

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECONIA



**ACTIVIDAD SIMILAR DE LAS PROSTAGLANDINAS EN
ILEON DE COBAYO CON EXTRACTOS DE LARVAS
Boophilus microplus (CEPA MORELOS)**

Y { P] P
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A

GABRIEL ALFREDO CARRANZA DE MENDOZA

ASESORES:

**M.V.Z. ANTONIO GONZALEZ ORIGEL
M.V.Z. HECTOR SUMANO LOPEZ**

MEXICO, D. F.

1980



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

I. Resumen.....	Pág. 2
II. Introducción....	3
III. Material y Métodos	9
IV. Resultados.....	13
V. Discusión	21
VI. Conclusiones....	24
VII. Bibliografía....	25

RESUMEN.

Con el objeto de determinar la presencia de sustancias con actividad, en el ileon de cobayo, similar a las prostaglandinas (PGS) en larvas de garrapata (Scophilus microplus) (cepa Morelos) se llevó a cabo el siguiente trabajo. Estas larvas no habían tenido contacto previo con huéspedes, para evitar así la confusión en el origen de las PGS.

El trabajo fue realizado en las instalaciones y con la ayuda del Departamento de Patología del Centro Nacional de Parasitología Animal del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia y del Instituto Nacional de la Nutrición.

Se obtuvo un extracto de las larvas. Su actividad fue determinada por bioensayo en ileon de cobayo. Se realizó también un estudio de cromatografía en capa fina.

Los resultados del bioensayo mostraron la actividad contráctil del extracto de una manera netamente cualitativa. La cromatografía reveló la presencia de una sustancia con características migratorias similares a las de la Prostaglandina E₂.

INTRODUCCION.

Las garrapatas son ixódidos parásitos cuyos huéspedes potenciales son todos los vertebrados. Las de más trascendencia desde el punto de vista de la economía pecuaria son el Género Boophilus, tanto la especie annulatus como la microplus y algunas especies del Género Amblyomma (7).

La importancia de las pérdidas económicas que ocasiona este ectoparásito, radica en la deficiente ganancia de peso del animal parasitado, la reducción de la producción láctea, así como en el número de muertes provocadas directa o indirectamente por este agente. Además, estas pérdidas económicas se ven agravadas por los gastos requeridos en el aumento de la mano de obra, acariciadas, etc. (15).

Boophilus microplus y Boophilus annulatus son dos ácaros-hematófagos del ganado; sus secreciones salivales desempeñan un papel muy importante en el proceso de su alimentación (11). Una característica de la saliva de B. microplus, en la que difiere de otros géneros de garrapata, es que no contiene anticoagulante (16). En estudios sobre la composición de la saliva de B. microplus se han encontrado esterases y enzimas líticas de carbohidratos (6). Además, existe una sustancia similar a la que produce la reacción lenta de la anafilaxis (12), posiblemente histamina y bajos niveles de contenido proteico -

(16). También se ha detectado la presencia de prostaglandinas en la saliva de garrepas adultas B. microplus (3, 9), así como en homogeneizados de larvas (9).

Las prostaglandinas (PGS), especialmente las de las series "E" y "F", por ser autacoides necesarios en diversos procesos biológicos, representan un nuevo enfoque para el entendimiento de la patogenia de esta parasitosis (8). Las prostaglandinas de la serie "E" (PGE) identificadas en la saliva de B. microplus (9), así como en los tejidos del huésped (19), parecen tener una gran importancia en la regulación del daño tisular (3, 9 y 17). Dichas sustancias tienen un efecto hemodinámico en el sitio de la picadura, pues poseen una actividad vasodilatadora, así como la capacidad de inducir cambios en la permeabilidad capilar con la consiguiente extravasación de líquidos (10). Las PGE son agonistas beta adrenérgicos (5 y 17). Cuando entran en contacto con receptores beta adrenérgicos de las células cebadas o basófilos, activan a la enzima adenilato ciclasa, misma que parece ser el receptor beta (5). Esta enzima activada actúa sobre el trifosfato de adenosina (TFA) y da origen a la formación de un compuesto cíclico, el adenosin 3,5 monofosfato (AMFc). El AMFc en presencia de cationes divalentes como Mg^{++} y Ca^{++} , modulan la actividad de las enzimas citoplásmicas y las barreras de permeabilidad celular; posterior-

mente, una fosfodiesterasa convierta el ANFc en 5' - ANF, que es inactivo (5, 17). Al aumentar los niveles de ANFc, como respuesta al estímulo beta adrenérgico, se disminuye la liberación de gránulos de histamina por la célula cebada, con lo cual se interrumpe, en cierta medida, la quimiotaxis para - - otras células inflamatorias (5 y 17).

Los linfocitos "B" o los linfocitos "T" que participan en las respuestas inmunitarias, experimentan mitogénesis y -- agrandamiento, como respuesta a la presencia de un antígeno -- extraño al sistema inmunocompetente. Es posible que las PGE del parásito estimulen también un incremento del ANFc intra--linfocitario, ocasionando con esto la inhibición de la mitogénesis, dando como resultado una disminución significativa de -- la respuesta inmune (5) (Figura 1).

Por otro lado, como respuesta del organismo a la lesión producida por la picadura de una garrapata, los eosinófilos -- llegan a la zona de la lesión obedeciendo a un quimiotactismo positivo dado por la histamina y por el factor quimiotáctico de los eosinófilos. Una vez en el sitio, estas células dejan de responder al quimiotactismo y aceleran su producción de -- PGE, lo cual disminuye la degranulación de las células cebadas (17). De esta manera los eosinófilos cumplen con una función moduladora de la respuesta inflamatoria local provocada -- en primera instancia por los compuestos vasomotores que libe-

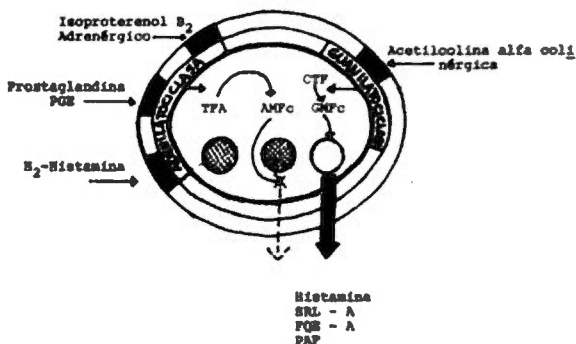
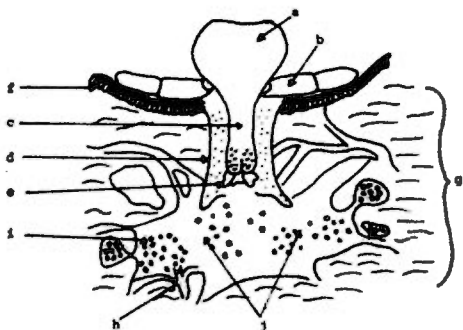


FIGURA 1.- Representación esquemática de una célula mostrando las relaciones entre el AMFc intracelular y diversas subunidades receptoras independientes (5).

ran las células cebadas (17). Estudios histopatológicos de piel con picadura de B. microplus demuestran la infiltración eosinofílica en el sitio de la lesión (18) (Figura 2).

En contraste con el mecanismo expuesto hasta aquí, Wallach (1965) sostiene la tesis de que las PGE moduladoras de la respuesta inflamatoria, no provienen del parásito, sino del sitio de la picadura (19). Esta aparente controversia oscurece el entendimiento del mecanismo, por medio del cual, el ixódido Boophilus s.p.p. asegura su subsistencia sobre el huésped y representa así un obstáculo para la implementación de nuevas técnicas para el control de la infestación por Boophilus s.p.p. en el ganado bovino.

Es posible percibirse de la importancia de las PGE y de la escasez y a menudo contradictoria literatura concerniente a su procedencia. En un intento por contribuir a la implementación del control y tratamiento farmacológico de las infestaciones por garrapata, Boophilus s.p.p. en el ganado bovino, se consideró necesario verificar la existencia de PGE en el parásito. Para ello se obtuvieron extractos lipídicos de larvas de B. microplus (Cepa—Morales), que no han tenido contacto con huésped alguno y se realizaron pruebas cualitativas para determinar la presencia de sustancias con actividad similar a las prostaglandinas.



- | | |
|-----------------------|---|
| a. Base del gnatosoma | g. Derris |
| b. Pedipalpos | h. Vasos sanguíneos |
| c. Hipostoma | i. Hemorragia |
| d. Cemento | j. Cavidad intersticial con
infiltración inflamatoria. |
| e. Quelíceros | |
| f. Epidermis | |

FIGURA 2.- Penetración de un ixódido en la piel de su huésped (1).

MATERIAL Y METODOS.

El trabajo fue realizado en el Departamento de Patología - del Centro Nacional de Parasitología Animal, ubicado en el "Rancho Pachita", San Bernabé, D. F., en el Departamento de Fisiología y Farmacología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootécnica de la Universidad Nacional Autónoma de México y en el Instituto Nacional de la Nutrición, SSA.

La cepa Morales de S. microplus, procedente del Estado de Morales, se ha mantenido desde febrero de 1979, bajo condiciones de laboratorio, en una incubadora a una temperatura de 28°C y 85% de humedad, en las instalaciones del C.N.P.A.

Se tomó 1 g de larvas de 16 días de edad, las que se anestasiaron con cloroformo y se homogeneizaron en un mortero con - solución amortiguadora (pH 7.0 y 0.1 M), conteniendo N-etil maleimida (10 microgramos/ml), compuesto inhibidor de la prostaglandín deshidrogenasa (2). Otro gramo de larvas se homogeneizó en la solución amortiguadora (pH 7.0 y 0.1 M.), libre de N-etil maleimida, como testigo. El homogeneizado se realizó en baño de hielo.

A partir del homogeneizado se obtuvieron los ácidos grasos utilizando el método descrito por Unger y colaboradores (10) el cual se describe así:

1. Se mezcla 1 ml del homogeneizado con el mismo volumen en solución salina fisiológica.

2. A los 2 ml resultantes del paso anterior, se le adiciona el mismo volumen (2 ml) de etanol grado analítico.

3. El volumen obtenido se mezcla con 4 ml de éter de petróleo (punto de ebullición 40-60 °C), para eliminar las grasas neutras, incluyendo carotenos.

4. Se ajusta el pH a 3-3.5 con ácido fórmico (1 a 3% v/v).

5. A la mezcla obtenida hasta aquí, se le adicionan 8 ml de cloroformo; es decir, se adiciona en cantidad, el mismo volumen resultante del paso 3.

6. Se evapora el cloroformo en un evaporador a 30 °C.

7. El residuo se disuelve de nuevo en 10 ml de cloroformo y luego se hace evaporar.

8. A través de un tubo conectado a un tanque que contiene Oxígeno libre de Nitrógeno, se burbujea el residuo con el fin de eliminar el ácido fórmico. El burbujeo se mantiene hasta que el olor del ácido no sea apreciable.

9. Se disuelve el extracto en 5 ml de solución de Krebs, para el bioensayo.

La solución de Krebs está compuesta por lo siguiente:

ClNa 13.8 g , KCl 0.7 g , KH_2PO_4 0.32 g , MgSO_4 0.58 g , -
 NaHCO_3 4.2 g , CaCl 5.05 ml (Sol. 20%), glucosa 2 g y H_2O bi-destilada 2 litros

La misma técnica se realizó en los dos homogeneizados. - Los extractos obtenidos se congelaron a -20°C , hasta que se practicó el bioensayo (8).

Para el bioensayo se utilizaron preparaciones de ileon de cobayo, por su especificidad selectiva a las prostaglandinas - (4). El tejido es perfundido en 5 a 10 ml/min. con solución - de Krebs a 37°C burbujeando al medio con una mezcla de Oxígeno con 5% de CO_2 (9).

Una vez preparado el tejido, se le da una hora y media de adaptación, antes de efectuar el primer bioensayo (4).

Fue necesario realizar pruebas preliminares en 6 ileons, - utilizando el análogo de PGF_2 alfa. En cada ileon se realizaron tres ensayos, dándose un período de 20 minutos de descanso después de cada uno.

El aparato usado para registrar las respuestas del bioensayo, fue un fisiógrafo Marco Bio-System, al cual se conecta - con el tejido perfundido en la solución Krebs, en la cámara de órgano aislado, a través de un miógrafo.

La cromatografía en capa fina, se llevó a cabo con el siguiente método (8):

Se aplicaron 0.4 ml de extracto, en metanol, a una placa Merck TLC-60-F₂₅₄ de gel de sílice. La fase móvil fue formada por una--- mezcla de acetato de etilo, agua destilada, 2-2-4-trimetilpentano y ácido acético (110:100:30:30 partes, respectivamente). El revela dor consistió en una solución al 10% de ácido fosfomolibdico en e tanol, al cual se aplicó por aspersión.

RESULTADOS.

La técnica utilizada es capaz de aislar casi exclusivamente lípidos (18). Los ácidos grasos extraídos de los homogenizados de larvas de garrapata B. microplus, mostraron tener la capacidad de estimular al músculo liso de ileon de cobayo, induciendo su contracción. En las figuras 3 y 4 se muestran las gráficas de actividad de los extractos.

En los ensayos preliminares, utilizando el análogo de la prostaglandina P_2 alfa (Lab. Tucco) se registraron contracciones del ileon de cobayo como lo muestran las figuras 5 y 6.

En el Cuadro 1 se muestran las respuestas obtenidas en los 3 ileons usados en el bioensayo, a diferentes dosis. La respuesta se mide en gramos de tensión y las dosis se obtuvieron haciendo diluciones a partir de la dilución original del producto comercial análogo a la PG. En este mismo cuadro, se muestran las respuestas obtenidas con el extracto de larvas. No es posible indicar la dosis y sólo se menciona la cantidad de extracto en ml.

Contracción de ileon de cobayo equivalente a una tensión de 1.3 g.

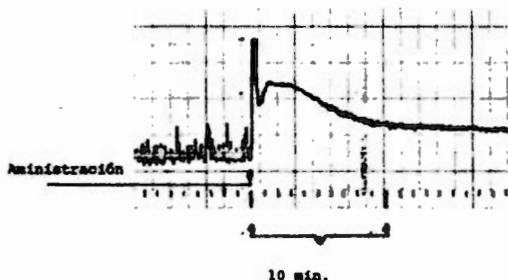


FIGURA 3.- Respuesta obtenida al aplicar 0.5 ml. del extracto, para el cual se utilizó N-etil maleimida.

Contracción de ileon de cobayo equivalente a una tensión de 1.6 g.

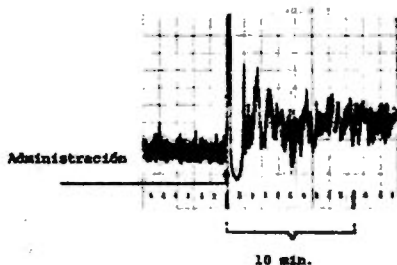


FIGURA 4.- Respuesta obtenida durante la aplicación 0.5 ml. -
del extracto, obtenido sin la utilización de p-etil
maleimida.

Contracción equivalente a una tensión de 1.6 g.

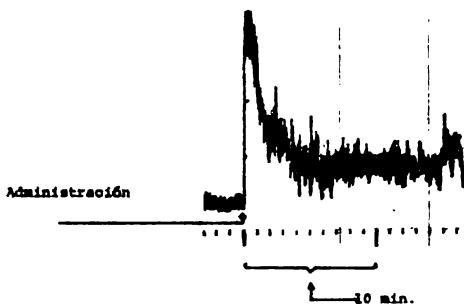
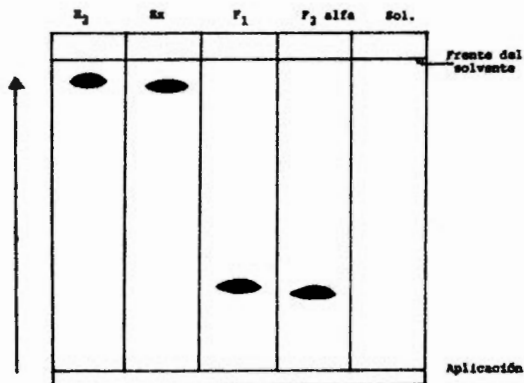


FIGURA 6.- Respuesta de ileon de cobayo, a la acción de --
300 ng. del análogo PGP_2 alfa (obsérvese que en las--
Figuras 5 y 6 al aplicar dosis iguales se obtuvieron
respuestas diferentes).

	Dosis			Extracto
	Análogo Comercial			Problemas
	83 ng	300 ng	833 ng	.5 ml
Ileon 1	0.34 g	1.6 g	1.16 g	1.3 g
Ileon 2	0.30 g	1.5 g	0.66 g	1.6 g
Ileon 3	--	1.3 g	2.00 g	-

CUADRO 1.- Respuestas de los ileon de cobayo a 3 diferentes dosis del análogo de la PGE₂ alfa, durante los ensayo preliminares.

En virtud de la obvia actividad de los extractos de larvas, se les realizó una valoración cromatográfica en la cual, se observó una substancia con características migratorias parecidas a las de la PGE_2 (Figura 7). No fue posible fotografiar la placa de gel con los resultados ya que esta se desbarata con el objeto de obtener nuevamente la PGE_2 patrón, dado que es muy difícil de obtener en el mercado.



F_1, F_2 alfa - Prostaglandinas F_1 y F_2 alfa
 E_2 - Prostaglandina E_2
 Ex. - Extracto de larvas B. microplus
 Sol. - Solución móvil

FIGURA 7.- Resultados obtenidos al valorar, en cromatografía en -
 capa fina, bajo la técnica de Green y Samuelson (8), -
 los extractos de larvas de garrapata B. microplus.

DISCUSION

Además de la presencia de prostaglandinas en Boophilus microplus (3 y 9), también hay estudios que determinan la existencia de estos compuestos en glándulas salivales y órganos reproductores del ixódido Hyalomma excavatum (14).

Se sabe que la técnica utilizada es capaz de evitar la degradación de sustancias derivadas del ácido araquidónico (18). Así pues, los extractos crudos obtenidos de homogeneizados de larvas de garrapata Boophilus microplus produjeron actividad--similar a la de las prostaglandinas, lo que confirma el trabajo de Riggs et al. (9). Las figuras 2 y 3 muestran dos diferentes intensidades en la respuesta contráctil. La discrepancia no es exclusiva del extracto pues resultados igualmente variables se obtuvieron al utilizar el análogo de la PGF_2 alfa en el bioensayo preliminar. Es factible considerar este tipo de respuesta--como un efecto asociado a las características individuales del material biológico empleado. Dados los objetivos planteados inicialmente en este trabajo, que se limita a un análisis cualitativo, no se consideró establecer una relación de dosis-respuesta gradual.

Algunos investigadores (9) utilizaron N-etil maleimida como inhibidor de la prostaglandín deshidrogenasa, con el objeto de evitar la probable destrucción enzimática de las PGS durante el almacenamiento de los homogeneizados. Sin embargo, en el pre

sente trabajo se obtuvo el mismo tipo de respuesta tanto con el extracto obtenido utilizando N-etil maleimida, como con el que no se utilizó esta. Es factible que el procedimiento de extracción empleado elimine toda actividad enzimática en el extracto, fenómeno que no sucede cuando se almacena homogeneizado, pues la actividad enzimática puede conservarse en parte.

Aunque la obtención de respuestas contráctiles utilizando el extracto de larvas de Boophilus microplus, fue alentadora indicación de actividad similar a la de las prostaglandinas, esta evidencia no determinaba que la actividad observada fuera producto de la acción de las prostaglandinas. Aun mas, existen antecedentes que indican el hallazgo de ciertas sustancias en la saliva de la garrapata (B. microplus), que aun no han sido caracterizadas químicamente (6,9 y 12), de tal manera que pudieran ser responsables del fenómeno contráctil. Así pues, se consideró pertinente hacer una valoración cromatográfica del extracto para determinar la presencia de prostaglandinas. Los resultados confirman la presencia de un lípido con características cromatográficas similares a la PGE_2 .

Es siempre interesante especular sobre el papel biológico de un resultado experimental positivo. Como se puntualizó anteriormente, existe la diferencia de opiniones acerca de la procedencia de las PGS encontradas en B. microplus. Al parecer y coincidente con otros resultados (9), el hecho de que aparentemente existen PGS en larvas de este insecto, es evidencia indicadora de que provienen de la garrapata misma, hecho que con

tribuye al esclarecimiento de su procedencia y de su posible función en la relación huésped-parásito.

CONCLUSION

Con base a los resultados obtenidos, se demostró la presencia de una sustancia con características biológicas y cromatográficas similares a la PGE_2 , en extractos lipídicos de larvas de garrapata Boophilus microplus (Cepa Morelos), que nunca habían estado en contacto con huéspedes.

BIBLIOGRAFIA.

- (1) Salashov, V.S. 1972. Bloodsucking ticks (ixodidae) vectores of diseases of man and animals. Misc. Publ. Soc. Amer. 8: 167-205.
- (2) Crotchley, D.J. 1973. Inhibition of the inactivation of prostaglandin in Guinea-Pig lung. Arch. Pharmacol. 270 R20.
- (3) Dickinson, R.F.; O'Hagan, S.E.; Schutz, M.; Binnington, K.C. and Hegarty, M.P. 1976. Prostaglandin in the saliva of the cattle tick Boophilus microplus. Australian J. of Exp. Biol. and Med. 54, 5 475-486.
- (4) Ferreira, S.B. and Vane, S.R. 1967. Prostaglandins their disappearance from and release into the circulation. Nature, Lond. 216, 868-873.
- (5) Fudenberg, H.; Stites, D.P.; Caldwell, J. y Wells, S.V. 1976. Manual de Immunología Clínica, p. 238-240 Land Med. Publ.
- (6) Geczy, A.F.; Naughton, M.A.; Clegg, J.B. and Hewatson, R.W. 1971. Esterases and Carbohydrate-Splitting enzyme in the saliva of the cattle tick, Boophilus microplus. J. Parasit. 57, 437-438.
- (7) González O., A. 1978. Pérdidas ocasionadas por la Garrapata. Vol. 1, p. 4-6 de la Revista Fideicomiso Campaña Nat. contra la Garrapata. México, D. F.
- (8) Green, N. and Samuelson, B. 1964. Prostaglandins and related factors XIX. Thin-Layer chromatography of prostaglandins. J. Lipid. Res. 5:117.
- (9) Higge, G.A.; Vane, S.R.; Hart, R.J.; Potter, C. and Wilson, R.G. 1976. Prostaglandins in the saliva of the cattle tick, Boophilus microplus (canestrini) (Acarina, Ixodidae), Bull. Ent. Res. 66, 665-670.
- (10) Moorhose, D.E. and Tatchel, R.J. 1969. Histological Responses of cattle and other ruminants to the Recent Attachment of Ixodid Larvae. J. Med. Ent. Vol. No. 4: 419-422.

- (11) Moorhouse, D.E. and Tatchel, R.J. 1966. The feedings processes of the cattle tick Boophilus microplus (canestrini). A study in Host-Parasite relations, Part I, Attachment to the host. Parasitology. Cambridge, 56, 623-632.
- (12) O'Hagan, J.E. 1973. C.S.I.R.O. Division of Entomology Annual Report. A substance similar to the Slow-reacting substance of anaphylaxis. p. 132.
- (13) Riek, R.F. 1962. Studies to the reaction of animals to infestation with tick. J. Agric. Res. 13 (3): 332-350.
- (14) Shemesh, M.; Hadani, A.; Shklar, A. 1977. Prostaglandins in salivary glands and reproductive organs of the tick Hyalomma excavatum. Kimron Veterinary Institute, Bet Dagan, Israel. Israel Journal of Medical Sciences. 13, 1137-1138.
- (15) Springell, P.H. 1974. La garrapata de los bovinos en relación con la producción animal en Australia, Revista Mundial de Medicina Veterinaria y Zootecnia No. 10.
- (16) Tatchel, R.J. 1969. Host-Parasite interactions and the feedings of Blood-Sucking Arthropods. Parasitology, Cambridge, 59, 98-104.
- (17) Tizard, I.R. 1979. Inmunología Veterinaria. Ouelph, Canada. Editorial Interamericana. Pag. 294-297.
- (18) Unger, W.G.; Stamford, I.P. and Bennett, A. 1971. Extraction of Prostaglandin from Human Blood. Nature, Vol. 233.
- (19) Wallach, D.P. 1965. The enzymic Conversion of Arachidonic Acid to prostaglandin E, with Acetone Powder Preparations of bovine seminal vesicles. Life Sci. 4, 361-364.