

## Artículos científicos

### Determinación de una mutación puntual en el gen *Est9* de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* resistente a organofosforados

### Detection of a point mutation in the *Est9* gene of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* resistant to organophosphates

Edgar Diaz-Rivera, M.Sc.<sup>1,2</sup>; Gustavo Vallejo, Ph.D.<sup>3</sup>

#### Resumen

*Rhipicephalus microplus* es la garrapata más prevalente, responsable de transmitir hemoparásitos en ganado bovino de áreas tropicales y subtropicales. Polimorfismos en su genoma confieren resistencia a los acaricidas usados para su control. Una mutación en el gen *Est9* que codifica una carboxilesterasa en *R. microplus*, confiere resistencia a compuestos organofosforados. Este estudio identificó una mutación en garrapatas de campo, colectadas en un predio con historial de resistencia hacia acaricidas organofosforados mediante el uso de PCR – RFLP. Las garrapatas fueron sometidas a un compuesto organofosforado comercial del 83% de concentración, en una prueba de inmersión de teleoginas y el ADN de garrapatas fenotípicamente susceptibles, resistentes y medianamente resistentes fue extraído y usado en la amplificación de un fragmento de 372 pb del gen *Est9*, mediante el uso de cebadores específicos. Los productos de PCR fueron digeridos con la endonucleasa *EcoRI*, registrándose el patrón de bandas en los genotipos homocigoto natural, homocigoto mutante y heterocigoto. La prueba exacta de Fisher arrojó diferencias altamente significativas ( $p=0.0022$ ) entre teleoginas susceptibles y aquellas con algún nivel de resistencia, mostrando relación directa entre fenotipo y genotipo. Así, se comprobó por primera vez en Colombia la presencia de una mutación en el gen *Est9* de garrapatas *R. microplus* resistentes a organofosforados.

**Palabra clave:** Carboxilesterasa, Colombia, garrapata, mutaciones, Reacción de Cadena de Polimerasa, Resistencia a acaricidas (Fuente: CAB)

#### Abstract

*Rhipicephalus microplus*, is the more prevalent tick responsible for transmitting hemoparasites in cattle raised in tropical and subtropical areas. *R. microplus* possesses a number of polymorphisms in its genome that may contribute to resistance to acaricides used for its control. A mutation in the *Est9* gene that encodes for a carboxylesterase in *R. microplus*, confers resistance to organophosphorus compounds. In this study, a mutation in field ticks collected in a farm with history of resistance to organophosphorus acaricides was identified by using PCR-RFLP. Ticks were subjected to an 83% organophosphorus compound in a teleogines immersion test. DNA from ticks phenotypically susceptible, moderately resistant and resistant was extracted and used to amplify a 372 bp DNA fragment of the *Est9* gene by using specific primers. The PCR products were digested with the *EcoRI* endonuclease and revealed a differential band pattern for the wild type homozygous, mutant homozygous and heterozygote genotypes. Fisher's exact test showed highly significant differences ( $p=0.0022$ ) between susceptible engorged ticks and those with some level of resistance, showing a direct relationship between phenotype and genotype. Thus, the presence of a mutation in the *Est9* gene of *R. microplus* ticks resistant to organophosphates is reported for the first time in Colombia.

**Keyword:** Carboxylesterase, Colombia, tick, mutations, PCR, acaricide resistance (Source: CAB)

<sup>1</sup>Grupo de Investigación en Enfermedades Neurodegenerativas. Línea Diagnóstico, patogenia y control de enfermedades neurológicas de tipo parasitario, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad del Tolima, Ibagué. <sup>2</sup>Laboratorio de Parasitología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad del Tolima, Ibagué. <sup>3</sup>Laboratorio de Investigaciones en Parasitología Tropical, Facultad de Ciencias, Universidad del Tolima, Ibagué.

Recibido para publicación: Julio 09, 2014; Aceptado para publicación: Octubre 01, 2014.

Este trabajo fue financiado por el Comité Central de Investigaciones de la Universidad del Tolima.

Cómo citar este artículo: Díaz-Rivera E y Vallejo G. Determinación de una mutación puntual en el gen *Est9* de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* resistente a organofosforados. Revista Colombiana de Ciencia Animal 2014, 7: 14-20

Autor de correspondencia: Doctor Edgar Díaz Rivera, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad del Tolima, Tel. 3002083307. Correo electrónico: ediazr@ut.edu.co

Copyright © 2014 por Revista Colombiana de Ciencia Animal, Universidad del Tolima

La garrapata común de los bovinos, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, es considerada uno de los principales parásitos que afecta a los animales en pastoreo en áreas tropicales y subtropicales de América, África, Asia y Australia (Murrell & Barker, 2003). Este ácaro genera grandes pérdidas económicas, al disminuir la producción de leche y carne, deteriora la calidad

de las pieles por su picadura, afecta la salud por inocular toxinas en el animal y ocasiona pérdidas de sangre y principalmente tiene la capacidad de transmitir agentes causales de enfermedades altamente patógenas. En Colombia, la piroplasmosis o ranilla roja generada por el protozooario *Babesia bigemina*, la anaplasmosis o ranilla blanca generada por la rickettsia *Anaplasma marginale*, así como la babesiosis cerebral generada por la *Babesia bovis*, son enfermedades prevalentes en regiones donde *R. microplus* está presente (Vargas et al., 2010; Benavides et al., 2012; Domingues et al., 2012; Díaz & Vallejo, 2013).

El control de la garrapata se basa principalmente en el uso de compuestos químicos como organofosforados, piretroides y amidinas, cuya aplicación se realiza a través de baños de aspersión, lactonas macrocíclicas de uso parenteral o fenilpirazolonas y benzoilfenilureas de aplicación tópica en el dorso del animal. En el caso de los acaricidas para aspersión, que son los de mayor uso, con frecuencia se aplican sin seguir criterios técnicos, por lo que se efectúa un excesivo número de aplicaciones o se emplean volúmenes inadecuados del producto por animal acelerando el desarrollo de resistencia (Alonso-Díaz et al., 2006; Domingues et al., 2012).

La resistencia a acaricidas en *R. microplus* es un problema en aumento a nivel mundial, debido al frecuente e inadecuado uso de este producto, se han seleccionado poblaciones de garrapatas capaces de resistir dosis de acaricidas que normalmente serían letales, característica esta de tipo genético y heredable (Rosario-Cruz et al., 2009; Domínguez-García et al., 2010). Actualmente, la quimioresistencia en garrapatas ha sido diagnosticada en 75 países de un total de 151 que fueron incluidos en un estudio realizado por la Organización Mundial de Salud Animal, quien lo considera como el mayor problema para controlar esta plaga, dada la disponibilidad cada vez menor de nuevos compuestos acaricidas (Nari, 2011; Domingues et al., 2012).

Durante las tres últimas décadas la resistencia a acaricidas en *R. microplus* se ha estudiado desde aspectos toxicológicos, metabólicos y genómicos. De igual forma se han investigado las bases genéticas de resistencia hacia estos ácaros en los bovinos, su única especie hospedadora, y la variabilidad de esta característica entre razas (Rosario-Cruz, et al., 2009; Porto Neto et al., 2011). Se han diseñado pruebas biológicas para detección de resistencia acaricida en *R. microplus* como la Prueba del Paquete

Larval (LPT) o la Prueba de Inmersión de Adultas (AIT), técnicas que requieren la manipulación de acaricidas, consumen gran cantidad de tiempo para su ejecución y son lentas para arrojar resultados, por lo cual el desarrollo de nuevas metodologías de diagnóstico de resistencia, basadas en pruebas moleculares y bioquímicas es una alternativa para lograr una más rápida y sensible detección de resistencia (Rosario-Cruz, et al., 2009; Hunt, 2011). Es por esto que se trabaja intensamente en la identificación de marcadores de ADN, que permitan detectar tempranamente las frecuencias genotípicas y alélicas de genes relacionados con resistencia a acaricidas, a fin de poder direccionar oportunamente planes de manejo y control de esta especie de garrapata, antes de que se manifieste la situación de quimioresistencia en campo (Jabbar et al., 2005; Chevillon et al., 2007a).

Investigaciones realizadas en países como EEUU, México y Brasil (Hernández et al., 2000; Baffi et al., 2007; Chen et al., 2009), encontraron que mutaciones puntuales en genes codificantes de algunas enzimas aumentan la actividad hidrolítica de estas hacia acaricidas piretroides y organofosforados, como sucede en el gen *Est9* codificante de una carboxilesterasa (Guerrero & Nene, 2008), en el que se presenta la sustitución de un nucleótido guanina por adenina, con lo cual las garrapatas portadoras del alelo mutante que incluye adenina manifiestan fenotípicamente algún grado de resistencia hacia estos acaricidas por el incremento de la actividad hidrolizante de la enzima, mecanismo de detoxificación enzimática que ha sido reconocido como una de las respuestas principales en *R. microplus* (Chevillon et al., 2007b; Rosario-Cruz et al., 2009). Dicha sustitución nucleotídica genera un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción *EcoRI*, permitiendo desarrollar la técnica de Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP) con la cual se puede diagnosticar la resistencia en el ácaro (Baffi et al., 2008; Guerrero et al., 2008; Domínguez-García et al., 2010; Rodríguez et al., 2011). En Colombia, mediante esta técnica se demostró la presencia de la mutación puntual en el gen *Est9* de individuos de *R. microplus* resistentes a piretroides colectados en campo en el municipio de Ibagué, Tolima (Díaz & Vallejo, 2013).

Por lo anterior, la presente investigación buscó detectar dicho polimorfismo en garrapatas *Rhipicephalus (B.) microplus* colectadas en una finca con historial de resistencia a acaricidas organofosforados, empleando las técnicas de PCR

(Reacción en Cadena de la Polimerasa) y RFLP, identificando el grado de asociación entre fenotipos y genotipos resultantes.

## Materiales y métodos

### *Colección de especímenes*

Teleoginas (hembras repletas de sangre de más de 7mm de tamaño) de *R. microplus* se colectaron en una finca lechera, ubicada en el municipio de Ibagué, Tolima, a una altura de 1250 msnm, con temperatura ambiental promedio de 26°C y humedad relativa del 70%. En el predio se encontraba un rebaño de bovinos, tipo mestizo (cruces de Cebú, Pardo Suizo y Holstein) y se presentaba un historial de resistencia a acaricidas organofosforados, piretroides y formamidinas que obligaba a realizar baños de aspersión con intervalos de 10 a 15 días.

Los especímenes fueron colectados al azar, desprendiéndolos manualmente y cuidando que sus piezas bucales no se separaran. Se colocaron en un recipiente acondicionado con trozos de papel en el fondo y se transportaron al Laboratorio de Investigaciones en Parasitología Tropical de la Universidad del Tolima.

### *Detección de resistencia a organofosforados*

Las garrapatas capturadas fueron sometidas a una prueba *in vitro* de inmersión para identificar los individuos resistentes y susceptibles (FAO, 2004; Furlong, 2002; Baffi *et al.*, 2007). Para ello, se utilizó un compuesto organofosforado comercial de uso común en la región, cuyo principio activo es ethion al 83%, empleando la dosis de 0,75 ml del organofosforado por litro de agua recomendada por el fabricante para uso en campo. Un grupo de 45 teleoginas fue sumergido en 200 ml de la solución durante tres minutos, mientras otro grupo de 10 teleoginas empleado como control se sumergió en agua destilada. Luego de esto, las garrapatas se depositaron en cajas de Petri, fijando cada espécimen por el dorso con cinta doble faz, y se ubicaron en una estufa de incubación con convección natural a 28°C y 80% de humedad.

Los individuos muertos y el grado ovoposición de cada una de las teleoginas se registró diariamente. De esta manera, las garrapatas que murieron en las primeras 24 horas post-inmersión

conformaron el grupo de individuos susceptibles al organofosforado, verificando la muerte al no presentar reacción de movimiento al estimular las patas o el rostro. Las que tuvieron una ovoposición completa a los 14 días conformaron el grupo de individuos resistentes y aquellas teleoginas que no ovopositaron o tuvieron una ovoposición incompleta a los 14 días conformaron el grupo de individuos medianamente resistentes (Baffi *et al.*, 2007). Terminada la prueba, a cada espécimen se le practicó una incisión longitudinal para lavar el exceso de sangre bovina con agua ultrapura, depositando la muestra en tubos Eppendorf con alcohol al 70% y almacenando a -20°C hasta su procesamiento.

### *Pruebas moleculares para detección de la mutación puntual*

La extracción del ADN se realizó mediante el método de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico, empleando el protocolo descrito por Díaz (2012). Utilizando los primers descritos por Baffi *et al.*, (2007), se amplificó el fragmento de interés en el gen *Est9*, para el derecho 5'-AGC ATC GAC CTC TCG TCC AAC-3' y para el izquierdo 5'-GTC GGC ATA CTT GTC TTC GAT G-3'.

La amplificación del fragmento mediante PCR se realizó en un termociclador PTC-100 con una mezcla de 4 pmol de cada cebador, 200 µM de cada dNTP, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 unidad de Taq DNA polimerasa, 1X de buffer PCR, 100 ng de ADN y agua desionizada para un volumen final de 20 µL por reacción. Una reacción sin adición de ADN plantilla, sirvió como control negativo. El perfil térmico consistió de una desnaturación previa a 95°C por 5 minutos, seguida de 38 ciclos con periodos de desnaturación a 95°C por 1 minuto, anillamiento a 60°C por 1 minuto y extensión a 72°C por 1 minuto, con una extensión final a 72°C por 5 min (Baffi *et al.*, 2007). Los amplicones se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, durante 1.5 horas a 80 voltios en TBE 0.5X, teñido con bromuro de etidio.

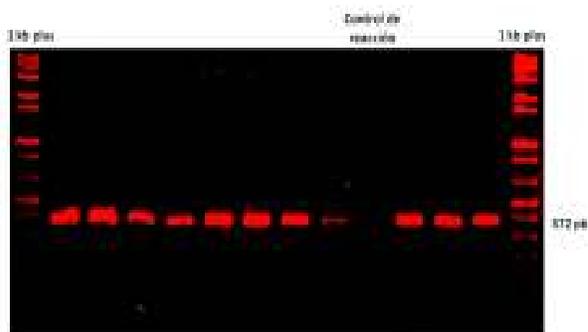
La detección del polimorfismo se llevó a cabo mediante el procedimiento de Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP), utilizando la endonucleasa *EcoRI* que reconoce la secuencia GAATTC como punto de corte. La digestión se realizó preparando una solución con 10 µl del producto de PCR, buffer de reacción 1X, 5 unidades de *EcoRI* y volumen suficiente de agua

ultrapura hasta completar 20  $\mu$ l. Esta mezcla se incubó a 37°C x 3 horas y se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 2.5% durante 1.45 horas en TBE 0.5X a 80 voltios teñido con bromuro de etidio para ser observado bajo luz ultravioleta (Diaz, 2012). Los resultados obtenidos se analizaron mediante la prueba exacta de Fischer para comparación de proporciones independientes, tomando como nivel de significancia para el análisis un error alfa inferior al 1% ( $p < 0.01$ ).

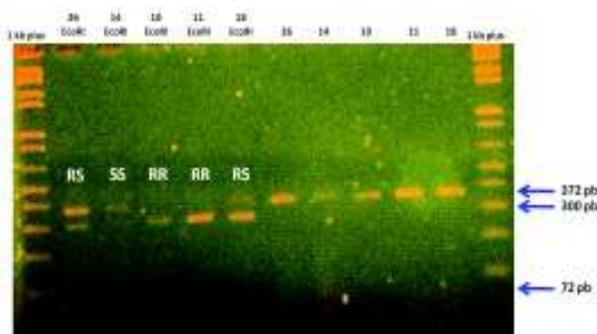
## Resultados y discusión

Cuarenta y cinco teleoginas se sometieron a la prueba de inmersión en solución de ethion, resultando 13 de ellas susceptibles (28,9%), 28 medianamente resistentes (62,2%) y cuatro resistentes (8,9%), determinando fenotípicamente un nivel de resistencia hacia el acaricida organofosforado del 71,1%.

Luego de realizar el proceso de extracción, se logró aislar en tres muestras susceptibles, 24 medianamente resistentes y cuatro resistentes una cantidad suficiente de ADN para amplificar el fragmento de 372 pb del gen *Est9*, como se puede observar en la figura 1. Posteriormente la digestión de cada una de las muestras con la enzima de restricción *EcoRI* permitió observar polimorfismos en 30 de los productos analizados mediante el procedimiento de RFLP. Se diferenciaron claramente tres genotipos, como se muestra en la figura 2: Homocigoto natural (SS), correspondiente a individuos susceptibles, en cuyo ADN no se presenta la sustitución de guanina por adenina y por lo tanto no hay reconocimiento por la endonucleasa, manteniéndose completo el fragmento de 372 pb que se visualiza como una sola banda en el gel de electroforesis. Homocigoto mutante (RR), genotipo presente en individuos resistentes en los cuales se registra la mutación y se forma la secuencia de corte reconocida por la enzima *EcoRI*, generando dos fragmentos, uno de 300 pb y otro de 72 pb que se visualizan como dos bandas en el gel de electroforesis. Heterocigoto (RS), presente en individuos medianamente resistentes, los cuales manifiestan los dos alelos del gen, uno natural y otro mutante, visualizando en el gel de electroforesis tres bandas de 372, 300 y 72 pb.



**Figura 1.** Fragmentos de 372 pb del gen *Est9* obtenidos por PCR, visualizados en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio.



**Figura 2.** Fragmentos de restricción generados por la digestión con la enzima *EcoRI*, visualizados en gel de agarosa al 2.5% teñido con bromuro de etidio.

RS = Heterocigoto;

SS = Homocigoto natural;

RR = Homocigoto mutante.

Muestras 26, 14, 10 11, 18: muestras control sin digerir con *EcoRI*.

El análisis de los resultados obtenidos con el procedimiento de RFLP permitió calcular las frecuencias alélicas y genotípicas de los 30 individuos, como se observa en la tabla 1. Así, todas las teleoginas susceptibles presentaron el genotipo homocigoto natural (SS), mientras que las medianamente resistentes presentaron una frecuencia muy baja. El genotipo heterocigoto (RS) tuvo una frecuencia bastante alta en las teleoginas medianamente resistentes y el genotipo homocigoto mutante (RR) se encontró en todas las garrapatas resistentes. En individuos medianamente resistentes la frecuencia del genotipo mutante fue más alta que la del genotipo susceptible.

**Tabla 1.** Frecuencia genotípica y alélica del gen *Est9* obtenida luego del proceso de RFLP de las teleoginas, sometidas a la prueba de inmersión para detectar niveles de resistencia al acaricida organofosforado ethion.

Tratamiento acaricida	Prueba Drummond	RFLP - Genotipos			Alelos	
		SS(%)	SR(%)	RR(%)	S	R
OP	Susceptibles	3/3 = 100	-	-	1	-
	Medianamente resistentes	2/23 = 8.7	18/23 = 78.3	3/23 = 13	0.48	0.52
	Resistentes	-	-	4/4 = 100	-	1
Total		5/30 = 16.7	18/30 = 60	7/30 = 23.3	0.467	0.533

SS= Homocigoto natural; SR= Heterocigoto; RR= Homocigoto mutante; S= Alelo natural; R= Alelo mutante

La tasa del 100% encontrada tanto del alelo natural (S) en las teleoginas susceptibles como del alelo mutante (R) en las teleoginas resistentes, sugiere una posible asociación entre el alelo mutante y el fenotipo resistente. Se observa de igual forma un desequilibrio entre las frecuencias genotípicas y alélicas, manifiesto por el mayor porcentaje del alelo mutante (53,3%) y menor del alelo natural (46,7%), denotando selección de los individuos portadores del alelo mutante, lo cual resultará en un aumento de garrapatas resistentes al ethion.

El análisis de asociación entre fenotipo y genotipo a través de la prueba exacta de Fisher, permitió ver como de 27 muestras de individuos con algún nivel de resistencia al organofosforado, solamente dos no fueron digeridas por la enzima de restricción, mientras que las tres pertenecientes a individuos susceptibles no fueron digeridas por la enzima *EcoRI* como era de esperar, mostrando diferencias altamente significativas ( $p=0.0022$ ) entre teleoginas susceptibles y teleoginas con algún nivel de resistencia, lo mismo que una relación directa entre el fenotipo y el genotipo (Tabla 2).

**Tabla 2.** Tabla de contingencia empleada en la prueba exacta de Fisher. Se comparan los fenotipos susceptible y resistentes (resistentes + medianamente resistentes) con el resultado de la prueba RFLP (cortó = presencia de fragmento de 372 pb; no cortó = sin fragmento).

Fenotipo	RFLP		
	Cortó	No cortó	Total
Susceptibles	0	3	3
Resistentes +	25	2	27
Medianamente resistentes			
<b>Total</b>	25	5	30

Este estudio establece la presencia de una mutación en el gen *Est9*, que codifica para una carboxilesterasa

en la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en Colombia, así como los dos alelos relacionados por resistencia a organofosforados en individuos colectados en campo, mutación que ya había sido reportada por primera vez en el país en *R. microplus* resistente a piretroides (Díaz & Vallejo, 2012).

El gen *Est9* fue identificado mediante PCR en el 68,8% de las muestras que se procesaron para extraer ADN. Es posible que la baja concentración de ADN obtenido o la presencia de algunos inhibidores de la polimerasa no removidos durante el proceso de extracción con fenol-cloroformo hayan impedido una amplificación exitosa en las muestras restantes. Sobre esto, Halos *et al.* (2004), Rodríguez *et al.* (2009) y Hunt (2011) mencionan que la cutícula de las garrapatas es bastante dura y debe romperse apropiadamente, y que el ADN extraído de estos artrópodos puede degradarse en forma rápida por razones no conocidas, presentándose durante el proceso de extracción y purificación del ácido nucleico polisacáridos que inhiben la Taq-polimerasa, reduciendo todo esto la eficacia del proceso de PCR.

La amplificación del ADN con los cebadores específicos, expuso un fragmento de 372 pb semejante al observado en especímenes de *R. microplus* de México, Estados Unidos y Brasil (Hernández *et al.*, 2000; Baffi *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2009), correspondiente a una esterasa del grupo de las acetilcolinesterasas que es altamente conservada en esta especie de ácaro, cuyo gen fue identificado como *Est9* codificante de una carboxilesterasa (Guerrero & Nene, 2008).

Los fragmentos de restricción generados mediante la digestión con *EcoRI* presentaron un patrón de bandas en cada genotipo similar a los encontrados por Baffi *et al.* (2007), diferenciándose notoriamente los tres genotipos natural, mutante y heterocigoto, a través

del número de bandas originadas por el proceso de digestión con la enzima. La técnica de RFLP permitió observar una asociación altamente significativa entre los genotipos natural (SS) y mutante (RR) y los fenotipos susceptible y resistente a organofosforados respectivamente, con el 100% de los individuos de cada grupo fenotípico presentando el respectivo genotipo. En los individuos medianamente resistentes de igual forma se presentó una alta asociación, con el 78,3% mostrando el genotipo heterocigoto (SR). Esta asociación significativa entre fenotipo y genotipo concuerda con lo encontrado por Hernández *et al.* (2000) y Baffi *et al.* (2007) quienes emplearon también la técnica de RFLP en México y Brasil, respectivamente.

Las frecuencias alélicas y genotípicas mostraron un porcentaje bajo (16,7%) de individuos portadores del genotipo natural de resistencia a organofosforados mientras los individuos fenotípicamente resistentes o medianamente resistentes, portadores del genotipo, relacionado con resistencia presentan un alto porcentaje (83,3%). Esta situación en *R. microplus*, cuyo gen *Est9* codificante de la carboxilesterasa se encuentra fijo, denota un acentuado proceso de selección en las garrapatas de la finca hacia individuos portadores del alelo mutante (R), que confiere resistencia de tipo metabólico a acaricidas organofosforados como una respuesta poblacional a la presión ejercida por el uso continuo del acaricida, mediante el mecanismo de detoxificación enzimática aumentada por esterasas. Este aumento en la actividad de la esterasa, por efecto de la mutación fue demostrado por Guerrero *et al.* (2002) en especímenes mexicanos de *R. microplus*, mediante pruebas bioquímicas y moleculares.

La información obtenida permite observar que, en ganaderías del municipio de Ibagué y posiblemente en el resto de Colombia, se están dando procesos de selección en la garrapata *Rhipicephalus (B.) microplus* hacia poblaciones con un alto número de individuos portadores del alelo mutante del gen *Est9*, contribuyendo al desarrollo de resistencia hacia acaricidas organofosforados en esta especie de ectoparásito de los bovinos. No obstante dado el conocimiento que se tiene actualmente de la intervención de otro tipo de enzimas y de mecanismos fisiológicos, mediados todos por alteraciones moleculares en sus genes codificantes, se requiere continuar con su evaluación en campo para disponer de una visión más real de la extensión del problema y poder generar alternativas de control que respondan a la situación encontrada.

## Agradecimientos

Al Comité Central de Investigaciones de la Universidad del Tolima por financiar la presente investigación a través del proyecto No. 80109. Igualmente, al Dr. Julio Cesar Carranza Martínez, investigador del LIPT, por sus aportes al diseño del estudio.

## Referencias

- Alonso-Díaz, M.A., Rodríguez-Vivas, R.I., Frago-Sánchez, H., Rosario-Cruz, R., 2006. Ixodicide resistance of the *Boophilus microplus* tick to ixodocides. *Arch Mev Vet* 38 (2), 105 - 113.
- Baffi, M., Rocha, G., Ueira, C., Soares, C., Ceron, C., Bonetti, A., 2008. Esterase enzymes involved in pyrethroid and organophosphate resistance in a Brazilian population of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Mol Biochem Parasitol* 160, 70 - 73.
- Baffi, M.A., Rocha G., Ueira, C., Soares, C., Ricardo, L., Bonetti, A.M., 2007. Identification of point mutations in a putative carboxylesterase and their association with acaricide resistance in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Vet Parasitol* 148, 301 - 309.
- Benavides, E., Polanco, N., Vizcaíno, O., Betancur, O., 2012. Criterios y protocolos para el diagnóstico de hemoparásitos en bovinos. *Rev. Cien. Anim.* 5, 31- 49.
- Chen, A., He, H., Temeye, R K., Jones, S., Green, P., Barke, R S., 2009. A survey of *Rhipicephalus microplus* populations for mutations associated with pyrethroid resistance. *J Econ Entomol* 102(1), 373 - 380.
- Chevillon, CH., Basile, B., Barré, N., Durand, P., Aranthau, C., Meeus, T., 2007a. Direct and indirect inferences on parasite mating and gene transmission patterns Pangamy in the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. *Infect Genet Evol* 7, 298 - 304.
- Chevillon, CH., Ducornez, S., Meeus, T., Koffi, B., Gaia, H., Delathiere, J., Barré, N. 2007b. Accumulation of acaricide resistance mechanisms in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) populations from Nueva Caledonia Island. *Vet Parasitol* 147, 276 - 288.
- Díaz, E., Vallejo, G., 2013. Identificación de un polimorfismo del gen *Est9* relacionado con resistencia a piretroides en *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Revista MVZ Córdoba* 18, 3708 - 3714.
- Díaz, E. 2012. Estudio molecular del gen de una carboxilesterasa relacionada con quimiorresistencia en la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Tesis, Maestría en Ciencias Biológicas, Universidad del Tolima.
- Domingues, L., Alves, B., Passos, A., Pinto, A., Medeiros, A., Cerqueira, L., Silaghi, C., Pfister, K., Friche, L., 2012. Survey of pyrethroid and organophosphate resistance in Brazilian field populations of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: Detection of C190A mutation in domain II of the para-type sodium channel gene. *Vet Parasitol* 189, 327 - 332.
- Domínguez- García, D., Rosario-Cruz, R., Almazan-García, C., Saltijeral, J., de la Fuente, J., 2010. *Boophilus microplus*:

- Biological and molecular aspects of acaricide resistance and their impact on animal health. *Tropical and subtropical Agroecosystems* 12, 181 – 192.
- FAO. (2004). Guidelines resistance management and integrated parasite control in ruminants. Recuperado de <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/ag014e/ag014e00.pdf>
- Furlong, J., 2002. Teste do biocarrapaticidograma (Imersão de teleoginas). III Curso Internacional Progresos no Diagnostico das Parasitoses dos Animais de Productio. Programa de Treinamento para terceiros países. Salvador, Brasil.
- Guerrero, F., Nene, V., 2008. Gene structure and expresión of a pyrethroid-metabolizing esterase, CzEst9, from a pyrethroid resistant Mexican population of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *J Med Entomol* 45(4), 677 – 685.
- Guerrero, F., Pruett, J., Li, A. 2002. Molecular and biochemical diagnosis of esterase-mediated pyrethroid resistance in a Mexican strain of *Boophilus microplus* (Acari:Ixodidae). *Exp Appl Acarol* 28: 257 – 264.
- Hernández, R., He, H., Chen, A., Waghela, S., Wayne, G., George, J., Gale, G. 2000. Identification of a point mutation in an esterase gene in different populations of the southern cattle tick, *Boophilus microplus*. *Insect Biochem Mol Biol* 30, 969 – 977.
- Halos, L., Jamal, T., Vial, L., Maillars, R., Suau, A., Le Menach, A., ... Vayssier-Taussat, M. 2004. Determination of an efficient and reliable method for DNA extraction from ticks. *Vet. Res.* 35, 709 – 713.
- Hunt, P. 2011. Molecular diagnosis of infections and resistance in veterinary and human parasites. *Vet Parasitol* 180, 12-46.
- Jabbar, A., Iqbal, Z., Muhammad, G., Nisar, M., Zahid, R., Sandhu, Z., 2005. The interplay of molecular biology and veterinary parasitology: A need of the time. *Int J Agric Biol* 7(5), 845 – 852.
- Murrell, A., Barker, S., 2003. Synonymy of *Boophilus* Curtice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). *Syst Parasitol* 56(3), 169-172.
- Nari, A. 2011. Towards sustainable parasite control practices in livestock production with emphasis in Latin America. *Vet Parasitol* 180, 2 – 11.
- Porto Neto, L., Jonsson, N., D'Occhio, M., Barendse, W., 2011. Molecular genetic approaches for identifying the basis of variation in resistance to tick infestation in cattle. *Vet Parasitol* 180, 165 – 172.
- Rodríguez, I., Gern, L., Rais, O., Fuentes, O., González, R., Fernández, C. 2009. Detección molecular de patógenos emergentes de importancia médica y veterinaria en garrapatas capturadas sobre caballos domésticos. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 61(1), 57-62.
- Rodríguez, R., Trees, A., Rosado, J., Villegas, S., Hodgkinson, J., 2011. Evolution of acaricide resistance: Phenotypic and genotypic changes in field populations of *Rhipicephalus (B.) microplus* in response to pyrethroid selection pressure. *Int J Parasitol* 41, 895 – 903.
- Rosario-Cruz, R., Almazan, C., Miller, R., Domínguez- García, D., Hernández-Ortiz, R., de la Fuente, J., 2009. Genetic basis and impact of tick acaricide resistance. *Front Biosci* 14, 2657 – 2665.
- Vargas, M., Moreno, C., Sánchez, D., Pérez, D., Valdés, M., Alfonso, A., Joglar, M., Machado, H., Rodríguez, E., Méndez, L., Leonart, R., Suarez, M., Fernández, E., Estrada, M., Rodriguez- Mallon, A., Farnós, O., 2010. Two initial vaccinations with the Bm86-based Gavac<sup>plus</sup> vaccine against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* induce similar reproductive suppression to three initial vaccinations under production conditions. *BMC Veterinary Research* 6, 43 – 51