

# Abordaje integrado para el control de la garrapata del ganado

Tatiana Saporiti<sup>1</sup>, Mauricio Cabrera<sup>1</sup>, Yemina Correa<sup>1</sup>, Giuliana Biccó<sup>1</sup>, Lía Randall<sup>1</sup>, Ileana Corvo<sup>1</sup>, Lucía Pareja<sup>2</sup>, Inez Téllez<sup>2</sup>, Guzmán Alvarez<sup>1</sup>

1 Laboratorio de Moléculas Bioactivas, Dpto. de Ciencias Biológicas, CENUR Litoral Norte, Universidad de la República, Ruta 3 Km 363, 60000 Paysandú, Uruguay.

2 Departamento de Química del Litoral, CENUR Litoral Norte, Universidad de la República, Ruta 3 Km 363, 60000 Paysandú, Uruguay.

## RESUMEN

La ocurrencia de *Rhipicephalus microplus*, “garrapata común del ganado”, representa la ectoparasitosis más importante de la ganadería a nivel mundial debido a los problemas sanitarios y pérdidas económicas que produce. Estas pérdidas en Uruguay ascienden alrededor de 46 millones de dólares anuales. Actualmente existe resistencia del ectoparásito a la mayoría de los acaricidas de uso comercial, por lo que se encuentra dentro de los nueve problemas más importantes que afectan la producción ganadera del país. El problema es complejo y no tiene caminos de resolución lineales debido a los múltiples factores que lo condicionan. Con el objetivo generar herramientas para controlar la infección por este ectoparásito en este trabajo se abordó el tema desde múltiples enfoques: 1) Desde la búsqueda y desarrollo de nuevos acaricidas; 2) Caracterización de la resistencia a nivel de establecimiento y a nivel molecular; 3) Monitoreo de acaricidas en el ambiente. Para la búsqueda de nuevos acaricidas se utilizó dos blancos moleculares de la garrapata, la glutatión S transferasa y la triosa fosfato isomerasa. Para la primera se ensayaron 160 moléculas *in vitro* y se encontró que algunas que inhibían la enzima también afectaron la viabilidad de larvas de la garrapata. Asimismo, con la triosafosfato isomerasa se ensayaron 498 moléculas de nuestra colección y se encontró un potente inhibidor que también afectó la viabilidad de larvas y adultas de *Rhipicephalus microplus*. Utilizando cultivos de células de la garrapata se ensayaron también compuestos sintéticos y extractos de plantas que también mostraron actividad acaricida *in vitro*. Para la caracterización de resistencia se desarrollaron diferentes métodos, bioensayos, PCR y resonancia magnética nuclear. Estos se combinaron para estudiar la resistencia de muestras de garrapatas colectadas del norte del Rio Negro, donde la mayoría de las muestras fueron multiresistentes. Además, se puso a punto la técnica de detección por HPLC

acoplado a espectrometría de masas, para detectar en muestras de suelo, más de 15 acaricidas y sus metabolitos en el ambiente.

## SUMMARY

The occurrence of *Rhipicephalus microplus*, the “common cattle tick”, represents the most important parasitism of livestock worldwide due to the health problems and economic losses that it produces. These losses in Uruguay are estimated in 46 million dollars annually. Currently, there is resistance of this ectoparasite to the acaricides of commercial use, which is why it is one of the most important problems that affect livestock production in the country. The problem is complex and does not have linear resolutions due to the multiple factors that are conditioning it. For controlling the infection by this ectoparasite, this work addressed the issue from multiple approaches: 1) From the research and development of new acaricides; 2) Characterization of resistance at farm and molecular level; 3) Monitoring of acaricides in the environment. For the discovery of new acaricides, two molecular targets from tick were used: glutathione S transferase and triose phosphate isomerase. For the first one, hundreds of molecules were tested *in vitro* and it was found that some which inhibited the enzyme also affected tick larvae viability. Likewise, with triosephosphate isomerase, five hundred molecules from our collection were tested and a potent inhibitor was found that also affected the viability of larvae and adults. Using tick cell cultures, synthetic compounds and plant extracts were also tested, which showed acaricidal activity *in vitro*. For the characterization of resistance, different methods were used, bioassays, PCR, and nuclear magnetic resonance. These were combined to study the resistance of isolates from the north of the Rio Negro river, where most of the samples were multiresistant. In addition, the HPLC detection technique coupled with mass spectrometry was developed to detect more than 15 acaricides and their metabolites in the en-

vironment.

## INTRODUCCIÓN

La garrapata es una de las principales parasitosis que afecta a los bovinos produciendo pérdidas económicas para nuestro país de U\$S 46 millones anuales. De los seis grupos químicos que se utilizan actualmente en la campaña sanitaria (organofosforados, piretroides sintéticos, amidinas, fenil pirazoles, lactonas macrocíclicas y benzoil fenilureas), solamente las benzoil fenilureas no cuentan con un diagnóstico oficial de resistencia en nuestro país. Además, desde el año 2014 se han reportado cepas multi-resistentes a varios garrapaticidas lo que compromete el correcto control. Se pueden identificar tres problemas principales; La falta de desarrollo de nuevos acaricidas, el uso desmedido o inadecuado de los acaricidas existentes llevando a la acumulación y contaminación del ambiente y la generación de resistencia. Por último, la falta de metodologías de diagnóstico rápidos de resistencia. El estatus actual de resistencia a los acaricidas hace necesaria la búsqueda de nuevas herramientas de control. Conocer el perfil de resistencia de las garrapatas circulantes en tiempos cortos, determina la correcta toma de decisión y el correcto uso de las herramientas de control. En la actualidad los bioensayos son el único método usado para el diagnóstico de la resistencia, estos demoran más de 30 días. El uso de la resonancia magnética nuclear (RMN) para el diagnóstico de resistencia permitiría tener el resultado en menos de una semana.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para el ensayo con blancos aliados, se expresaron y purificaron la triosa fosfato isomerasa y la glutatión S transferasa recombinantes de *R. microplus*. Para el estudio fenotípico se utilizaron células embrionarias de *R. microplus* (BME26). Para el estudio de actividad acaricida se utilizaron los bioensayos clásicos de inmersión de larvas y adultas. Las 500 moléculas utilizadas, pertenecen a la colección del Laboratorio de Moléculas Bioactivas (CENUR Litoral Norte). Para el estudio de la resistencia; se realizaron extracciones de los metabolitos en una mezcla agua cloroformo (1/1) de garrapatas susceptibles y resistentes, en diferentes estadios, se realizaron los espectros de RMN de protón de la fase acuosa. Con los espectros obtenidos se realizaron los análisis comparativos de múltiples variables de los metabolitos diferenciales y se compararon los diferentes perfiles de susceptibilidad a los acaricidas. Para la caracterización genética se buscaron los alelos de resistencia a piretroides sintéticos, a

fipronil y a amitraz, en garrapatas adultas y huevos de 25 establecimientos del Norte del Río Negro. La concentración de acaricidas en suelo (de establecimientos seleccionados con diferente perfil de resistencia) se determinó mediante HPLC-MS/MS, las curvas de calibración en el rango de 5 a 1000ppb ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) se establecieron usando mínimos cuadrados análisis de regresión lineal y coeficientes de correlación ( $r = 0,99$ ).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Los ensayos de cribado en la glutatión S transferasa mostraron que 30 compuestos de un total de 160 probados afecta la actividad de la enzima. Los inhibidores fueron los compuestos 794 ( $\text{IC}_{50}$  de  $7,0 \pm 1,1 \mu\text{M}$ ), 795 ( $18 \pm 6 \mu\text{M}$ ), 798 ( $50 \pm 5 \mu\text{M}$ ) y 1258 con un  $\text{IC}_{50}$  de  $9,0 \pm 0,3 \mu\text{M}$ . Los compuestos 906 y 1258 mataron el 100 % de larvas y adultos *R. microplus*, mientras que el compuesto 794 solo mató las larvas. El cribado en la triosa fosfato isomerasa se hizo a  $10 \mu\text{M}$  o  $100 \mu\text{M}$  con 100 compuestos. Los compuestos 910, 1367, 1404, 799, 1387, 1385, 1386, 879, Mar105, Mar106 y DM83 exhibieron una inhibición considerable de la actividad, con valores de  $\text{IC}_{50}$  entre  $0,3$  y  $25 \mu\text{M}$ . También es importante señalar que la enzima análoga en humanos HsTIM no fue inhibida por estos compuestos a  $10 \mu\text{M}$ , lo que sugiere una inhibición específica. 44 extractos de 10 especies diferentes de plantas de la zona sureste de México y 34 compuestos de nuestra colección química se ensayaron en células embrionarias (línea BME26) de *R. microplus* susceptible, a una concentración de  $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ . Los valores de  $\text{IC}_{50}$  fueron: compuesto 906:  $24 \pm 3 \mu\text{M}$ , compuesto 885:  $17 \pm 4 \mu\text{M}$ , compuesto 1253:  $12 \pm 1 \mu\text{M}$ , compuesto 795:  $20 \pm 3 \mu\text{M}$ , compuesto 796:  $15 \pm 3 \mu\text{M}$ .

Con respecto al estudio de la resistencia al norte de Río Negro la mayoría de las muestras procedieron del departamento de Artigas (también de Salto, Paysandú y Tacuarembó), y todas estas dieron multirresistencia tanto en los bioensayos como en los marcadores moleculares (piretroides sintéticos, fipronil y amitraz). Integralmente este trabajo proporciona una visión amplia de los principales condicionantes del control de la expansión de la garrapata del ganado. Los datos de campo recabados a lo largo de este trabajo hacen pensar que las garrapatas con genes de resistencia llegan en gran medida desde Brasil pudiendo haber incluso diferencias con la cepa Mozo. Para confirmar esto es necesario realizar un mapeo poblacional, comparativo de poblaciones de Uruguay y de los espacios fronterizos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1) Tatiana Saporiti, Mauricio Cabrera, Josefina Bentancur, María Elisa Ferrari, Nallely Cabrera, Ruy Perez-Montfort, Francisco J. Aguirre-Crespo, Jorge Gil, Ulises Cuore, Dimitris Matiadis, Marina Sagnou, Guzmán Alvarez. Phenotypic and target-directed screening yields new acaricidal alternatives for the control of ticks. *Molecules*, 2022, 27(24), 8863; <https://doi.org/10.3390/molecules27248863>

2) Katiussa Paula Cover Ozelame; Marília Meneghel Colla Mattiaa, Lucas André Dedavid Silva; Lía M. Randall, Ileana Corvo, Tatiana Saporiti, Adriana Seixas, Itabajara da Silva Vaz Jr \*, Guzmán Alvarez\* Novel tick glutathione transferase inhibitors as promising acaricidal

compounds.; *Ticks and Tick-borne Diseases*, 2022 May 23;13(5):101970. doi: 10.1016/j.ttbdis.2022.101970.

3) Saramago L, Gomes H, Alguilera E, Cerecetto H, González M, Cabrera M, Alzugaray MF, da Silva Vaz Junior I, Aguirre-López B, Cabrera N, Pérez-Montfort R, Merlino A, Moraes J\*, Alvarez G\*, Novel and Selective Rhipicephalus microplus Triosephosphate Isomerase Inhibitors with Acaricidal Activity *Vet. Sci.* 2018, 5(3), 74; <https://doi.org/10.3390/vetsci5030074>