

EVALUACIÓN DE COMPUESTOS COMO INHIBIDORES DE LA TRIOSA FOSFATO ISOMERASA DE *Rhipicephalus microplus* Y SU LETALIDAD EN LARVAS

Saporiti T¹, Cabrera Gonzales N.E², Pérez Montfort, Losiewicz S³, R², Cuore U³, Álvarez G¹

1- Laboratorio de moléculas bioactivas, CENUR LN, Ruta 3 Km363, Paysandú, Uruguay.

2- Instituto de fisiología celular, UNAM, Circuito Exterior s/n Ciudad Universitaria, Coyoacán, 04510 México D.F, México.

3- Departamento de parasitología de la división de laboratorios veterinarios, MGAP, Ruta 8 km 17, Montevideo, Uruguay.

RESUMEN

La resistencia a los acaricidas ha dificultado el control de la garrapata *Rhipicephalus microplus*. Se presentan 6 compuestos, de 60 analizados, con capacidad inhibitoria de la triosa fosfato isomerasa de *R. microplus* de más del 50% a 100 μ M. Uno destaca por su IC₅₀ de 0,3 μ M, sin inhibir la triosa fosfato isomerasa humana y demostrar, mediante el test de inmersión de larvas, una mortalidad del 75% a 1 mM.

SUMMARY

Resistance to acaricides has turned tick *Rhipicephalus microplus* control more difficult. Out of 60 compounds analyzed, 6 showed an inhibition, of more than 50%, of the triosephosphate isomerase of *R. microplus* activity at 100 μ M. One of them highlights for its IC₅₀ of 0,3 μ M, with no inhibition of the human triosephosphate isomerase as well as showing a 75% of mortality at 1mM, by the larval immersion test.

INTRODUCCIÓN

La parasitosis por *Rhipicephalus microplus* es de gran importancia en Uruguay; su combate es reglamentado rigiendo la Ley 18.268 (2008). La resistencia a los acaricidas dificulta su control, agravándose con la aparición de poblaciones multiresistentes desde 2009 (Cuore *et al.* 2012). Hasta el momento no han surgido nuevos compuestos acaricidas. Existen moléculas con actividad inhibitoria de la triosafosfato isomerasa (TIM) (Saramago *et al.*, 2018); enzima importante en la glucólisis y gluconeogénesis de *R. microplus* (Moraes *et al.*, 2011). Se evaluaron 60 compuestos como potenciales inhibidores de la TIM de *R. microplus* (Rm TIM) iniciando la búsqueda de nuevos acaricidas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se seleccionaron 60 compuestos, según estructura e inhibición de la TIM de otros parásitos, para evaluar por duplicado su capacidad inhibitoria de la Rm TIM. Con el test de inmersión de larvas (TIL), utilizando la cepa susceptible Mozo, se analizó el de mayor actividad inhibitoria.

La Rm TIM se expresa en *Escherichia coli* recombinante y luego se incubó (2.5 μ g/ml) en amortiguador de trietanolamina (100 mM pH 7.4), EDTA (10 mM) con cada compuesto (100 y 10 μ M) por 2 hrs a 37 °C. Luego la actividad se determinó a 2.5 ng/ml a 25 °C. Se siguió la conversión de gliceraldehído 3 -fosfato a dihidroxiacetona fosfato, monitoreando la absorbancia (340 nm), y utilizando como enzima acoplante a la alfa-glicerolfosfato deshidrogenasa. El 100% de actividad fue determinada con la enzima incubada 2 hrs. Se realizó la curva dosis respuesta por triplicado, del compuesto DM 83 (mayor inhibición) y se evaluó con la TIM de humano (Hs TIM).

El TIL se basó en la técnica desarrollada por Shaw (1966) y modificada por Castro-Janer *et al.* (2012). Se diluyó el compuesto a 1 mM en un solvente de agua destilada con un 1% de una solución de Tritón X-100 al 2% en acetona. Se realizaron 2 réplicas y se evaluó el porcentaje de mortalidad promedio entre estas. El control positivo fue ivermectina 0,82mM (CastroJaner *et al.*, 2012) y el negativo consistió en el solvente descrito.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De 60 compuestos, 6 inhibieron a la Rm TIM en más de un 50% (tabla 1) y 29 en menos de

Tabla 1. Porcentaje de inhibición promedio de la Rm TIM a 100M

Compuesto	% Inhibición promedio
1378	77,8
910	77,1
1408	70,8
MAR 106	78,8
CUR 2	66,1
DM 83	98,2

un 50% (se sugiere evaluarlos a concentraciones superiores).

Se destaca el DM 83 por su mayor inhibición (98,2%). Su curva dosis respuesta (figura 1) arrojó una concentración de inhibición del 50% de 0,3 μ M.

No demostró inhibición de la actividad de la Hs TIM (0,2 – 0,5 μ M). Con el TIL demostró un porcentaje de mortalidad promedio del 75%. Esta diferencia entre los resultados con la enzima y en larvas puede deberse a la concentración que llegue realmente al parásito así como el impacto que puede tener la inhibición de esta enzima en la sobrevivencia de las larvas. Se deberían seguir estudiando los 6 compuestos resaltados ya que podrían ser potenciales acaricidas, principalmente el DM 83.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Castro-Janer E, Schumaker T.T.S, Klafke G.M, Rifran L, González P, Niell C, Namin-domo A, Gil A, Piaggio J, Martins J.R, Mendes M.C, Miller R.J. (2012). Garrapata: Resistencia a fipronil e ivermectina en rodeos vacunos de Uruguay y Brasil. Disponible en: <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/2830/1/18429230712114518.pdf> (verificado 08 de Noviembre de 2019).

Cuore U, Altuna M, Cicero L, Fernandez F, Luengo L, Mendoza R, Nari A, Perez Rama

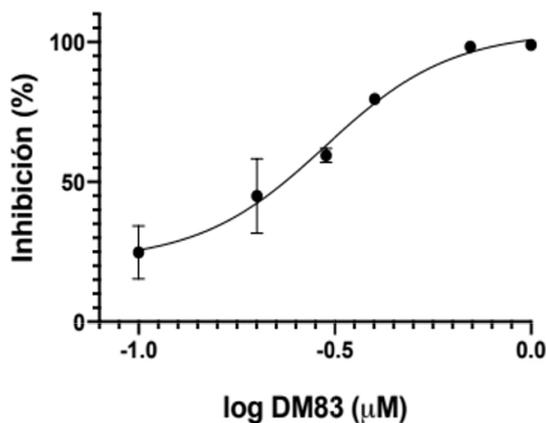


Figura 1. Curva dosis respuesta del DM 83

R, Solari M.A, Trelles A. (2012). Aplicación del tratamiento generacional de la garrapata en la erradicación de una población multiresistente de *Rhipicephalus microplus* en Uruguay. Veterinaria 48: 5-13.

Saramago L, Gomes H, Aguilera E, Cerecetto H, González M, Cabrera M, Alzugaray M.F, da Silva Vaz Jr. I, Nunes da Fonseca R, Aguirre-López B, Cabrera N, Pérez-Montfort R, Merlino A, Moraes J, y Álvarez G. (2018). Novel and Selective *Rhipicephalus microplus* Triosephosphate Isomerase Inhibitors with Acaricidal Activity. Vet. Sci. 5, 74.

Shaw R.D., (1966). Culture of an organophosphorus resistant strain of *B. microplus* and an assessment of its resistance spectrum. Bull. Ent. Res. 56: 389-406.

Moraes J, Arreola R, Cabrera N, Saramago L, Freitas D, Masuda A, da Silva Vaz Jr. I, Tuenade Gomez-Puyou M, Perez-Montfort R, Gomez-Puyou A, Logullo C. (2011). Structural and biochemical characterization of a recombinant triosephosphate isomerase from *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Insect Biochemistry and Molecular Biology 41: 400-409.