $p < 0.05$).

9. Fernández-Calienes A, Mendiola J, Hernández H, Finlay CM, Valdés M. Cisteíno peptidasas en el ovario de *Boophilus microplus*. *Acarol* 2003; XLIII:239-47.

10. Lunke MD, Kaufmann WR. Effects of the avermectin analogue MK-243 on vitellogenesis and reproduction in the ixodid tick, *Amblyomma hebraeum*. *Exp Appl Acarol* 1992;13:249-59.

11. Toro-Ortiz RD, Da Silva I, Gonzales JC, Masuda A. Monoclonal antibodies against *Boophilus microplus* and their effects on reproductive efficiency. *Vet Parasitol* 1997;69:297-306.

12. Barrett AJ. A new assay for cathepsin B1 and other thiol proteinases. *Anal Biochem* 1972;47:280-93.

de menor cantidad de ovocitos en este período, como consecuencia de la presencia del inhibidor.

El contenido de vitelina en este órgano, expresado como la absorbancia del grupo hemo, se redujo también significativamente, de 1.551 ± 0.395 U a 0.587 ± 0.336 U (62.2% de reducción) (Figura 3), lo cual indica un efecto de este compuesto sobre la vitelogenénesis o el proceso de incorporación de vitelogenina en el ovocito.

Se observó, además, una reducción estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en las actividades cisteíno peptidasas detectadas en el ovario (Figura 4) en el grupo de garrapatas inyectadas con el inhibidor. La actividad hidrolítica del sustrato Z-Phe-Arg-2NA disminuyó de 0.9153 ± 0.0412 U en el grupo inyectado con el DMSO a 0.7643 ± 0.0379 U, es decir, una

reducción de 16.5%; mientras, la hidrólisis del sustrato Z-Arg-Arg-2NA se redujo de 0.07843 ± 0.01845 U a 0.0415 ± 0.02172 U (47.1% de reducción).

Discusión

En la garrapata *B. microplus* se detectaron actividades semejantes a las de catepsinas L y B, según su especificidad de sustrato, en el ovario de las adultas hasta el final de la oviposición [9], en la hemolinfa de las hembras en el pico de oviposición [7] y en los huevos de esta especie, donde desempeñan una función importante en la degradación de las proteínas de la yema durante la embriogénesis [8]. La inhibición total *in vitro* de la actividad de estas enzimas en presencia de E-64, permitió su clasificación como cisteíno peptidasas.

La reducción significativa en la eficiencia de la puesta de huevos obtenida en este estudio como consecuencia de la inyección de E-64, sin afectar la eclosión y la maduración de las larvas (datos no mostrados), sugiere una disminución en la cantidad de huevos puestos y no en su peso individual.

El ovario es el órgano en el que tiene lugar la formación de los huevos de *B. microplus*. En las garrapatas ixódidas, la maduración de los ovocitos ocurre de manera asincrónica: simultáneamente, en el ovario se encuentran ovocitos con diferentes grados de desarrollo [13]. La disminución en el peso del ovario en las garrapatas inyectadas con E-64, pudiera ser la causa de la disminución de la eficiencia de la puesta de los huevos. Que no existan diferencias en el tamaño de sus ovocitos mayores, sugiere la ocurrencia de maduración completa en estos y refuerza la hipótesis de una disminución en la cantidad de huevos puestos y no en el peso individual.

La habilidad de producir grandes cantidades de vitelogenina en un tiempo relativamente corto, parece ser la estrategia evolutiva principal para el éxito reproductivo en *Ixodidae*. La síntesis de estas hemolipoglicoproteínas tiene lugar en el cuerpo graso y en el intestino. Tanto en las garrapatas ixódidas como en argásidos se secretan a la hemolinfa, donde se transportan hasta ser endocitadas por los ovocitos en el

13. Diehl PA, Aeschlimann A, Obenchain FD. Tick reproduction: oogenesis and oviposition. In Obenchain, FD & Galun, R (eds), Physiology of ticks New York: Pergamon Press 1982:277-350.

14. Coons LB, Rosell-Davies E, Tarnowsky BI. Blood meal digestion in ticks. In: Sauer JR, Hair JA (eds) Morphology, Physiology and Behavioral Biology of Ticks 1986. Ellis Horwood, Chichester. p.248-71.

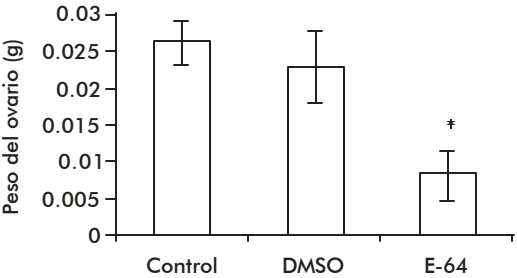


Figura 2. Efecto de la inyección de E-64 en teleoginas de *B. microplus* sobre el peso del ovario ($n=5$ para cada grupo). (*) Indica una diferencia estadísticamente significativa comparada con el grupo control (prueba de mínimos cuadrados, $p < 0.05$).

Tabla 1. Tamaño de los ovocitos mayores presentes en el ovario de las hembras de *B. microplus* como resultado de la inyección del inhibidor E-64. Se midieron tres ovocitos por cada ovario de las 5 garrapatas estudiadas en cada grupo. Las diferencias entre cada grupo no fueron estadísticamente significativas (prueba de mínimos cuadrados).

Grupo experimental	Tamaño de ovocitos mayores (μm)	
	Valor medio	Desviación estándar
Control sin inyectar	52.0	± 1.549
DMSO	51.6	± 1.341
E-64	52.0	± 1.548

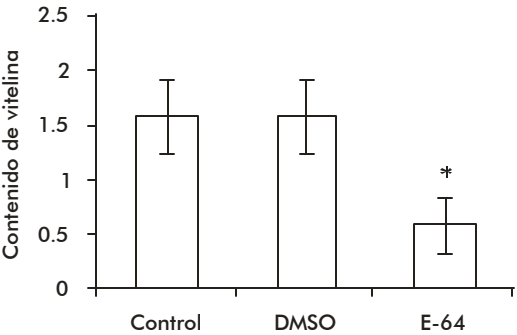


Figura 3. Efecto de la inyección de E-64 en teleoginas de *B. microplus* sobre el contenido de vitelina reflejado como la absorbancia de su grupo hemo (Absorbancia 400 nm-Absorbancia 500 nm) en el extracto de ovarios ($n=5$ para cada grupo). (*) Indica una diferencia estadísticamente significativa.

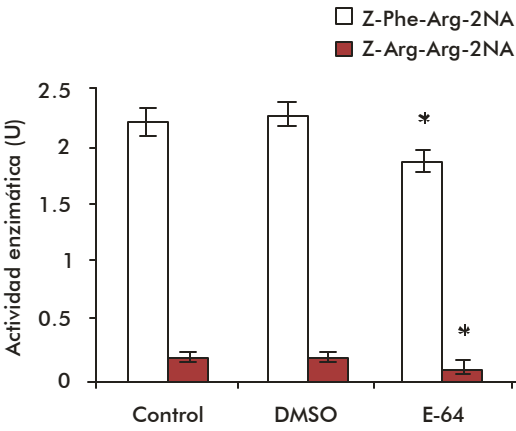


Figura 4. Efecto de la inyección de E-64 en teleoginas de *B. microplus* sobre la hidrólisis de Z-Phe-Arg-2NA y de Z-Arg-Arg-2NA por el extracto de ovarios ($n=5$ para cada grupo). (*) Indica una diferencia estadísticamente significativa comparada con el control (prueba de mínimos cuadrados, $p < 0.05$).

ovario para convertirse en vitelina, la proteína principal de la yema de los huevos [14], la cual constituye el 80% del contenido total de proteínas del huevo recién puesto. En los huevos de *B. microplus*, todas las hemoproteínas se derivan de la vitelina [15], por lo que la medición del contenido de hemo refleja una relación directa con la presencia de estas proteínas. Como resultado de la inyección del E-64 se produjo una disminución de la absorbancia, característica del grupo hemo en el extracto de ovario, lo cual significa una disminución de la cantidad de vitelina en este órgano. Este comportamiento puede estar dado por la afectación de la síntesis de vitelogenina o de su mecanismo de transporte e incorporación al ovario. La participación de cisteíno peptidasas directamente en estos procesos no se ha demostrado. Sin embargo, la presencia de esta clase de peptidasas [6, 16] en el intestino hembras de *B. microplus* repletas de sugiere su participación en la digestión de las proteínas de la sangre ingerida por la garrapata, proceso del cual depende la síntesis de vitelogenina. No obstante, a partir de estudios de alimentación artificial con pepstatin, se ha demostrado que las aspártico peptidasas desempeñan una función relevante en los eventos digestivos [17].

La disminución significativa en las actividades cisteíno peptidasas del ovario puede ser consecuencia de la interacción directa con el inhibidor y/o de la presencia de menos cantidad de enzima en este órgano. Esta última hipótesis apoyaría la relación entre la presencia de estas enzimas y la incorporación de vitelogenina. De hecho, los estudios de nuestro laboratorio sugieren una posible circulación hemolinfática de estas cisteíno peptidasas antes de ser incorporadas al ovario [7].

Es notoria la presencia de menos actividad enzimática semejante a la catepsina B (capaz de hidrolizar el sustrato Z-Arg-Arg-2NA) que de semejante a la catepsina L en el ovario del grupo inyectado con el inhibidor. Este resultado pudiera estar dado por diferencias en cuanto a la histolocalización de ambas actividades, que derivarían en variaciones en la accesibilidad del inhibidor. Estudios posteriores deberán dedicarse a esclarecer este hallazgo.

La reducción de los parámetros que caracterizan el proceso reproductivo de la garrapata, en presencia de un inhibidor de cisteíno peptidasas, demuestra la importancia de estas enzimas en el ciclo de vida de este ectoparásito y merece un estudio posterior, pues se trata de una nueva posibilidad en la amplia gama de mecanismos propuestos para el control de este artrópodo.

15. Canal CW, Maia HM, Vaz Junior IS, Chies JM, Farias NAR, Masuda A, Gonzales JC, Ozaki LS, Dewes H. Changing patterns of vitellin-related peptides during development of the cattle tick *Boophilus microplus*. *Experimental Applied Acarol* 1995;19:325-36.

16. Renard G, Lara FA, Cardoso de Cardoso F, Miguens FC, Dansa-Petretski M, Termignoni C, Masuda A. Expression and immunolocalization of a *Boophilus microplus* cathepsin L-like enzyme. *Insect Mol Biol* 2002;11(4):325-8.

17. Mendiola J, Hernández H, Fernández-Calienes A, García I, De la Vega R. Aislamiento de aspártico proteinasas en diferentes estadios de desarrollo de la garrapata *Boophilus microplus*. *Rev Cub Med Trop* 2001;53(3):145-53.

Recibido en diciembre de 2004. Aprobado en julio de 2005.