

## ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LAS SECUENCIAS ANÁLOGAS DEL RECEPTOR DE OCTOPAMINA EN UNA CEPA DE GARRAPATA *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (ACARI: IXODIDAE) RESISTENTE AL AMITRAZ

Marisol Karina Rocha Martínez<sup>1</sup>, Estefan Miranda-Miranda<sup>1</sup>, José Javier Pérez de la Rosa<sup>2</sup>, Manuel Fernández Ruvalcaba<sup>2</sup>, Raquel Cossio-Bayugar<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria INIFAP Carr. Fed. Cuernavaca-Cuautla No. 8534, Jiutepec Morelos 62550. burbuja\_0522@hotmail.com, miranda.estefhan@inifap.gob.mx, fernandez.manuel@inifap.gob.mx, cossio.raquel@inifap.gob.mx, <sup>2</sup>Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal, SENASICA-SAGARPA. Boulevard Cuauhnáhuac No 8534 Col. Progreso. C.P. 62550. Jiutepec, Morelos México. perezdelarosa\_24@hotmail.com

**RESUMEN:** Se considera que el receptor de octopamina es el blanco del pesticida amitraz, y cambios mutacionales en la secuencia de aminoácidos de este receptor podrían originar resistencia a este acaricida en la garrapata del ganado *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). Durante este trabajo, se aisló una secuencia análoga del receptor de octopamina a partir de cepas de referencia mexicanas susceptibles y resistentes al amitraz la cual fue clonada y secuenciada. Se encontró que la cepa resistente al amitraz presentaba dos alelos, uno igual al encontrado en la cepa susceptible y otra presentaba diferencias que correspondía a cinco cambios en la secuencia de aminoácidos con respecto a la cepa susceptible. Adicionalmente se hizo un alineamiento con las secuencias reportadas de Australia y Brasil, y se encontró que los cambios de aminoácidos de la cepa mexicana resistente al amitraz son exclusivos de esta cepa.

Palabras clave: Amitraz, garrapata del ganado, resistencia, receptor de octopamina.

### Sequence bioinformatic analysis from a putative octopamine receptor from a Amitraz resistant *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) tick strain

**ABSTRACT:** The molecular target of the acaricide amitraz is considered to be the octopamine receptor (OAR). Changes in the OAR sequence gene could be responsible of the cattle ticks becoming resistant to amitraz. A putative octopamine receptor was cloned and sequenced from a susceptible and an amitraz resistant Mexican reference strains. Two alleles were found in the resistant strain, one was identical to the sequence from the susceptible strain, and the other had differences that correspond to five aminoacids substitutions that differ from the susceptible strain. A multiple sequence alignment with the reported sequences from the OAR gene from Australia and Brazil strains finding that the five aminoacids substitutions found in one allele were exclusive of the amitraz Mexican resistant strain.

Key words: Amitraz, cattle tick, resistance, octopamine receptor.

### Introducción

Una de las principales limitantes en el desarrollo de la industria ganadera bovina en México y gran parte del mundo es la endemidad de garrapata del ganado *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Li *et al.*, 2007). El control de *R. microplus* y de las enfermedades transmitidas por éste, se ha basado principalmente en el tratamiento del ganado con agentes acaricidas químicos de forma preventiva en áreas endémicas. Sin embargo el uso intensivo de acaricidas ha generado resistencia creciente de *R. microplus* a la acción de estos compuestos químicos (Cossio-Bayugar *et al.*, 2008, Guerrero *et al.*, 2014). El amitraz es un garrapaticida utilizado como alternativa a la aparición de resistencia a las formulaciones con organofosforados y piretroides, el cual han generado alta resistencia en las garrapatas (Soberanes *et al.*, 2002; Kunz y Kemp, 1994). No se conoce el mecanismo de resistencia al amitraz y se considera que la molécula blanco es el receptor de octopamina (Chen *et al.*, 2007), se ha observado que las moléculas del amitraz tienen una mayor afinidad hacia los receptores de octopamina

en el sistema nervioso central de los insectos que la propia octopamina ligando natural (Roeder, 1995). En el 1999 Baxter y Barker publicaron la clonación de un gen de octopamina, y secuenciaron este gen aislado de garrapatas australianas susceptibles y resistentes al amitraz, no encontrando diferencias en la secuencia de este gen entre las diferentes cepas. Chen *et al.*, en el 2007 reportaron el análisis de la secuencia de este gen de una cepa australiana resistente al amitraz denominada Sta Luiza y una cepa de referencia susceptible a los acaricidas, cuando analizaron las secuencias encontraron que la cepa Sta Luiza presentaba 2 aminoácidos diferentes a la cepa susceptible y la cepas australianas. Con la intención de conocer si en la cepa de garrapata mexicana de referencia con resistencia a amitraz se encontraban los mismo cambios reportados en la cepa Sta Luiza o si tenía diferencias en la secuencia con respecto a la cepa susceptible, se analizaron las secuencia del gen supuesto receptor de octopamina de una cepa de referencia susceptible diferente a la previamente analizada y una cepa con resistencia a amitraz.

## Material y Método

Se utilizó una cepa de garrapatas *R. microplus* de referencia susceptible a acaricidas comerciales (cepa Media Joya) y una cepa de referencia que presenta triple resistencia a organofosforados piretroides y amitraz (cepa San Alfonso); las garrapatas fueron mantenidas y cultivadas sobre bovinos en el Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria (CENID-PAVET) en Jiutepec, Morelos, México como se describió previamente (Cossio-Bayugar *et al.*, 2009).

Se purificó el ARN total de larvas de 15 días de la cepa “Media Joya” susceptible a acaricidas y de la cepa “San Alfonso”, el ARN se purificó de acuerdo a las instrucciones del kit RNAqueos® 4-PCR, (Ambion®, Texas, Estados Unidos). El ARNm se transcribió a ADNc utilizando el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems®, Estados Unidos) de acuerdo al protocolo del fabricante.

A partir de este ADNc se hizo un PCR utilizando iniciadores para amplificar el gen de octopamina utilizando 15pMolas de los iniciadores OAR F171 (GGTTCACCCAACCTCATCTCTGAA) y OAR R1195 (CAAGAACGTCACCCGTCGTC) para obtener un fragmento de 1024 bp y OAR F1065 (ATCTTTCTGCCAACCCGACG) con OAR 1684 (GAAGAGCTGTCGCTGTGATGC) para obtener un fragmento de 617bp (Chen *et al.*, 2007). Utilizando GoTaq® Hot Start Colorless Master Mix (Promega®, Estados Unidos) (Buffer de reacción pH8.5, 200uM de cada nucleótido y 2 mM MgCl<sub>2</sub>). Las condiciones del PCR utilizadas fue una modificación del protocolo reportado que consistió en 94°C 3 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 72°C por 50 segundos, 68°C por 1 minuto y una extensión a 72°C por 10 minutos. Los amplicones obtenidos fueron clonados en un plásmido comercial pGEM®-T Easy Vector System I, (Promega®, Estados Unidos) siguiendo las indicaciones del fabricante y purificados mediante un paquete comercial utilizando el sistema de purificación Wizard® Plus SV Minipreps DNA (Promega®, Estados Unidos). Se enviaron a secuenciar 11 clonas con inserto de cada cepa al Instituto de Biotecnología de la UNAM. Se hizo la comparación de la secuencias obtenidas del gen de octopamina con aquellas ya reportadas (GeneBank accession Nos. AJ010743 (cepa australiana), EF490687 (cepa Gonzalez), EF490688 (cepa Santa Luiza) mediante los algoritmos Blast <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) Clustal Omega disponible en línea en: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>

**Resultados**

Al analizar las 11 secuencias obtenidas se observó que las secuencias de la cepa resistente San Alfonso presentaban 2 variantes; 5 de las cuales correspondían a un alelo que se denominó alelo OAR\_SA\_1\_MEX y 6 a otro alelo denominado OAR\_SA\_2\_MEX, la primera variante correspondía a la secuencia encontrada en la cepas susceptible, la segunda variante difiere de la cepa susceptible en 6 nucleótidos, de los cuales, 5 se encontraron en el marco abierto de lectura y estas diferencias correspondían a cambios a nivel de aminoácidos (Fig. 1). El aa 82 cambia de V por A, el aa 164 cambia de N por S, el aa 103 cambia de F por S, el aa 111 cambia L por Q y el aa 205 cambia D por S.

Al alinear las secuencias de aminoácidos con las secuencias ya reportadas se observó que las cinco diferencias encontradas en el alelo OAR\_SA\_2\_MEX con respecto al alelo susceptible y al alelo OAR\_SA\_1\_MEX, son exclusivos de la cepa San Alfonso ya que ninguna de las otras secuencias reportadas presenta estos cambios. La cepa australiana presenta 7 diferencias que son exclusivas de esta cepa con respecto a las cepas americanas, y la cepa Santa Luiza presenta 2 cambios de aminoácidos exclusivos de esta cepa que no comparte con la otra cepa con resistencia a amitraz (Fig. 2).



Figura 1. Alineamientos de la secuencia de aminoácidos del análogo del receptor de octopamina de cepas mexicanas de la garrapata *Rhipicephalus microplus*. OAR\_SA\_1\_MEX y OAR\_SA\_2\_MEX alelos encontrados en la cepa mexicana resistente al amitraz y OAR\_SUS\_MEXICO alelo encontrado en la cepa susceptible a pesticidas. Los cambios en aminoácidos se muestran en un recuadro gris.

## Discusión y Conclusiones

Para tener un manejo adecuado de las garrapatas es importante entender como desarrollan la resistencia a los pesticidas utilizados para su control y tener así mejores bases para mejorar los sistemas diagnósticos o establecer estrategias de control integral.

```

gi|3717949_Australia      MVRPHTRTMEEDGGILWTTTPLPSVTVISEAVNTSSFEMDDVVEAYPSGIAMSVQEA VGT
OAR_SA_2_MEX             MVRPHTRTMEEDGGVLTWTTAPLPSVTVISEAVNTSSFEMDDVVEAYPSGIAMSVQEA VGT
gi|152001705_StaLuiza    MVRPHTRTMEEDGGVLTWTTAPLPSVTVISEAVNTSSFEMDDVVEAYPSGIAMSVQEA VGT
gi|152001703_Gonzalez    MVRPHTRTMEEDGGVLTWTTAPLPSVTVISEAVNTSSFEMDDVVEAYPSGIAMSVQEA VGT
OAR_SUS_MEXICO           MVRPHTRTMEEDGGVLTWTTAPLPSVTVISEAVNTSSFEMDDVVEAYPSGIAMSVQEA VGT
OAR_SA_1_MEX             *****:****:* *****

gi|3717949_Australia      ALSLSFITVFTVVGNVLVICSVFNHRPLRTVQNVFLVSLALADIAVALLVMPFNVAYSIM
OAR_SA_2_MEX             ALSLSFITVFTVVGNVLVICSAFNHRPLRTVQNVFLVSLALADIAVALLVMPFNVAYSIM
gi|152001705_StaLuiza    ALSLSFITVFTVVGNVLVICSVFNHRPLRTVQNVFLVSLALADIAVALLVMPFNVAYSIM
gi|152001703_Gonzalez    ALSLSFITVFTVVGNVLVICSVFNHRPLRTVQNVFLVSLALADIAVALLVMPFNVAYSIM
OAR_SUS_MEXICO           ALSLSFITVFTVVGNVLVICSVFNHRPLRTVQNVFLVSLALADIAVALLVMPFNVAYSIM
OAR_SA_1_MEX             *****

gi|3717949_Australia      GRWVFGHLHFCEWLWTCVLCCTASILNLCAIALDRYWAIHDPINYAQKRTLRRVLLSIFL
OAR_SA_2_MEX             GRWVFGHLHFCEWLWTCVLCCTASILNLCAIALDRYWAIHDPINYAQKRTLRRVLLSIFL
gi|152001705_StaLuiza    GRWVFGHLHFCEWLWTCVLCCTASILNLCAIALDRYWAIHDPINYAQKRTLRRVLLSIFL
gi|152001703_Gonzalez    GRWVFGHLHFCEWLWTCVLCCTASILNLCAIALDRYWAIHDPINYAQKRTLRRVLLSIFL
OAR_SUS_MEXICO           GRWVFGHLHFCEWLWTCVLCCTASILNLCAIALDRYWAIHDPINYAQKRTLRRVLLSIFL
OAR_SA_1_MEX             *****

gi|3717949_Australia      VVVISALISVPLIGWNDWPEQFDEETPCRLTQETGYVLYSAGSFFIPLLIMSIVYLKI
OAR_SA_2_MEX             VVVISALISVPLIGWNDWPEQFDEETPCRLTQETGYVLYSAGSFFIPLLIMSIVYLKI
gi|152001705_StaLuiza    VVVISALISVPLIGWNDWPEQFDEETPCRLTQETGYVLYSAGSFFIPLLIMSIVYLKI
gi|152001703_Gonzalez    VVVISALISVPLIGWNDWPEQFDEETPCRLTQETGYVLYSAGSFFIPLLIMSIVYLKI
OAR_SUS_MEXICO           VVVISALISVPLIGWNDWPEQFDEETPCRLTQETGYVLYSAGSFFIPLLIMSIVYLKI
OAR_SA_1_MEX             *****

gi|3717949_Australia      FLATRRRLRERANAAAKVPSSATRCAATVEHSVALLQERHPSSEETPPPQHRDQTTENR
OAR_SA_2_MEX             FLATRRRLRERANAAAKVPSSATRCAATVEPSAALLQERHPSSEETPPPQHRDQTTENR
gi|152001705_StaLuiza    FLATRRRLRERANAAAKVPSSATRCAATVEPSAALLQERHPSSEETPPPQHRDQTTENR
gi|152001703_Gonzalez    FLATRRRLRERANAAAKVPSSATRCAATVEPSAALLQERHPSSEETPPPQHRDQTTENR
OAR_SUS_MEXICO           FLATRRRLRERANAAAKVPSSATRCAATVEPSAALLQERHPSSEETPPPQHRDQTTENR
OAR_SA_1_MEX             *****

gi|3717949_Australia      PSLADTSVTLQNGRPPSVKVFTCWEERQRISLSRERRAARVLGIVMGVFVLCWLPFFIM
OAR_SA_2_MEX             PSLADTSVTLQNGRPPSVKVFTCWEERQRISLSRERRAARVLGIVMGVFVLCWLPFFIM
gi|152001705_StaLuiza    PSLADTSVTLQNGRPPSVKVFTCWEERQRISLSRERRAARVLGIVMGVFVLCWLPFFIM
gi|152001703_Gonzalez    PSLADTSVTLQNGRPPSVKVFTCWEERQRISLSRERRAARVLGIVMGVFVLCWLPFFIM
OAR_SUS_MEXICO           PSLADTSVTLQNGRPPSVKVFTCWEERQRISLSRERRAARVLGIVMGVFVLCWLPFFIM
OAR_SA_1_MEX             *****

gi|3717949_Australia      YVTAAFCDHCQSDRLVNFITWLGYNVNSALNPVIYTVFNTDFRRAFRLSLLCSGHRRTHL
OAR_SA_2_MEX             YVTAAFCDHCQSDRLVNFITWLGYNVNSALNPVIYTVFNTDFRRAFRLSLLCSGHRRTHL
gi|152001705_StaLuiza    YVTAAFCDHCQSDRLVNFITWLGYNVNSALNPVIYTVFNTDFRRAFRLSLLCSGHRRTHL
gi|152001703_Gonzalez    YVTAAFCDHCQSDRLVNFITWLGYNVNSALNPVIYTVFNTDFRRAFRLSLLCSGHRRTHL
OAR_SUS_MEXICO           YVTAAFCDHCQSDRLVNFITWLGYNVNSALNPVIYTVFNTDFRRAFRLSLLCSGHRRTHL
OAR_SA_1_MEX             YVTAAFCDHCQSDRLVNFITWLGYNVNSALNPVIYTVFNTDFRRAFRLSLLCSGHRRTHL
    
```

Figura 2. Alineamientos de la secuencia de aminoácidos del supuesto receptor de octopamina de cepas mexicanas, australianas y brasileñas de la garrapata *Rhipicephalus microplus*. OAR\_SA\_1\_MEX y OAR\_SA\_2\_MEX alelos encontrados en la cepa mexicana resistente al amitraz y OAR\_SUS\_MEXICO alelo encontrado en la cepa susceptible a pesticidas. gi|152001703\_Gonzalez, cepa Gonzales susceptible a pesticidas. gi|152001705\_StaLuiza cepa brasileña resistente al amitraz. gi|3717949\_Australia cepa australiana. Cambios en aminoácidos (aa) de la cepa mexicana resistente se

muestran subrayados. Cambios de aa exclusivos de la cepa australiana se muestra con reCuadro gris claro y cambios de aa la cepa resistente brasileña se muestra con reCuadro gris oscuro.

La resistencia hacia los acaricidas en la garrapata del ganado puede involucrar las proteínas expresadas por uno o varios genes trabajando de manera simultánea, algunas de estas proteínas inducen la alteración de la molécula blanco del pesticida reduciendo la toxicidad (Bull y Ahrens, 1988), otras proteínas incrementan la capacidad de detoxificación metabólica modificando enzimáticamente la estructura química del pesticida alterando de esta manera su efecto (Penilla *et al.*, 2007). En el caso de amitraz se desconoce cuál es el mecanismo de resistencia de las garrapatas para contrarrestan este pesticida; Li *et al.* (2004) sugiere que un metabolismo incrementado es responsable de la resistencia al amitraz. Baxter y Barker (1999) analizaron las secuencias de un supuesto receptor de octopamina que se cree que es el blanco del amitraz en diferentes cepas de garrapatas australianas, pero en este trabajo no se encontraron diferencias en las secuencias de OAR en diferentes garrapatas. Al analizar esta misma secuencia del receptor de octopamina Chen *et al.* (2007) identificaron dos cambios a nivel de aminoácidos en una cepa brasileña que presentaba resistencia al amitraz. Nosotros en este trabajo encontramos dos alelos diferentes en la cepa resistente al amitraz, un alelo igual a la cepa susceptible y el otro exclusivos de la cepa con resistencia al amitraz. No se encontró que coincidieran los cambios en aminoácidos reportados en la cepa brasileña con los cambios encontrados en la cepa mexicana con resistencia al amitraz (Figura 1 y 2). Faltan más estudios para determinar si estas diferencias en la secuencia de aminoácidos de la molécula blanco del amitraz alteran su afinidad por este resultando resistencia al amitraz

### Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por el donativo SEP-CONACyT No.103026.

### Literatura Citada

- Baxter, G. D. y S. C. Barker. 1999. Isolation of a cDNA for an octopamina-like, G protein coupled receptor from the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 29, 461-467.
- Bull D.L. y E.H. Ahrens. 1988. Metabolism of coumaphos in susceptible and resistant strains of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*, 25(2): 94-98.
- Chen, A. C., He, H. y R. B. Davey. 2007. Mutations in a putative octopamina receptor gene in amitraz-resistant cattle ticks. *Veterinary parasitology*, 148, 379-383.
- Cossio-Bayúgar, R., Miranda-Miranda E., Ortiz-Nájera A., Neri-Orantes S., y F. Olvera. 2008. Cytochrome P-450 monooxygenase gene expression supports multifactorial origin for acaricide resistance in *Rhipicephalus microplus*. *Research Journal of Parasitology*, 3 (2):59-66.
- Cossío-Bayúgar, R., Miranda-Miranda, E., Portilla-Salgado, D. y J. Osorio-Miranda. 2009. Quantitative PCR detection of cholinesterase and carboxylesterase expression levels in acaricide resistant *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Journal of Entomology*, 6(2): 117-123.
- Guerrero, F. D., Perez de León A. A., Rodriguez-Vivas, R. I., Johnsson, N., Miller, R J., y R. Andreotti. 2014 Acaricide research and development. Resistance and resistance monitoring. En Sonenshine D.E. y R. M. Roe (Eds.): *Biology of ticks Vol. II*. 2<sup>nd</sup> Ed. Oxford University Press, New York pp. 353-381.
- Kunz, E. S. y H. D. Kemp. 1994. Insecticides and acaricides; Resistance and environmental impact. *Rev Sci Tech Off Int Epiz*, 13, 1249-1286.

- Li, A. T., Chen, A. C., Miller R. J. Davey, R. B. y J. E. George. 2007. Acaricide resistance and synergism between permethrin and amitraz against susceptible and resistant strains of *Boophilus microplus*. (Acari: Ixodidae). *Pest Management Science*, 63:882-889.
- Penilla, P. R., Rodriguez, A. D., Hemingway, J., Trejo, A., Lopez, A. D. y M. H. Rodriguez 2007. Cytochrome P450-based resistance mechanism and pyrethroid resistance in field *Anopheles albimanus* resistance management trial. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 89: 111-117.
- Roeder, T., 1995. Pharmacology of the octopamine receptor from locust central nervous tissue (OAR3). *British Journal of Pharmacology*, 114, 210-216.
- Soberanes N. C., Santamaría, M. V., Fragoso, H. S. y Z.V. García. 2002. Primer caso de resistencia al Amitraz en la garrapata del ganado *Boophilus microplus* en México. *Técnica Pecuaria en Mexico*, 40(1): 81-92.