

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

## Identificación de una proteasa neutra en intestino de *Boophilus microplus* por electroforesis en geles de poliacrilamida copolimerizados con gelatina

Lic. Hilda M. Hernández Álvarez,<sup>1</sup> Lic. Judith Mendiola Martínez,<sup>1</sup> Lic. Aymé Fernández-Calienes<sup>2</sup> y Lic. Mario Valdéz<sup>3</sup>

### RESUMEN

Se realizó la identificación de una actividad neutra en intestino de *Boophilus microplus* por electroforesis en geles de poliacrilamida copolimerizados con gelatina, y el máximo de actividad se obtuvo a pH 6,0. Con el sustrato caseína, se obtuvo la mayor actividad específica a ese pH. La desaparición de esta actividad fue demostrada para ambos sustratos después de la adición de fluoruro de fenil metil sulfonilo en las mezclas de reacción. Resulta muy interesante encontrar una actividad endopeptidasa con estas características en el intestino, a pesar de que la actividad digestiva en garrapatas es intracelular a pH muy ácido, a diferencia de los insectos.

**Descriptores DeCS:** ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA/métodos; GARRAPATAS/enzimología; PEPTIDO PEPTIDO-HIDROLASAS/análisis; INTESTINOS.

*Boophilus microplus* es un ectoparásito del ganado, vector de hemoparásitos como *Babesia sp.* y *Anaplasma sp.*, que causa pérdidas económicas significativas en áreas tropicales y subtropicales.

El intestino en garrapatas, es el sitio donde tiene lugar el proceso de digestión, de donde se obtienen la masa y la energía necesarias para la realización de múltiples procesos fisiológicos.<sup>1</sup> Los estudios realizados en *Rhiphicephalus sanguineus* y *Dermacentor variabilis* han demostrado que el estómago es uno de los sitios de síntesis de vitelogenina,<sup>2,3</sup> la que es transportada al ovario vía hemolinfa y convertida en vitelina, constituyente del huevo; además de constituir una vía de penetración de microorganismos al interior de la garrapata.<sup>4</sup>

En 1983, Raikhel<sup>5</sup> planteó que las garrapatas ixódidas se caracterizan por una combinación de 3 tipos de digestión: externa, del lumen intra-intestinal, e intracelular. La fase digestiva externa ocurre mediante el efecto lítico de la saliva; la segunda o intraluminal se limita a una lisis más completa de las células sanguíneas a través de las secreciones de células secretoras; la intracelular ocurre en las células digestivas especializadas y tiene un papel dominante, ya que los componentes sanguíneos sufren hidrólisis completa.

Sin embargo, diferentes autores están en desacuerdo en que sí ocurre digestión en el lumen intestinal. La presencia de aminoácidos libres en el lumen intestinal<sup>6</sup> y en el material fecal<sup>7</sup> en garrapatas se ha utilizado para sugerir la presencia de digestión en el lumen intestinal;<sup>8</sup> aunque, la

<sup>1</sup> Licenciada en Bioquímica. Investigadora Agregada.

<sup>2</sup> Licenciada en Bioquímica. Aspirante a Investigadora.

<sup>3</sup> Licenciado en Bioquímica.

fueron de estos aminoácidos puede ser la sangre del hospedero o células digestivas lisadas. Una enzima que pueda funcionar en el lumen intestinal de las garrapatas no ha sido todavía identificada,<sup>9</sup> dado que el pH de los contenidos intestinales es 6,3 - 6,5<sup>10</sup> y lo que sí ha sido demostrado es que la digestión de proteínas ocurre a pH ácido mediante aspártico proteinasas que son inactivas por encima de pH 6,0.<sup>11,12</sup>

En la última década el estudio de las serino proteinasas en artrópodos ha despertado gran interés por constituir mediadores esenciales de ciertos procesos fisiológicos.<sup>13</sup> Se ha demostrado que estas proteinasas están involucradas en la digestión del alimento dentro del intestino, en la activación de la cascada de la fenoloxidasas en respuesta a las infecciones microbianas, en la destoxificación de agentes nocivos como los insecticidas y en la modulación del desarrollo embrionario.

En el presente reporte se describe el hallazgo de una actividad endopeptidasa neutra de *B. microplus* por electroforesis en geles de poliacrilamida copolimerizados con gelatina.

## MÉTODOS

Las garrapatas utilizadas en el estudio corresponden a una cepa de campo, libre de *Babesia sp.*, mantenidas en los laboratorios del Centro Nacional de Parasitología Veterinaria por pases sucesivos en ganado Holstein. Posterior a la infestación del bovino con larvas, las garrapatas repletas fueron colectadas y se les realizó la disección en salina fisiológica a 4 °C y el extracto fue preparado según la metodología descrita por *Mendiola* y otros en 1996.<sup>12</sup>

Un extracto crudo de células rojas fue preparado según la metodología descrita por *Pontremoli* y otros en 1979.<sup>14</sup> La concentración de hemoglobina fue determinada para esta muestra y para el extracto crudo de garrapata según la metodología descrita por *Dacie* y *Lewis* en 1968.<sup>15</sup>

La actividad proteinasa fue detectada en geles de poliacrilamida 10 % impregnados en gelatina 0,1 % según la metodología descrita por *Heussen* y *Dowdle* en 1980.<sup>16</sup> Las muestras fueron diluidas en el tampón muestra (xileno cianol 0,02 % en sacarosa 15 %) a temperatura ambiente. El tampón

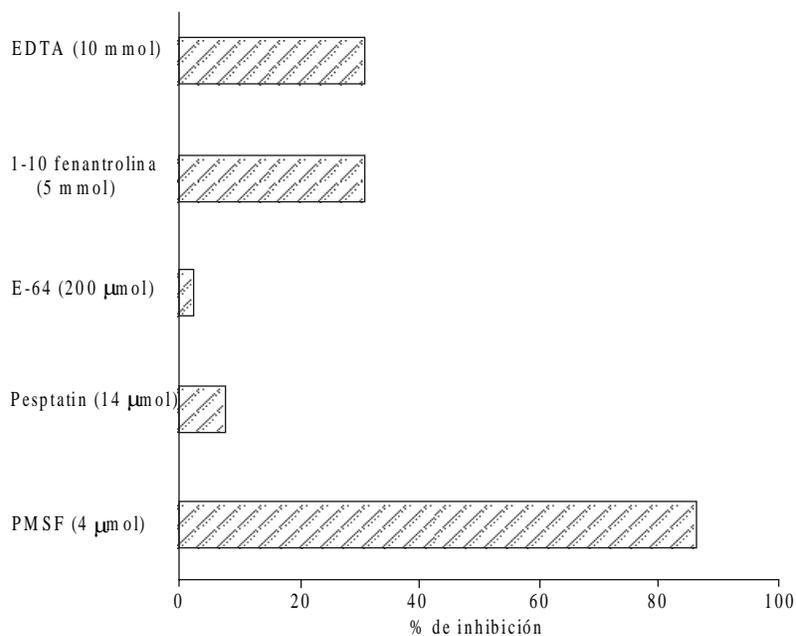
de corrida empleado fue tris-borato 0,045 mol y EDTA 0,001 mol, pH 8,0 a 4 °C. Después de transcurrida la electroforesis el gel fue cortado en tiras, y estas fueron incubadas durante la noche a 37 °C en los diferentes tampones (tampón fosfato disódico a pH 5,0, 6,0 y 7,0 y en tampón tris-clorhídrico a pH 8,0 y 9,0). Después de la incubación, las tiras fueron teñidas en azul de Coomassie 0,1 % en fijador (metanol 40 % y ácido acético 10 %) por 30 min y decolorados en metanol-ácido acético-agua (5:1:5).

El ensayo enzimático frente a diferentes sustratos naturales (hemoglobina bovina, albúmina de suero bovino, caseína, IgG, elastina y colágeno tipo II) se realizó según el método de Anson modificado por *Barrett* en 1970.<sup>17</sup>

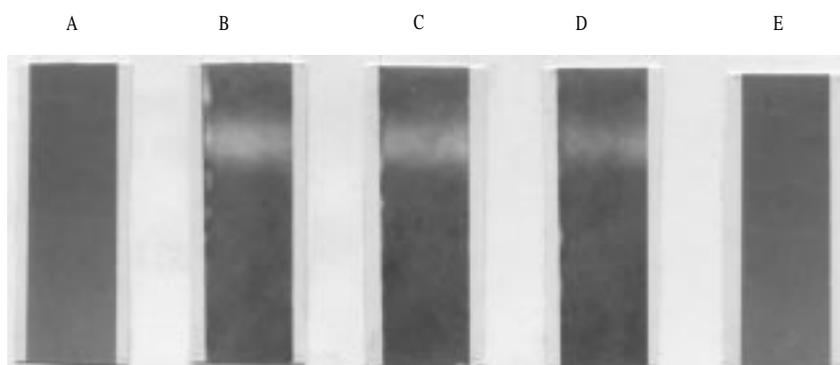
En el estudio de inhibición se incluyó pepstatin, 14 µmol; trans-epoxisuccinil-L-leucilamino (4-guanidino) - butano (E-64), 200 µmol; ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), 10 mmol; 1-10 fenantrolina, 5 mmol y fluoruro de fenil metil sulfonilo (PMSF), 4 mmol por separado, en la mezcla de reacción. Para ello se preincubaron, 50 µL del extracto crudo, 50 µL del tampón de ensayo tris-clorhídrico pH 6,0, 50 µL de agua destilada y 10 µL de la solución del inhibidor durante 1 h a 25 °C, previo al ensayo enzimático. En el ensayo de inhibición en geles de poliacrilamida copolimerizados con gelatina, 10 µL del extracto crudo, 10 µL del tampón muestra y 2 µL del inhibidor fueron incubados 1 h a 25 °C antes de aplicar la muestra. La electroforesis se realizó según se describió anteriormente. Las tiras fueron incubadas durante la noche en el tampón tris-clorhídrico pH 6,0 con cada uno de los inhibidores mencionados.

## RESULTADOS

En los estudios de actividad proteolítica sobre gelatina se obtuvo una banda gelatinolítica a los pH 6,0; 7,0 y 8,0; el máximo de actividad se obtuvo a pH 6,0 (fig. 1). La desaparición de esa actividad fue demostrada sólo después de la adición de PMSF, no sucedió así para el resto de los inhibidores estudiados, lo que sugirió la presencia de una actividad serino dependiente en el extracto. La presencia de hemoglobina, como indicador de la contaminación con proteínas sanguíneas en el extracto, fue despreciable.



**Fig. 1.** Efecto del pH sobre la actividad proteolítica en intestino de *Boophilus microplus* con el empleo de gelatina como sustrato. A: pH 5, B: pH 6, C: pH 7, D: pH 8, E: pH 9.



**Fig. 2.** Efecto de inhibidores sobre la actividad proteolítica en intestino de *Boophilus microplus* con el empleo de caseína como sustrato.

Con el sustrato caseína se obtuvo la actividad específica más alta a diferencia del resto de los sustratos ensayados (tabla). Estos resultados apuntan a favor de la selectividad de la actividad neutra en cuanto a la hidrólisis de sustratos naturales. La hidrólisis de caseína en presencia del extracto crudo fue inhibida por PMSF en 85 % y con EDTA y 1-10 fenantrolina en 25 % (fig. 2). Del estudio del perfil de inhibición frente a este sustrato se derivó también la presencia de una actividad fundamentalmente del tipo serino dependiente.

**TABLA.** Actividad proteolítica neutra de extractos crudos de *Boophilus microplus* sobre sustratos específicos

Sustratos	Actividad específica*
IgG bovina	0,09
Elastina	0,04
Albúmina	0,05
Caseína	1,53
Hemoglobina	0,15
Colágeno tipo II	0,04

\* Micromoles de L-Tirosina/min/mg

## DISCUSIÓN

Resulta muy interesante encontrar una actividad endopeptidasa con estas características en el intestino a pesar de que la actividad digestiva en garrapata es intracelular a pH muy ácido, a diferencia de los insectos. Sin embargo su especificidad de sustrato habla a favor de diferencias marcadas con las actividades semejantes a tripsina y quimotripsina que se presentan en el intestino de la mayoría de los insectos, pues las actividades específicas frente a hemoglobina y seroalbúmina bovinas, proteínas principales en la digestión de sangre intraluminal de todo artrópodo hematófago, fueron significativamente menores. Las hembras adultas en estadios previos al engorde rápido presentan también esta actividad caseinolítica a niveles considerablemente mayores que la adulta repleta, a pesar de que las ingestas de sangre de ambos estadios son significativamente diferentes (resultados no mostrados).

Una de las actividades reportadas por el grupo de trabajo de este estudio en intestino de hembras adultas de *Boophilus microplus* mediante el estudio de hidrólisis de péptidos sintéticos, corresponde a una actividad endopeptidasa neutra semejante a catepsina G.<sup>12</sup> Si ambas actividades se encuentran sobre una misma molécula; lo que solo podrá confirmarse a través del aislamiento y purificación de enzimas; se podría esperar que en el epitelio intestinal estas actividades neutras también estén asociadas con gránulos, como sucede en los leucocitos de la médula ósea de vertebrados.

Más recientemente *Kanost & Jiang*<sup>18</sup> aislaron clones de cDNA de 2 serino proteinasas de una librería de cDNA de hemocitos de *Manduca sexta* con secuencias similares a las enzimas de los granulocitos de vertebrados. Sin embargo, su función aún no se ha definido.

Han sido descritas 6 tipos de células en el intestino de garrapatas: células de reemplazo, las células digestivas, las células secretoras, las células indiferenciadas, las células endocrinas y las células vitelogénicas. Todas ellas con excepción de las células vitelogénicas han sido distinguidas solamente por su morfología.<sup>19</sup> Así ningún producto de las células secretoras ha sido identificado; ni se conoce el papel del producto secretado en algún proceso fisiológico.<sup>2</sup>

En la medida en que se disponga de anticuerpos contra las enzimas purificadas, la microscopia electrónica con la utilización de conjugados de proteína A-oro coloidal u otras técnicas inmunohistoquímicas permitirá conocer la localización precisa de los antígenos en los niveles celular y subcelular. Trabajos futuros son necesarios para profundizar en el conocimiento del papel que desempeñan estas endopeptidasas neutras en la fisiología de la garrapata.

## SUMMARY

A neutral activity of *Boophilus microplus* in the intestine was identified by electrophoresis in polyacrilamide gel copolymerized with gelatin. The maximum of activity was attained at pH 6.0. The highest specific activity at that pH was obtained with casein substrate. The disappearance of this activity was observed in both substrates after the addition of phenylmethylsulphonyl fluoride in the reaction mixtures. It was very interesting to find out an endopeptidase activity with these characteristics in the intestine, in spite of the fact that the digestive activity in ticks is intracellular at very acid pH, which does not occur in other insects.

**Subject headings:** ELECTROPHORESIS, POLYACRYLAMIDE GEL/methods; TICKS/enzymology; PEPTIDE PEPTIDOHYDROLASES/analysis; INTESTINES.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gransjean O. Blood digestion in *Ornithodoros moubata* females, I. Biochemical changes in the midgut lumen and ultrastructure of the midgut cell, related to intracellular digestion. *Acarologia* 1984;25:147-65.
2. Coons L, Tarnowski B, Ourth D. *Rhiphicephalus sanguineus*: localization of vitellogenin synthesis by immunological methods and electron microscopy. *Experimental Parasitology* 1982; 54:331-9.
3. Tarnowski B. Blood meal digestion and vitellogenesis in the tick *Dermacentor variabilis* Say. Ph. D. Dissertation, Memphis State University, 1983.
4. Kocan KM. Targeting ticks for control of selected hemoparasitic diseases of cattle. *Veterinary Parasitology* 1995;57:121-51.
5. Raikhel A. Atlas of Ixodid Tick Ultrastructure. Yu. S. Balashov, ed. The intestine. Entomological Society of America Special Publication. 1983:59-107.
6. Boctor FN, Araman SF. Biochemical and physiological studies of certain ticks (Ixodoidea). Total free amino acids in gut, hemolymph and coxal fluids of *Argas (Persicargas) persicus* (Oken) and *arboreus* Kaiser, Hoogstraal and Kohls (Argasidae). *J Med Entomol* 1971;8:525-8.
7. Hamdy BH. Biochemical and physiological studies of certain ticks (Ixodoidea). Excretion in ticks. *J Med Entomol* 1977;14:15-8.
8. Adyei AD, Runham NW, Blackstock N. Histochemical changes in the midgut of two ixodid tick species. *Boophilus microplus* and *Rhiphicephalus appendiculatus* during digestion of the blood meal. *Experimental Applied Acarology* 1992;11:187-212.
9. Coons LB, Rosell-Davies E, Tarnowski BI. Bloodmeal digestion in ticks. J. R. Sauer and J. A. Hair, eds. *Morphology, Physiology and Behavioral Biology of ticks*. Ellis Chichester: Horwood, 1986:248-71.

10. Bogin E, Hadani A. Digestive enzymes in «hard ticks» (Ixodoidea), Ixodidae. I. Proteolytic enzyme activity in the gut of *Hyalomma excavatum* female ticks. *Zeitschrift fur Parasitenkunde* 1973;41:139-46.
  11. Vundla WR, Brossard M, Pearson DJ, Labongo VL. Characterization of aspartic proteinases from the gut of the tick, *Rhipicephalus appendiculatus*. *Insect Biochem Mol Biol* 1992;22:405-10.
  12. Mendiola J, Alonso M, Marquetti M, Finlay CM. *Boophilus microplus*: multiple proteolytic activities in the Midgut. *Exp Parasitol* 1996;82:27-33.
  13. Rosenfeld A, Vanderberg JP. Identification of electrophoretically separated proteases from midgut and hemolymph of adult *Anopheles stephensi* mosquitoes. *J Parasitol* 1988;84:361-5.
  14. Pontremoli S, Salamino F, Sparatore B, Mellini E, Morelli A, Benatti U, *et al.* Isolation and partial characterization of three acidic proteinases in erythrocytes membranes. *Biochem J* 1979;181: 559-68.
  15. Dacie JV, Lewis SM. *Practical Haematology*. London: Churchill, 1968;
  16. Heussen C, Dowdle EB. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Anal Biochem* 1988;102:196-202.
  17. Barret AJ, Cathepsin D. Purification of isoenzymes from human and chicken liver. *Biochem J* 1970; 117:601-7.
  18. Kanost MR, Jiang H. Chemistry and biology of serpins: serpins from an insect, *Manduca sexta*. New York: Plenum, 1977:248-71.
  19. Grandjean O, Aeschlimann A. Contribution to the study of digestion in ticks: histology and fine structure of the midgut epithelium of *Ornithodoros moubata* Murray (Ixodoidea, Argasidae). *Acta Trop* 1973;30:193-212.
- Lic. *Hilda M. Hernández*. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". Apartado 601, Marianao 13, Ciudad de La Habana, Cuba. Correo electrónico: [ciipk@ipk.sld.cu](mailto:ciipk@ipk.sld.cu)