

Evaluación de metodologías para el estudio de un receptor de kininas en garrapatas *Rhipicephalus microplus*

Evaluation of methodologies for the study of a kinin receptor in *Rhipicephalus microplus* ticks

Diana P. Carreón-Camacho ^a

Abstract:

R. microplus ticks represent a serious problem to cattle due to direct losses due to parasites, transmitted diseases and the high cost of control due to acaricides. In addition to this, the problem of resistance to acaricides makes it necessary to search for new control alternatives. Neuropeptides of the kinin class have been isolated from a large number of insects including orthopterans and lepidopterans. These neuropeptides are known to have a diuretic and myotropic action. To date, a neuropeptide has been isolated in ticks, however the function and location of the receptor in tick tissues is not known. In this work it is proposed to determine the location of the kinin receptor in *B. microplus* tick tissues by immunohistochemistry and to evaluate its function by means of RNA interference (iRNA).

Keywords:

Rhipicephalus microplus, kinins, neuropeptides, immunohistochemistry, iRNA.

Resumen:

Las garrapatas *R. microplus* representan un grave problema a la ganadería bovina debido a las pérdidas directas por parasitación, enfermedades transmitidas y al elevado costo de control por concepto de acaricidas. Aunado a ello, el problema de resistencia a acaricidas hace necesaria la búsqueda de nuevas alternativas de control. Los neuropeptidos de la clase de las kininas han sido aislados de un gran número de insectos incluyendo ortopteros y lepidopteros. Se sabe que estos neuropeptidos tienen una acción diurética y miotrópica. A la fecha se ha aislado un neuropeptido en garrapatas, sin embargo no se conoce la función y localización del receptor en tejidos de garrapatas. En este trabajo se propone determinar la localización del receptor de kininas en tejidos de garrapatas *B. microplus* mediante inmunohistoquímica y evaluar su función mediante interferencia de ARN (iARN).

Palabras Clave:

Rhipicephalus microplus, kininas, neuropeptidos, inmunohistoquímica, iARN.

Introducción

Las garrapatas son ácaros ectoparásitos hematófagos que parasitan animales silvestres, domésticos y al hombre. Las garrapatas y enfermedades que transmiten representan una de las principales pérdidas económicas en explotaciones de bovinos en el mundo. Actualmente en México se utilizan ixodicidas fosforados, piretroides, amidinas y reguladores del crecimiento. Sin embargo, el uso indiscriminado de estos productos ha propiciado el desarrollo de garrapatas resistentes a los ixodicidas por lo que se requieren nuevas alternativas de control que conlleven a disminuir el problema de resistencia a los ixodicidas químicos contribuyendo con esto a disminuir los problemas de contaminación ambiental y de salud

pública debido a la acumulación de estos químicos en carne y leche.

Aproximadamente un billón de bovinos en el mundo se encuentran en zonas a riesgo de ser afectadas por varios géneros y especies de garrapatas y de las enfermedades que transmiten (Estrada-Peña *et al.* 2006). Su efecto directo sobre la producción resulta por el daño en las pieles (por el piquete y los abscesos que desarrolla) y en consecuencia una apreciable pérdida en el valor de las pieles y pérdida de sangre (Quiroz, 1992). El impacto económico de las garrapatas radica en la transmisión de enfermedades en la producción animal, salud pública así como el alto costo para su control (Jongejan y Uilenberg, 2004).

^a Autor de Correspondencia, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, <https://orcid.org/0000-0001-9259-9943>, Email: diana_carreon@uaeh.edu.mx

El control de las garrapatas tradicionalmente se ha llevado a cabo con acaricidas que de acuerdo con su naturaleza química incluyen a los arsenicales, organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretroides, amidinas e ivermectinas (Quiroz, 2005). Cuando se instituyó la Campaña Nacional Contra la Garrapata, se decidió que los compuestos fosforados fueran los únicos autorizados para el combate de este ectoparásito. Sin embargo, debido a la aparición de resistencia en garrapatas *Boophilus* spp, las autoridades sanitarias mexicanas se vieron obligadas a replantear la política sobre el uso de ixodicidas (Ortiz, 1991).

Los métodos de control de garrapatas, basados principalmente en la utilización de acaricidas, han tenido limitada eficacia en la reducción de la infestación de garrapata y la utilización de acaricidas suele ir acompañada de graves inconvenientes, como la selección de garrapatas resistentes a los acaricidas y la contaminación ambiental (de la Fuente *et al.* 2005).

El desarrollo de vacunas contra proteínas de garrapatas puede reducir la infestación y transmisión de agentes patógenos. Una limitante en el desarrollo de estas vacunas contra garrapata ha sido la identificación de antígenos protectores contra garrapatas. El uso de vacunas contra garrapatas esta encaminado a reducir la infestación de animales y así pueden ser candidatos potenciales como control biológico contra las garrapatas (de la Fuente *et al.*, 2005). Sin embargo, a la fecha la única vacuna que existe para el control de garrapatas es la elaborada a partir del antígeno Bm86 y se ha demostrado que presenta fallas de control en garrapatas de diferentes cepas (Revisado por de la Fuente y Kocan, 2003).

Las garrapatas como artrópodos hematófagos obligados consumen grandes cantidades de sangre al alimentarse lo cual representa un reto para la regulación de los procesos de tratamiento diurético. La necesidad de eliminar agua después del consumo de sangre ha sido observada en un gran número de insectos, donde se sabe que la diuresis es regulada por varios neuropéptidos que influyen en la absorción y resorción en los túbulos de Malpighi y en el recto (Revisado por Nachman y Pietrantonio, *en prensa*).

Se han aislado varios neuropéptidos de diferentes especies de insectos como los órdenes Dictyoptera, Lepidóptera y Orthoptera, estos actúan a través de los receptores acoplados a proteína G. En insectos, se sabe que estos receptores son potentes diuréticos que estimulan la secreción de orina primaria por los túbulos de Malpighi, órganos involucrados en la secreción de sal y el balance de agua y también han sido implicados en la liberación de enzimas digestivas. Sin embargo, en garrapatas, existe poca información al respecto y actualmente se conoce solo un receptor de kininas (miokinina) en garrapatas *B. microplus*.

Los neuropeptidos de la clase de las kininas de los insectos han sido aislados de un gran número de insectos incluyendo ortópteros y lepidópteros. Dentro de estos

neuropéptidos están las kininas de insectos y las periviscerokininas las cuales tienen diferentes funciones en una sola especie (Neupert *et al.*, 2005). Los primeros miembros de esta familia fueron aislados en base a su capacidad para estimular contracciones de calcio en la última porción intestinal de cucarachas, pero también son potentes diuréticos que estimulan la secreción de orina primaria por los túbulos de Malpighi, órganos involucrados en la secreción de sal y el balance de agua, además, las kininas de insectos han sido implicadas en la liberación de enzimas digestivas (Revisado por Nachman y Pietrantonio, *en prensa*). Los receptores acoplados a proteína G (GPCR) son parte integral de la membrana plasmática y se caracterizan por siete hélices, tres extracelulares, tres intracelulares y una terminal amino fuera de la membrana y un grupo carboxilo intracelular. La capacidad selectiva de los GPCR y sus vías de señalización pueden conducir al descubrimiento de nuevos insecticidas (Revisado por Nachman y Pietrantonio, *en prensa*).

El primer neuropéptido de garrapatas fue identificado en *Ixodes ricinus* y *Boophilus microplus* mediante el uso combinado de inmunocitoquímica y análisis de espectrometría de masas de células individuales. La secuencia de este péptido tiene una alta homología con los miembros de los péptidos periviscerokinina/CAP2b que en los insectos están implicados en la regulación de balance hídrico. La función de este péptido en las garrapatas es aún desconocida. Por lo tanto, se requieren estudios para determinar la función de este péptido y su localización en diferentes tejidos (Neupert, *et al.* 2005). El objetivo de este trabajo es evaluar el efecto y la localización de este receptor de kinina en garrapatas *B. microplus* mediante iARN e inmunohistoquímica.

Materiales y Métodos

Síntesis de ARN para iARN

Se utilizará una cepa de garrapatas ya establecida en la interferencia de ARN se seguirá la metodología propuesta descrita para esta especie de garrapata (Hijo *et al.* 2007). Se sintetizará Rand correspondiente al receptor de miokinina. Se utilizarán 250 garrapatas hembras adultas recién mudadas (50 garrapatas por grupo), los controles negativos serán tres, un control positivo y el grupo experimental. Cada grupo de garrapatas se mantendrá junto con 25 machos durante su alimentación durante 10 a 12 días. Al término de la repleción de garrapatas de los grupos controles, todas las garrapatas serán retiradas de las celdas, contadas y pesadas individualmente e incubadas en cámaras con humedad y temperatura de 80% y 37°C respectivamente para permitir la oviposición. Después de 20-22 días se obtendrá el peso individual de la masa de huevos y finalmente se evaluará la eclosión de los huevos en porcentaje de cada grupo de garrapatas.

Inmunolocalización de receptores

Para la inmunolocalización se diseccionarán 5 garrapatas de cada grupo, de las cuales se obtendrán diferentes tejidos (glándulas salivales, saco rectal, intestinos, tubos

de Malpighi, synganglion, y ovarios) y se trabajaran con el protocolo que se estandariza por el Dpto. de Entomología en la Universidad de Texas A&M.

Resultados preliminares

Se han realizado dos experimentos de iARN en garrapatas donde se muestra una disminución significativa de los parámetros evaluados (repleción y oviposición). En cuanto a la inmunolocalización del receptor, este se detecto en intestino y ovarios de garrapatas hembras semi-repletas. Actualmente se trabaja en la detección del receptor en todos los tejidos de garrapatas antes y después de la iARN. Posteriormente se evaluará el silenciamiento del receptor en todos los tejidos mediante PCR transcriptasa reversa (RT-PCR). Estos resultados permitirán conocer el papel del receptor de kininas en garrapatas *B. microplus*, así como su localización y su potencial como acaricida.

Referencias

1. de la Fuente, J., Kocan, K. 2003. Advances in the identification and characterization of protective antigens for recombinant vaccines against tick infestations. *Expert Rev. Vaccine*. 2 (4), 583-593.
2. de la Fuente, J., Almazán, C., Blouin, E.F.; Naranjo, V., Kocan, K.M. 2005. RNA interference screening in ticks for identification of protective antigens, *Parasitol. Res.* 96:137-141.
3. Estrada-Peña, García, Z., Fragoso S.H. 2006. The distribution and ecological preference of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) in México. *Exp. Appl. Acarol.* 38:307-316.
4. Nachman, R., Pietrantonio, P. 2008. Interaction of mimetic analogs of insect kinin neuropeptides with arthropod receptors. In *Neuropeptide systems as Targets for Parasite and Pest Control*. En prensa.
5. Neupert, S., Predel, R., Russell, W., Davis, R., Pietrantonio, P., Nachman, R. 2005. Identification of tick periviscerokinin, the first neurohormone of Ixodidae: Single cell analysis by means of MALDI-TOF/TOF mass spectrometry. *Biochem. And Biophys. Res. Comm.* 338: 1860-1864.
6. Ortiz, M. 1991. Uso de *Ixodidae* en México. Memorias del segundo seminario internacional de parasitología animal. Garrapatas y enfermedades que transmiten. Oaxtepec, Mor. México. p. 57-65.
7. Quiroz, R.H. 2005. Parasitología y Enfermedades Parasitarias de Animales Domésticos. Limusa. México. p. 796-802.
8. Quiroz, R.H. 1992. Situación actual de la problemática de las garrapatas. II Seminario Internacional de Parasitología Animal. Garrapatas y enfermedades que transmiten. Morelos. México. p. 3-7.
9. Taneja-Bageshwar, A., Strey, D., Kaczmarek, J. Zabrocki, Pietrantonio, P., Nachman, R.J. 2008. Comparison of insect kinin analogs with cis-peptide bond, type VI-turn motifs identifies optimal stereochemistry for interaction with a recombinant arthropod kinin receptor from the southern cattle tick *Boophilus microplus*. Peptides (en prensa).