

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

## Aislamiento de aspártico-proteinasas en diferentes estadios de desarrollo de la garrapata *Boophilus microplus*

Lic. Judith Mendiola,<sup>1</sup> Lic. Hilda Hernández,<sup>2</sup> Lic. Aymée Fernández-Calinenes,<sup>3</sup> Téc. Israel García<sup>4</sup> y Dr. Rafael de la Vega<sup>5</sup>

### RESUMEN

Se analizó en adultos de *Boophilus microplus* la magnitud de la expresión tisular de aspártico-proteinasas en estadios juveniles, así como la influencia de uno de los inhibidores de aspártico-proteinasas de más amplio uso (pepstatin A) en el desarrollo de estos. Se realizó el aislamiento y la cuantificación de la actividad proteolítica ácida en muestras de parásitos de diferentes estadios del proceso digestivo donde se confirmó la presencia de actividad aspártico proteínasa y se observó una tendencia al incremento en los valores de actividad enzimática por cada miligramo de peso total durante el desarrollo de las adultas, con un descenso de esta relación justo con el repletamiento. La adición de pepstatin A a la ingesta en concentraciones de 14 y 70  $\mu\text{mol}$  no tuvo efecto sobre la viabilidad de las adultas jóvenes durante su mantenimiento *in vitro* por 24 h y excluye así efectos tóxicos inmediatos de este compuesto. Sin embargo, en los experimentos en los cuales las adultas después de haber recibido las diferentes ingestas son puestas en aisladores con machos sexualmente competentes durante 6-7 d, la viabilidad presentó resultados diferentes ( $p < 0,01$ ) a la concentración de 70  $\mu\text{mol}$ . El efecto sobre el desarrollo de las adultas jóvenes fue discreto, sin embargo sugiere que se podría estar frente a una acción inhibitoria selectiva sobre las enzimas dependientes de aspártico.

**DeCS.** ENDOPEPTIDASAS ASPARTICAS/aislamiento & purificación; PEPSTATINAS; GARRAPATAS/crecimiento o desarrollo; INFESTACIONES POR GARRAPATAS; INHIBIDORES DE LA PROTEASA.

Las garrapatas de la familia *Ixodidae* son los artrópodos hematófagos más importantes como vectores de agentes infecciosos para el ganado y los animales salvajes; superados solo por los mosquitos como vectores de una variedad de patógenos al ser humano.<sup>1</sup> Las pérdidas económicas que estas producen son el incentivo principal para el desarrollo e introducción de nuevos métodos de control.<sup>2</sup>

Un pesticida efectivo ha sido definido como una sustancia que tiene especificidad para un componente poco abundante y vital para la supervivencia del organismo infestante.<sup>3</sup> La mayoría de los agentes existentes (organofos-

forados, carbamatos y piretroides), que efectivamente controlan las plagas de artrópodos, afectan receptores u otros componentes en el sistema nervioso de estos.<sup>4</sup> Sin embargo, las garrapatas presentan numerosos receptores de la membrana celular, hormonas que pudieran funcionar también como blancos para el control de su desarrollo y reproducción.<sup>5</sup>

Las garrapatas son ectoparásitos hematófagos obligados, y la ingesta de sangre, además de las proteínas, carbohidratos y lípidos de reserva, almacenados en el epitelio intestinal y el cuerpo graso, son el recurso nutricional limitado cuyo uso debe ser compartido entre los requerimientos de la

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

<sup>2</sup> Licenciada en Bioquímica. Investigadora Agregada.

<sup>3</sup> Licenciada en Bioquímica. Aspirante a Investigadora.

<sup>4</sup> Técnico en Veterinaria.

<sup>5</sup> Doctor en Ciencias Biológicas. Doctor en Medicina. Investigador Titular.

respiración celular y el crecimiento somático y reproductivo.<sup>6</sup> La utilización eficiente de este recurso limitado depende en gran medida de la función digestiva, la cual ocurre intracelularmente en garrapatas y donde las enzimas capaces de degradar los componentes sanguíneos deben desempeñar un papel fundamental.<sup>7</sup>

Las enzimas proteolíticas han demostrado amplias potencialidades como blancos para intervenir en la supervivencia de parásitos o disminuir su eficiencia reproductiva.<sup>8</sup> Cada vez gana mayor atención, la síntesis de análogos no peptídicos del núcleo activo de péptidos dirigida a la obtención de compuestos capaces de inhibir procesos críticos en insectos y parásitos.<sup>9-11</sup> Sin embargo, se conoce poco acerca de los requerimientos nutricionales y de las capacidades sintéticas de la garrapata hembra. Se presume que se requieren aminoácidos esenciales y que estos son suministrados en la ingesta de sangre que debe ser hidrolizada por la acción de proteasas.<sup>6</sup> Varios estudios se han aplicado para conocer y validar estas biomoléculas, como blancos críticos para la supervivencia de diferentes especies de parásitos. La mayoría de estos estudios han utilizado inhibidores específicos, para demostrar que la supresión de la actividad de una enzima puede conducir a detener el desarrollo o provocar la muerte de los parásitos, tanto *in vitro* como *in vivo*. También se demuestran los mismos efectos deletéreos a través de mutaciones inducidas que eliminan los genes para ciertas proteasas.<sup>10</sup>

Solo unos pocos estudios han descrito las propiedades de las enzimas digestivas en garrapatas. Akov<sup>12</sup> concluyó que las propiedades de la enzima aislada en *Ornithodoros tholozani* sugerían similitud a la catepsina D, aunque solo recientemente las proteasas hemoglobinolíticas intestinales en adultas repletas han sido caracterizadas como aspártico-proteinasas.<sup>13,14</sup>

La ingesta de sangre contiene el sustrato principal para aspártico-proteinasas de *B. microplus*, la hemoglobina,<sup>14</sup> para la cual ha sido demostrada su conversión en hematina durante las fases de digestión continuas.<sup>15</sup> La ingesta de sangre también posibilita el suministro de efectores contra potenciales blancos intestinales.<sup>2</sup> La dieta de las larvas de *Boophilus microplus* y otros ixódidos contiene mayoritariamente tejido lisado, exudado

seroso y muy poca sangre total, mientras las hembras adultas ingieren la mayor cantidad de eritrocitos. Las ninfas son intermedias en este aspecto.<sup>16</sup>

El desconocimiento de la magnitud de la expresión tisular de aspártico proteinasas, para aquellos estadios juveniles cuya alimentación está relacionada con la hidrólisis de hemoglobina y otras proteínas sanguíneas, motivó a realizar estudios de aislamiento y cuantificación de la actividad proteolítica ácida en las etapas de desarrollo posteriores al estadio larval. Se estudió además, el efecto del suministro de un inhibidor específico para aspártico proteinasas sobre el desarrollo de las adultas jóvenes de *B. microplus*, mediante un método de alimentación artificial.

## MÉTODOS

### *Garrapatas*

Se utilizó una cepa de campo de *Boophilus microplus* libre de *Babesia* spp., mantenida en los Laboratorios Biológicos Farmacéuticos (LABIOFAM).

### *Descripción de la muestra de parásitos de diferentes estadios del proceso digestivo y preparación de extractos*

Muestras del estadio ninfal de *B. microplus* fueron obtenidas 10 d después de la infestación de un bovino con 10 000 larvas. A continuación se desprendieron jóvenes adultas en fase de crecimiento tomadas los días 2(a) y 4(b) después de la muda y semirrepletas y repletas. Las repletas fueron incubadas a 27 °C y humedad relativa mayor que 90 % y se tomaron muestras los días 0, 6 y 15 después del desprendimiento que comprendía el período de preoviposición-oviposición. Todas las adultas fueron pesadas y las semirrepletas y repletas fueron disecadas para la colección de estómagos. Cada 10 jóvenes adultas completas y 5 estómagos de los estadios subsiguientes fueron mezclados y homogeneizados manualmente en 1,0 mL de salina fisiológica, con un homogenizador de teflón para microtubos. Se realizaron extractos que contenían 100 ninfas cada uno en el volumen

mencionado. Los extractos fueron clasificados mediante centrifugación a 10 000 g durante 60 min y se realizó la separación cromatográfica como se describe a continuación.

#### *Aislamiento y separación cromatográfica de la actividad proteolítica en muestras no disecadas*

Se realizó primero el análisis en extractos crudos de ninfas, los cuales fueron aplicados en una columna de intercambio aniónico Q-sefaraosa de flujo rápido (XK 16/10, Pharmacia) equilibrada con tampón Tris/HCL, pH 7,0, 50 mmol y acoplada a sistema de cromatografía líquida de proteínas de alta resolución (FPLC), V flujo 1 mL/min. Se colectó el total de proteínas que no se adsorben a la columna en condiciones de equilibrio como fracción A y luego se eluyeron las proteínas que son desplazadas con 1 mol NaCl como fracción B, según resultados obtenidos previamente a escala analítica.<sup>14</sup> Cada fracción fue concentrada mediante ultrafiltración a 4 °C hasta el volumen original del extracto. La homogeneidad de la fracción A como aspártico-proteinasas se analizó en cada extracto obtenido de cada estadio en estudio y se realizaron los ensayos de clasificación catalítica también en la fracción B, tal como se describe a continuación. La muestra de estómagos disecados se utilizó para evaluar la recuperación del proceso.

#### *Ensayo de la actividad proteolítica en ambas fracciones*

Esta se determinó por el método clásico de Anson modificado por Barrett.<sup>17</sup> Soluciones de hemoglobina fueron preparadas a 10 %. Fueron incubados 50 µL de la fracción A o B obtenidas para cada uno de los estadios en estudio con volúmenes iguales (50 µL) de solución de proteína sustrato, tampón de pH y agua. La mezcla fue incubada a 37 °C durante 30 min o 1 h, en dependencia de la actividad de la muestra y se ajustó el ensayo a condiciones de velocidad inicial y pH 3,0. La reacción se detuvo mediante la adición de ácido tricloroacético frío 6 %. Después de la incubación durante 10 min a 4 °C, los tubos fueron centrifugados a 10 000 g durante 10 min. Los sobrenadantes fueron colectados para determinar la concentración de péptidos por el método de

Lowry<sup>18</sup> con la utilización de seroalbúmina como estándar. Las determinaciones se realizaron por cuadruplicado. Las unidades de actividad fueron expresadas como µg de proteína degradada por hora.

#### *Clasificación catalítica*

Se preparó una solución acuosa de leupeptin y etanólica de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF). Inhibidores como el pepstatin, 1-cloro-3-tosilamido-7-amino-2-heptanona (TLCK) y trans-epoxy-succinyl-L-leucylamido (4-guanidinio) butano (E-64) fueron preparados en dimetilsulfóxido. Aquellos inhibidores que requirieron dimetilsulfóxido (DMSO) y etanol para su disolución, estos solventes fueron añadidos en cantidades equivalentes a tubos controles. Se midió el efecto de inhibidores sobre la hidrólisis de hemoglobina ensayada como se describe anteriormente, a pH óptimo 3,0, después de la preincubación del extracto con el tampón de ensayo y las soluciones de inhibidores durante 1 h a 25 °C. Se determinó la actividad residual y se consideró la actividad en muestras controles igual a 100 %.

#### *Efecto del suministro de un inhibidor específico para aspártico proteinasas sobre el desarrollo de las adultas jóvenes de B. microplus, en la utilización de un método de alimentación artificial*

Se utilizó un dispositivo para sostener e inmovilizar adultas recién mudadas *in vitro* durante la alimentación con capilares.<sup>19</sup> Utilizando un microscopio estereoscópico se introduce el aparato bucal dentro del extremo del capilar que contiene sangre bovina heparinizada. Las garrapatas se pesan en balanza analítica antes y después de 15 a 20 min en contacto con el capilar, para comprobar que han tomado sangre de este.

Se realizó también el análisis de las proteínas totales antes y después de la alimentación artificial mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de duodecil sulfato de sodio (SDS). Cada adulta fue homogeneizada con 10 L de *buffer* tris/HCl 25 mmol pH 6,8, SDS 3 %, sacarosa 10 %, 2-mercaptoetanol 10 %, azul de bromofenol 0,05 %. Después se le adicionaron

10  $\mu\text{L}$  de agua destilada y los extractos fueron calentados a 100 °C durante 3 min. Los microtubos fueron centrifugados y los sobrenadantes fueron aplicados en cantidad de 10  $\mu\text{L}$  a geles de poliacrilamida 12,5 % para su separación de acuerdo con el método de Lemmli.<sup>20</sup> Se realizó la tinción simultánea con azul de Coomassie de geles que contenían muestras de adultas antes y después de la alimentación.

El experimento constó de un grupo de adultas no sometidas a la manipulación de la alimentación artificial, controles de adultas que recibieron sangre heparinizada sin DMSO 1 % (control 1) y con DMSO 1 % (control 2) y un grupo que recibió pepstatin a concentraciones de 14  $\mu\text{mol}$  y 70  $\mu\text{mol}$  disuelto en sangre heparinizada y DMSO 1 %. En una serie de experimentos, todos los grupos eran mantenidos *in vitro* a humedad relativa mayor que 90 % y 26 °C durante 24 h; mientras que en otra serie las hembras alimentadas fueron restringidas en 4 aisladores adheridos sobre la piel de un bovino, donde machos sexualmente competentes obtenidos de otro bovino previamente infestado fueron añadidos en un número de 10 para cada aislador. En cada experimento realizado en aisladores fue determinada la viabilidad, el tiempo de desprendimiento después de repletas y el peso obtenido por estas en cada grupo. En experimentos *in vitro* solo se determinó la supervivencia. Después de 24 h, las garrapatas se consideraron vivas si eran capaces de desplazarse libremente o bajo estímulo, cuando se colocaron sobre una placa de Petri a la luz de un microscopio estereoscópico. Las pruebas en las cuales se obtuvo una mortalidad superior a 20 % fueron eliminadas y el experimento se repitió.<sup>21</sup> En la comparación de la viabilidad de control 2 y pepstatin 14  $\mu\text{mol}$ , los experimentos se hicieron por duplicado. En total se realizaron 3 repeticiones de la comparación de la viabilidad de los grupos control 2 y pepstatin 70  $\mu\text{mol}$ ; *in vitro* y en aisladores sobre bovinos cada uno que contenían entre 10 y 12 adultas recién mudadas. Se reportan los resultados del tiempo de repleción y peso de repletas para uno de los experimentos, como evidencia de un comportamiento que se reprodujo, ya que los valores de estas variables en diferentes infestaciones no pueden promediarse.

#### *Análisis estadístico*

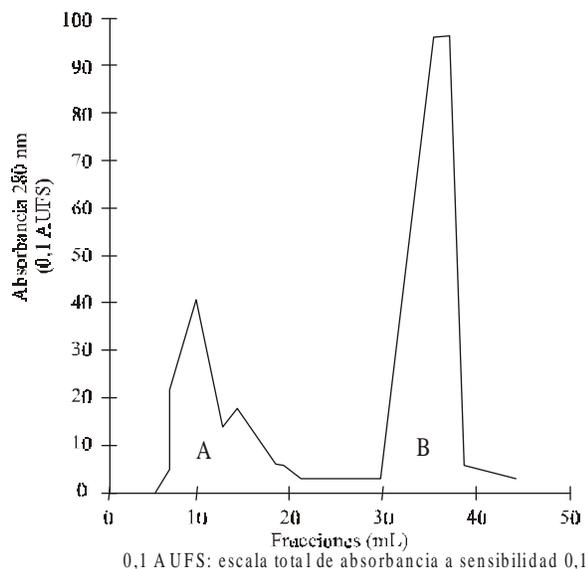
Se compararon los valores de actividad enzimática aspártico dependiente por cada miligramo de peso total, durante el desarrollo de

las adultas mediante la prueba de Mann-Whitney. En los experimentos de alimentación artificial se utilizó una prueba de comparación de proporciones en relación con la viabilidad después de los diferentes tratamientos. El peso de las hembras repletas en cada grupo y el tiempo requerido para su desprendimiento del bovino también fueron comparados por la prueba de Mann-Whitney.

## RESULTADOS

La presencia de actividad aspártico-proteínasa fue confirmada en diferentes estadios del proceso digestivo de *B. microplus*. Como puede observarse en los resultados obtenidos en ninfas, la fracción A presenta actividad totalmente inhibida por pepstatin 14  $\mu\text{mol}$ , mientras la fracción B presentó valores similares de actividad hemoglobinolítica aunque no fue inhibida por pepstatin (fig. 1). La separación cromatográfica para el aislamiento de actividad aspártico proteínasa en muestras no disecadas con la utilización de la matriz de Q-sefarosa de flujo rápido resultó de gran utilidad, porque esta actividad se encontró solamente en la fracción A para todas las muestras estudiadas y se recuperó en muestras controles (crudos de estómagos disecados) más de 70 % de la actividad inicial de los extractos. La fracción B fue inhibida por leupeptin (200  $\mu\text{mol}$ ), E-64 (200  $\mu\text{mol}$ ) y TLCK (10  $\mu\text{mol}$ ), no así por PMSF (2 mmol), lo que sugiere la presencia de una cisteína proteínasa también activa sobre hemoglobina. La presencia de esta actividad hace imprescindible la separación cromatográfica sobre la base de las diferencias en propiedades ácido-básicas demostradas, para el aislamiento y la cuantificación específica de la actividad ácida aspártico dependiente.

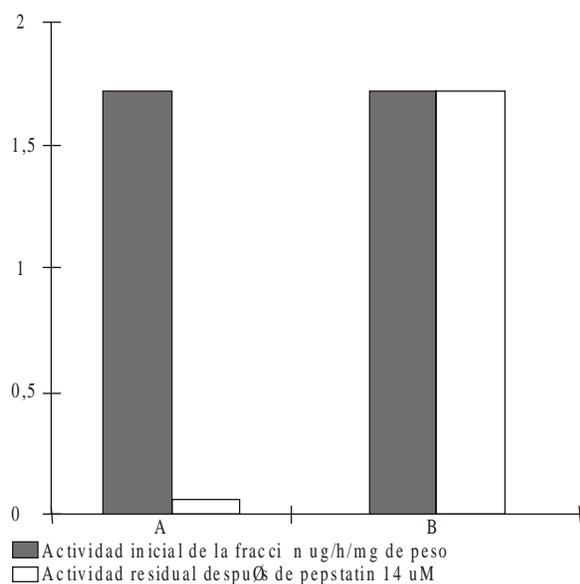
El intestino crece durante los estadios tempranos de la alimentación para acomodar la expansión necesaria para el engorde. En correspondencia con esto, se observó una tendencia al incremento en los valores de actividad enzimática por cada miligramo de peso total durante el desarrollo de las adultas (fig. 2); sin embargo, la adulta repleta presenta inesperadamente los menores valores de actividad proteolítica en la



**Fig. 1.** Perfil de elución de proteínas de extractos de ninfas de *B. microplus* separadas mediante cromatografía de intercambio aniónico en matriz Q-sefarosa flujo rápido (*Pharmacia*).

fracción A/mg de peso total de la adulta ( $p < 0,05$ ). Los niveles de actividad enzimática por miligramo de peso se mantienen durante el período de oviposición.

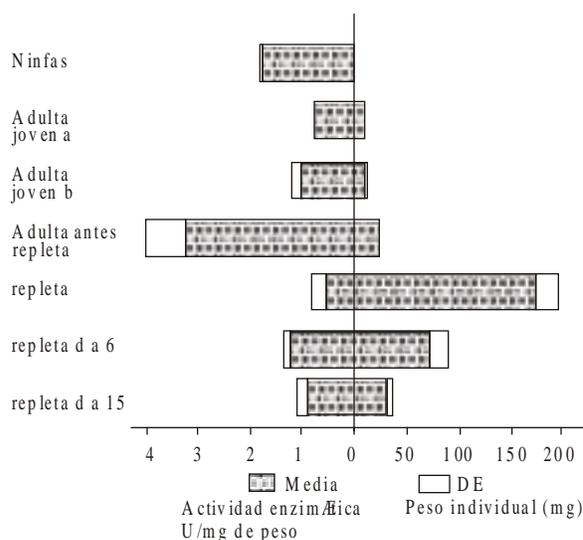
Se realizaron ensayos de alimentación artificial con capilares de adultas jóvenes recién mudadas *in vitro* para el estudio de la factibilidad de este



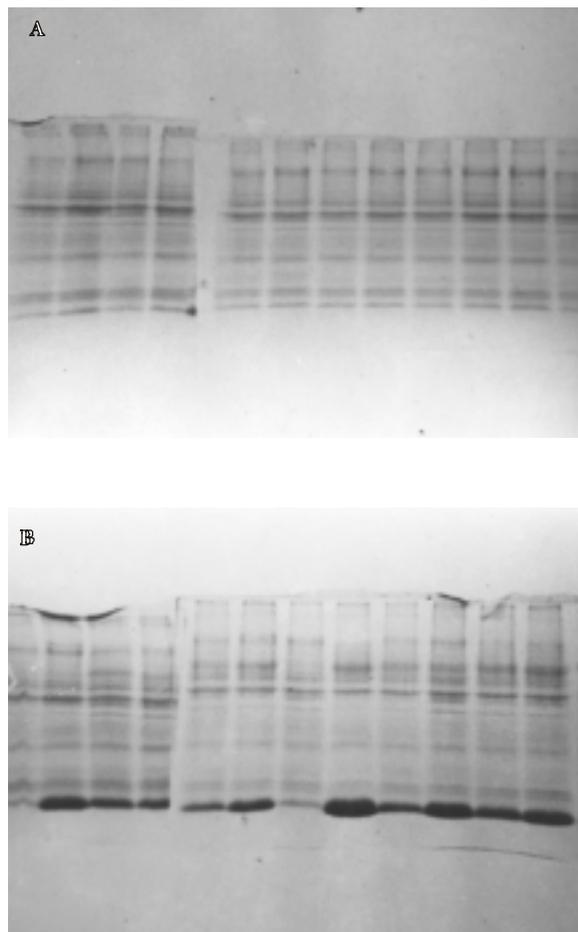
**Fig. 2.** Actividades proteolíticas de las fracciones de extractos de ninfas de *B. microplus* separadas mediante cromatografía de intercambio aniónico en matriz Q-sefarosa flujo rápido (*Pharmacia*).

método para el suministro de inhibidores de proteasa (aspártico-proteinasas) y para conocer cómo influye uno de los inhibidores de aspártico-proteinasas de más amplio uso en el ciclo parasítico. En todos los experimentos se comprobó por el aumento de peso que las pequeñas adultas habían tomado una ingesta de sangre que contenía o no sustancias añadidas (datos no mostrados), lo cual constituyó una premisa para la iniciación de los experimentos. También se confirmó la ingestión de proteínas sanguíneas como parte del fluido embebido mediante el análisis del perfil de proteínas totales en adultas antes y después de la alimentación, obtenidos los extractos en iguales condiciones y con la aplicación de iguales volúmenes de muestra; por lo tanto, reflejan cambios cualitativos y cuantitativos notables en el perfil de las proteínas totales de este estadio en condiciones de alimentación artificial (figs. 3 y 4).

La adición de pepstatin a la ingesta en concentraciones de 14 y 70 μmol no tuvo efecto sobre la viabilidad de las adultas jóvenes durante su mantenimiento *in vitro* durante 24 h, se excluyeron así efectos tóxicos inmediatos de este compuesto a las concentraciones probadas (tabla). Sin embargo, en los experimentos en los cuales las



**Fig. 3.** Actividad aspártico-proteínasa en diferentes estadios del proceso digestivo de *B. microplus* y pesos promedio de los individuos de cada estadio. Una unidad de actividad es la cantidad que produce un microgramo de proteína degradada (o péptidos) por hora, en incubación a 37 °C, a pH óptimo 3,0.



**Fig. 4.** Perfil de proteínas totales obtenido mediante electroforesis en geles de poliacrilamida/SOS 12,5 % de adultas jóvenes recién mudadas de *B. microplus*, antes (a) y después (b) de la alimentación artificial mediante capilares.

adultas después de haber recibido las diferentes ingestas son puestas en aisladores con machos sexualmente competentes, la viabilidad presentó resultados diferentes desde el punto de vista estadístico ( $p < 0,01$ ) a la concentración de 70  $\mu\text{mol}$  (tabla); no así a la concentración inferior estudiada. Una potencia mayor de este efecto no pudo obtenerse ya que concentraciones superiores de pepstatin presentaron problemas de solubilidad.

Como dato adicional, las adultas que no sobreviven se ven limitadas del aumento de tamaño y finalmente se desprenden del hospedero después de 72 h en el aislador. Las adultas que sobreviven no

presentan diferencias entre grupos experimentales en cuanto al tiempo que demoran en repletarse (*control 1*:  $155 \pm 23,5$  h, *control 2*:  $177 \pm 29,8$  h, pepstatin 70  $\mu\text{mol}$ :  $167 \pm 10,2$  h); así como en el peso final de la hembra repleta (*control 1*:  $309 \pm 42,6$  mg, *control 2*:  $284 \pm 52,6$  mg, pepstatin 70  $\mu\text{mol}$ :  $293 \pm 45,8$  mg).

**TABLA.** Efectos de la alimentación *in vitro* con capilares que contienen sangre heparinizada y dimetilsulfóxido (DMSO) 1 % como controles y pepstatin 14  $\mu\text{mol}$  y 70  $\mu\text{mol}$  añadidos, sobre la viabilidad de adultas jóvenes mantenidas *in vitro* 24 h y en aisladores sobre bovinos hasta el engorde final

Grupo experimental	Viabilidad					
	<i>In vitro</i> 24 h		En aisladores			
	% viables	N1/N2	% viables	N1/N2		
No alimentadas	100	-	20/20	100	-	20/20
Control 1	NE	-	NE	100	-	20/20
Control 2	80	-	16/20	95,0 $\pm$ 7,07	-	19/20
Pepstatin 14 $\mu\text{mol}$	80	-	16/20	100	-	20/20
No alimentadas	91,6 $\pm$ 8,35	-	31/34	100	-	15/15
Control 1	NE	-	NE	100	-	15/15
Control 2	85,0 $\pm$ 5,97	-	29/34	93,3 $\pm$ 5,77	-	28/30
Pepstatin 70 $\mu\text{mol}$	81,5 $\pm$ 10,9	-	28/34	66,6 $\pm$ 11,5	-	20/30

N1/N2: número total de garrapatas vivas en el total de alimentadas, Control 1: sangre heparinizada sin DMSO 1 %, Control 2: sangre heparinizada con DMSO 1 %, NE: no ensayado, -: no se detecta.

## DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo, en relación con la posible participación de las proteasas ácidas aspártico dependientes en el proceso digestivo de ninfas y adultas jóvenes de *B. microplus*, parecen estar en correspondencia con los hallazgos de Walker y Fletcher,<sup>22</sup> quienes consideraron el proceso que ocurre en la ninfa como representativo de la digestión en larvas y adultos de *Rhipicephalus appendiculatus*. Más adelante demostraron la presencia de similares tipos celulares en el intestino de ninfas y adultas mediante estudios histoquímicos

y de microscopía electrónica. Otros estudios han demostrado que las células intestinales en garrapatas adultas no alimentadas contienen endosomas procedentes de la ingesta ninfal, la cual ha sido digerida mediante heterofagia.<sup>23</sup>

La cópula estimula el desarrollo hasta el engorde final y los cambios citológicos en el intestino que acompañan a esta fase se van preparando varias horas antes.<sup>16</sup> Esto pudiera explicar el por qué del aumento significativo del contenido enzimático en los estadios que preceden muy de cerca al engorde rápido y el descenso de la relación actividad: miligramo de peso corporal, ya que el peso de la hembra se incrementa significativamente en solo 12 a 24 h, a lo cual contribuye grandemente el volumen de sangre removida del hospedero.<sup>24</sup> Esta fase de engorde rápido se considera una fase de digestión reducida, lo que se deduce del predominio de grandes endosomas mientras los cuerpos residuales no son detectables.<sup>16</sup>

Los niveles de enzima se mantienen similares durante el período de preoviposición-oviposición que sí es una fase digestiva activa. Se ha planteado que la célula digestiva tiene una alta actividad biosintética y que esta biosíntesis se relaciona efectivamente con la síntesis de enzimas lisosomales, que en sucesivos ciclos son producidas para completar la digestión de los contenidos en los grandes endosomas de la célula digestiva.<sup>16</sup>

En adultas semirrepletas, colectadas antes del engorde rápido, y hembras repletas de *B. microplus*, la actividad cisteíno proteinasa ha sido aislada fundamentalmente a partir de 3 órganos: el ovario, las glándulas salivales<sup>25</sup> y la hemolinfa.<sup>26</sup> Resultados similares se han obtenido en *O. moubata*, especie en la que se han detectado cisteíno proteinasas también en el desarrollo embrionario, fase larval y a veces permanecen en el intestino de las ninfas y son de origen materno.<sup>27</sup> Esto pudiera explicar la presencia de actividad cisteíno-proteinasa en la fracción B de muestras no disecadas de ninfas y adultas jóvenes de *B. microplus*.

El pepstatin provocó un efecto tóxico parcial en las adultas a concentración de 70  $\mu\text{mol}$ . Resulta interesante la observación de que esta misma concentración no produjo efectos tóxicos inmediatos, esto sugiere que se podría estar frente

a una acción inhibitoria selectiva sobre las enzimas digestivas y que la detención del crecimiento observado en las garrapatas afectadas está en relación con la importancia de la digestión proteolítica.

El pepstatin ha sido utilizado en varios experimentos *in vitro* e *in vivo* donde ha producido afectaciones considerables sobre el desarrollo y la viabilidad de parásitos dependientes de la hidrólisis de hemoglobina y donde se ha demostrado que puede incorporarse a los compartimentos celulares involucrados en la digestión de esta proteína.<sup>28</sup> Sin embargo, el efecto sobre el desarrollo de las adultas jóvenes de *B. microplus* fue discreto. Enzimas activas sobre otras proteínas de la sangre podrían provocar que la presencia de un inhibidor solo para aspártico proteinasas, puede ser insuficiente para lograr una inhibición de la digestión de proteínas sanguíneas.

El paralelo entre la digestión intracelular en ixódidos y las células de mamíferos requiere un estudio más detallado. En garrapatas, la digestión ocurre a una temperatura muy similar a la de los mamíferos y el crecimiento rápido de estas depende, es posible exclusivamente, de la digestión intracelular. La hembra aumenta de peso corporal de 2 a 40 mg en 6 d, un crecimiento comparable a parásitos que se alimentan de la misma dieta pero cuentan con procesos digestivos extracelulares que son más eficientes.<sup>29</sup>

Se ha sugerido según evidencias experimentales que las células digestivas son multifuncionales y que es posible que la digestión comience extracelularmente, con material secretado al lumen para mezclarse con la sangre. Células secretoras han sido descritas en el sistema digestivo de varias especies de garrapatas. Ningún producto de estas células ha sido identificado, ni su papel ha sido establecido en un proceso fisiológico.<sup>30</sup>

Los experimentos de alimentación artificial con capilares, realizados en el laboratorio del Instituto para el suministro de inhibidores de aspártico-proteinasa, demuestran que el método es factible para estudiar el efecto de sustancias que interfieran de forma selectiva con los procesos involucrados en la primera fase de digestión continua; en

dependencia de su transporte a través del epitelio intestinal, metabolismo y velocidad de destoxicación. Nuevos conocimientos que permitan profundizar en los mecanismos bioquímicos de la digestión de proteínas en ixódidos contribuirán al desarrollo de nuevos métodos de control.

## SUMMARY

The magnitude of tissue expression of aspartic proteinases at juvenile stages was analyzed in adult young *Boophilus microplus* ticks as well as the effect of one of the most widely used aspartic proteinase inhibitors (pepstatin A) on their development. The isolation and quantification of acid proteolytic activity was performed in samples of parasites with different stages of the digestive process where aspartic-proteinase activity was confirmed and a tendency to increased values of enzymatic activity per miligram of total weight was observed during the development of adults female ticks, with a lowering of this ratio just when they are full up. Adding pepstatin A to the ingesta at 14 and 70 mmol concentrations had no effect on the viability of young female ticks while they were kept *in vitro* for 24 h, so this rules out the immediate toxic effects of this compound. However, in those experiments where adult female ticks after receiving the various ingestas, are put together with sexually competent male ticks in isolators for 6-7 days, the viability showed different results ( $p < 0,01$ ) at a 70 mmol concentration. The effect on the development of young adult female ticks was slight, but it indicates that there might be a selective inhibitory action of pepstatin A on aspartic-dependent enzymes.

**Subject headings:** ASPARTIC ENDOPEPTIDASES/ isolation & purification; PEPSTATINS; TICK/growth & development; TICK INFESTATIONS; PROTEASE INHIBITORS.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Balashov YS. Blood sucking ticks (Ixodoidea)-vectors of disease of man and animals. *Misc Publ Entomol Soc Am* 1972;8:161-376.
- Willadsen P, Jongejan F. Immunology of the tick-hosts interaction and the control of ticks and tick-borne diseases. *Parasitol Today* 1999;15:258-62.
- O'Brien RL. Insecticides: action and metabolism. New York: Academic, 1967.
- Harrow ID, Gratton KA, Evans NA. Neurobiology of arthropod parasites. *Parasitology* 1991;102:559-69.
- Sauer JR, McSwain JL, Essenberg, RC. Cell membrane receptors and regulation of cell function in ticks and blood sucking insects. *Int J Parasitol* 1994;24:33-52.
- Diehl PA, Aeschlimann A, Obenchain FD. Tick reproduction: oogenesis and oviposition. En: Obenchain FD, Galun R, eds. *Physiology of ticks*. New York: Pergamon, 1982:277-350.
- Gradjean 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.
- Mc Kerrow JH. Parasite proteases. *Exp Parasitol* 1989;68:111-5.
- Schoofs L, Vellaert D, Vanden Broeck J, De Loof A. Peptides in the locust, *Locusta migratoria* and *Schistocerca gregaria*. *Peptides* 1997;18:145-156.
- McKerrow JH, Engel JC, Caffrey CR. Cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitic infections. *Bioorg Med Chem* 1999;7:639-44.
- Dilanni C, Petel H, Johnson TO, Guo T, Orłowski M, He ZM *et al*. Identification of potent inhibitors of Plasmodium falciparum plasmepsin II from an encoded startline combinatorial library. *Bioorg Med Chem Lett* 1998;8:2315-2320.
- Akov S. Blood digestion in ticks. En: Obenchain F, Galun R, eds. *Physiology of ticks*. Oxford: Pergamon, 1982:197-211.
- Vundla WRM, Brossard M, Pearson DL, Labongo VL. Characterization of aspartic proteinases from the gut of the tick *Rhipicephalus appendiculatus*. *Insect Biochem Mol Biol* 1992;22:405-10.
- Mendiola J, Alonso M, Marquetti MC, Finlay CM. *Boophilus microplus*: multiple proteolytic activities in the midgut. *Exp Parasitol* 1996;82:27-33.
- O'Hagan J. *Boophilus microplus*: digestion of hemoglobins by the engorged female tick. *Exp Parasitol* 1974;35:110-8.
- Coons LB, Rosell-Davies E, Tarnowsky BI. Bloodmeal digestion in ticks. En: Sauer JR, Hair JA, eds. *Morphology, physiology and behavioral biology of ticks*. Chichester: Ellis Horwood, 1986:248-71.
- Barrett AJ, Cathepsin D. Purification of isoenzymes from human and chicken liver. *Biochem J* 1970;117:601-7.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;113:265-75.
- Díaz GR, Vega R de la, Goenaga N. Papel de los diferentes órganos sensoriales del macho de *Boophilus microplus* en la detección de la hembra. *Rev Biol*. 1994;88-95-9.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-5.
- Panella NA, Karchesy J, Maupin GO, Malan JCS, Piesman J. Susceptibility of immature *Ixodes scapularis* to plant-derived acaricides. *J Med Entomol* 1997;34:340-5.
- Walker AB, Fletcher JD. Histology of digestion in nymphs of *Rhipicephalus appendiculatus* fed on rabbits and cattle naive and resistant to the ticks. *Int J Parasitol* 1987;17:1393-411.
- Tarnowski BI, Coons LB. Ultrastructure of the midgut and bloodmeal digestion in the adult tick *Dermacentor variabilis*. *Exp Appl Acarol* 1989;6:263-89.
- Kauffman WR. Tick-host interaction: a synthesis of current concepts. *Parasitol Today* 1989;5:47-55.
- Mendiola J. Caracterización preliminar de la actividad proteolítica en intestino, glándulas salivales y ovario de la

- garrapata *Boophilus microplus* [tesis de maestría]. Ciudad de La Habana; Universidad de La Habana:1999.
26. Fernández-Caliènes A, Mendiola J, Hernández H, Finlay C. Actividad semejante a catepsina L en la hemolinfa de hembras repletas de *Boophilus microplus*. Rev Cub Med Trop 1999;51(3):201-3.
  27. Fagotto F. Yolk degradation in tick eggs: III Developmentally regulated acidification of the yolk spheres. Dev Growth Differ 1991;33:57-66.
  28. Saliba KJ, Kirk K. Uptake of an antiplasmodial protease inhibitor into Plasmodium infected human erythrocytes via a parasite-induced pathway. Mol Biochem Parasitol 1998;94:297-301.
  29. Gough JM, Kemp DH. Acid phosphatase in midgut digestive cells in partially fed females of the cattle tick *Boophilus microplus*. J Parasitol 1995;81:341-9.
  30. Coons LB, Alberti G. The Acari-Ticks. En: Harrison FW, Foelix R, eds. Microscopy anatomy of invertebrates. Chelicerata Arthropoda. New York: Wiley-Liss, 1999;vol8B:267-514.
- Recibido: 5 de noviembre del 2000. Aprobado: 22 de abril del 2001.  
Lic. *Judith Mendiola*. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". Apartado 601, Marianao, Ciudad de La Habana, Cuba.  
Correo electrónico:judith@ipk.sld.cu