

***Boophilus microplus*: ASPECTOS BIOLÓGICOS Y MOLECULARES DE LA RESISTENCIA A LOS ACARICIDAS Y SU IMPACTO EN LA SALUD ANIMAL**

[*Boophilus microplus*: BIOLOGICAL AND MOLECULAR ASPECTS OF ACARICIDE RESISTANCE AND THEIR IMPACT ON ANIMAL HEALTH]

**Delia Inés Domínguez-García¹, Rodrigo Rosario-Cruz^{2*},
Consuelo Almazán-García³, Jorge Alberto Saltijeral Oaxaca¹
and José De la Fuente^{4,5}**

¹Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco,
Posgrado en Ciencias Biológicas, Calzada del hueso 1100, México D.F. C.P. 04960.

²Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria,
Carretera Federal Cuernavaca-Cuatla 8534.Col Progreso., Jiutepec, Morelos, México.
CP 62550. Corresponding author Email: rockdrig@yahoo.com.mx.

³Universidad Autónoma de Tamaulipas Unidad académica de Medicina Veterinaria y
Zootecnia Departamento de Parasitología Cd. Victoria Tamaulipas México.

⁴Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos IREC (CSIC-UCLM-JCCM),
Ronda de Toledo s/n, 13005 Ciudad Real, Spain.

⁵Department of Veterinary Pathobiology, Center for Veterinary Health Sciences,
Oklahoma State University, Stillwater, OK 74078, USA.

*Corresponding author

RESUMEN

La aplicación de ixodicidas durante mucho tiempo ha sido la alternativa de elección para el control de la garrapata *Boophilus microplus*, sin embargo, actualmente el uso de los ixodicidas tiene una eficacia limitada en la reducción de las infestaciones debido al desarrollo de poblaciones de garrapatas resistentes. La resistencia a ixodicidas es un problema creciente que necesita ser atendido, por que en este momento está afectando la competitividad de la ganadería y la economía de miles de productores en México. La solución de este problema requiere de la implementación de programas de investigación que coadyuven a dilucidar los mecanismos moleculares de la resistencia con el fin de encontrar nuevos blancos moleculares para el diagnóstico y para el desarrollo de vacunas recombinantes. El uso reciente de nuevas herramientas genómicas y los enfoques de genética reversa, son una extraordinaria herramienta que podría ayudar en el descubrimiento de nuevos genes de interés diagnóstico ó inmunoproláctico, contribuyendo así al mejoramiento de las estrategias de control de garrapatas y los programas de mitigación de la resistencia a ixodicidas. El propósito de esta revisión es compilar diferentes tópicos actuales relacionados con la biología de las garrapatas, resistencia a los ixodicidas, y las perspectivas de la investigación genómica en la garrapata *Boophilus microplus*, iniciando con algunas consideraciones biológicas y

moleculares acerca de la nueva clasificación de este ectoparásito, hasta el análisis de la resistencia a los ixodicidas, su impacto en la industria ganadera en México y la aplicación de la genómica en la solución de problemas asociados con el control de las garrapatas mediante el diseño de nuevos métodos diagnósticos así como el desarrollo de vacunas contra garrapatas.

Palabras clave: Garrapatas; *Boophilus microplus*; Resistencia; pesticidas.

SUMMARY

The application of Ixodicides has been considered for a long time the alternative for control of the cattle tick *Boophilus microplus*, however, its use is currently limited in reducing tick infestations, due to the appearance of resistant field tick populations. Ixodicide resistance is a growing problem that needs to be attended, because, it is currently affecting the competitiveness of the Mexican cattle industry in general and in particular the income of cattle producers. The solution to this problem needs to increase the budget dedicated to basic research in order to elucidate the molecular mechanisms of ixodicide resistance leading to the discovery of new molecular targets for ixodicide resistance detection and recombinant vaccine development. The recent use of new genomic tools, as well as reverse genetics

approaches, will provide an extraordinary contribution to the improvement of tick control strategies and ixodicide resistance mitigation programs. The aim of the present review is to make a compilation of different topics related with acaricide resistance in the cattle tick *Boophilus microplus*, starting with some biological and molecular considerations on its new classification, to the analysis of ixodicide resistance,

INTRODUCCIÓN

Las garrapatas se han adaptado a la mayoría de los nichos terrestres del planeta y se han especializado en alimentarse de sangre de mamíferos, aves y reptiles (Castro *et al.*, 2007); la adaptación evolutiva de las garrapatas a la hematofagia, es la principal razón por la que producen grandes pérdidas económicas, sin embargo, el mayor impacto de las infestaciones por garrapatas sobre los animales y el hombre es a través de los patógenos que ellas transmiten. Se consideran responsables de más de 100, 000 casos de enfermedades en humanos, y en animales salvajes y domésticos son los vectores más importantes de patógenos causantes de enfermedades. A nivel mundial, son los segundos vectores más importantes de enfermedades en humanos después de los mosquitos (de la Fuente *et al.*, 2008).

Las garrapatas que integran a las familias *Argasidae* e *Ixodidae* son un grupo de artrópodos hematófagos de gran importancia en el ámbito de la salud humana y animal, por que actúan como reservorio de organismos patógenos que incluyen importantes géneros de protozoarios como (*Babesia* spp y *Theileria* spp.), bacterias (*Rickettsia* spp., *Ehrlichia* spp y *Anaplasma* spp), virus (Nairovirus, Flavivirus y Asfavirus) y nematodos (*Acanthocheilonema*) (de la Fuente *et al.*, 2008).

En las regiones tropicales y subtropicales del mundo las garrapatas son uno de los principales ectoparásitos que causan pérdidas económicas en la ganadería bovina. Específicamente *Boophilus microplus* causa daños directos debido a la acción de las picaduras (Buczen y Bartozic, 2006) y daños indirectos ocasionados por la transmisión de tres agentes etiológicos: *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* y *Anaplasma marginale* (Jonsson *et al.*, 2008).

En EUA antes de la erradicación de los vectores *Boophilus microplus* y *Boophilus annulatus*, las pérdidas económicas indirectas por la babesiosis fueron estimadas en \$130.5 millones de dólares (lo que hoy día serían \$3 mil millones de dólares). Si las garrapatas no hubieran sido erradicadas de EUA., las pérdidas de la industria ganadera a causa de las

its impact on the Mexican cattle industry and the perspective of the genomic research in order to solve the problems associated to tick control, new diagnostic tools and development of tick vaccines.

Key Words: Ticks; *Boophilus microplus*; resistance; pesticides.

garrapatas serían aproximadamente de \$1,000 millones de dólares anuales (Bram *et al.*, 2002; George *et al.*, 2002). Actualmente, la Comisión de Salud de Animal en Texas (TAHC) ha ampliado la zona cuarentenaria preventiva en el sur de Texas, después de detectar la presencia de garrapatas resistentes en ganado y fauna silvestre en 139 zonas de pastizales (George *et al.*, 2008).

El objetivo de esta revisión, es contribuir con la discusión de los temas de actualidad sobre la garrapata *Boophilus microplus*, a la vez que se proporciona una referencia para quienes están interesados en la problemática actual de la resistencia a ixodicidas de las garrapatas así como las perspectivas de la investigación genómica en México.

Consideraciones taxonómicas de las garrapatas

Las garrapatas se dividen por sus características morfológicas en tres familias: *Ixodidae* conocidas como garrapatas duras, *Argasidae* o garrapatas blandas y *Nuttalliellidae*, representada por el género monoespecífico *Nuttalliella*, que posee características intermedias de las dos familias principales (Klompen *et al.*, 1996; Keiras y Durden, 2001; Horak *et al.*, 2002; Barker y Murrell, 2004).

Se reconoce la existencia de un total de 899 nombres que integran la lista de los géneros y especies válidos de garrapatas identificadas en el mundo (Barker y Murrell, 2004). En la familia *Ixodidae* se incluyen 713 especies; en el género *Ixodes* se enlistan (249), *Amblyomma* (142), *Anomalohimalaya* (3), *Bothriocroton* (5), *Cosmiomma* (1), *Dermacentor* (36), *Haemaphysalis* (166), *Hyalomma* (25), *Margaropus* (3), *Nosomma* (1), *Rhipicentor* (2) y *Rhipicephalus* (79) incluídas las 5 especies que pertenecen al género *Boophilus*. La familia *Argasidae* conformada por 185 especies en los géneros: *Argas* (57), *Carios* (88), *Ornithodoros* (37) y *Otobius* (3) (Horak *et al.*, 2002). La familia *Nuttalliellidae* representada por el género monoespecífico *Nuttalliella* (Samir *et al.*, 1984; Horak *et al.*, 2002; Barker y Murrell, 2004).

La clasificación taxonómica de las garrapatas tradicionalmente se ha hecho mediante el empleo de

técnicas convencionales basadas en las características morfológicas, biológicas y ecológicas (Clifford *et al.*, 1964). Sin embargo, con la disposición de las técnicas moleculares y diferentes criterios de clasificación se ha propuesto con base en evidencias moleculares que el género *Boophilus* Curtice, 1891 sea incluido como subgénero de *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Murrell y Barker, 2003).

La inclusión de *Boophilus* spp. (considerada como sinónimo de *Rhipicephalus* (*Boophilus*) spp.), ha generado desacuerdos entre los científicos. Quienes consideran que *Boophilus* spp. debe ser mantenido como un género separado, se postula que debe aplicarse un enfoque polifásico como argumento principal para modificar la ubicación taxonómica de este género de garrapatas (Uilenberg y Goff, 2006), ya que este tipo de enfoque taxonómico, justifica ampliamente mantener a *Boophilus microplus* como un género separado, pero que sostiene una estrecha cercanía filogenética con *Rhipicephalus*.

Quienes defienden la inclusión de *Boophilus* como un subgénero de *Rhipicephalus*, argumentan que el nombre de *Boophilus* puede seguir siendo utilizado y reconocido para las cinco especies incluidas en este género, por lo tanto, la sinonimia de *Boophilus* con *Rhipicephalus* no da lugar a la pérdida del género *Boophilus* (Barker y Murrell, 2004). Sin embargo, esta propuesta se basa en estudios moleculares de pequeñas partes del genoma, por lo que es necesario considerar un enfoque polifásico para obtener árboles filogenéticos que representen de una mejor manera las diferencias y similitudes de ambos géneros, ya que a pesar de la estrecha cercanía genética de ambos géneros, las diferencias tanto morfológicas como biológicas (ciclos de vida), son evidentes. Además existen evidencias de que las cepas australianas poseen características biológicas que las hacen diferentes de las cepas americanas y africanas, por ejemplo, la masa de huevos de las cepas americanas es mayor que las cepas australianas, y la mayor diferencia es la obtención de progenies estériles en experimentos de cruces de cepas australianas con cepas sudafricanas y argentinas (Labruna *et al.*, 2009), con todas las implicaciones biológicas del caso.

Resistencia a los Ixodíctidos en México

En 1981 por primera vez fue documentada en México la resistencia en poblaciones de garrapatas *Boophilus microplus* a partir de fallas de control en la región de Tuxpan, Veracruz (Aguirre *et al.*, 1986). Debido al desarrollo de las poblaciones resistentes a los organofosforados en México, a partir de 1986 se permitió la comercialización de nuevos ixodíctidos como los piretroides y el amitraz; siendo los piretroides los más usados debido a su poder residual y

su estabilidad en los baños de inmersión (Aguirre, 1986); sin embargo, en 1993, después de 8 años, se detectaron los primeros casos de resistencia a piretroides en los estados de Tabasco, San Luís Potosí, Veracruz y Chiapas (Ortiz *et al.*, 1995).

A partir del establecimiento de la resistencia a los organofosforados y piretroides, se incremento el uso de amitraz como una alternativa prometedor, y a principios del 2001 se detectó en la región de los Ríos en el estado de Tabasco el primer caso de resistencia a las amidinas. El hallazgo de poblaciones multiresistentes puso en relieve un problema aún más complejo ya que la cepa, a la postre denominada "San Alfonso", fué diagnosticada con características toxicológicas de resistencia a amidinas, piretroides y organofosforados (Soberanes *et al.*, 2002). El 88% de los ranchos con garrapatas resistentes a piretroides en el sureste de México son también resistentes a organofosforados, lo que sugiere una asociación en la resistencia a las dos familias de ixodíctidos. La generación de resistencia a piretroides el caso más serio en los ranchos seguida por amidinas y organofosforados (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2007). La resistencia múltiple a los pesticidas en el territorio Mexicano continúa extendiéndose a razón de la presión que se ha ejercido mediante el empleo de ixodíctidos durante los últimos años y actualmente se han diagnosticado poblaciones resistentes de garrapatas a organofosforados, piretroides y amidinas, prácticamente en todo el país (Rosario-Cruz *et al.*, 2009) (Figura 1).



Figura 1. Distribución geográfica y situación actual de la campaña contra la garrapata *Boophilus microplus* en México (2009).

El impacto de la resistencia a los pesticidas en México.

A finales del siglo XIX los complejos problemas relacionados con las garrapatas y las enfermedades que transmiten, crearon grandes demandas en los métodos

para controlar y reducir las pérdidas en la industria ganadera, el descubrimiento y uso de los arsenicales para tratar a los bovinos y protegerlos de las garrapatas, revolucionó los programas y estrategias de control (George *et al.*, 2004). A partir de entonces, la aplicación de sustancias químicas denominadas ixodicidas o garrapaticidas, son utilizadas como el método de elección para abatir las infestaciones por *Boophilus microplus* dada su relativa rapidez para solucionar el problema (FAO, 1979).

En México como en otras partes del mundo el control de las garrapatas se ha realizado históricamente, por el uso de diversas familias químicas tales como: arsenicales, organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretroides sintéticos, amidinas y actualmente ivermectinas (George, 2000), y esto ha traído como consecuencia la aparición de poblaciones de garrapatas resistentes y la ineficiencia sistemática de los ixodicidas (Rosado-Aguilar *et al.*, 2008), lo que implica, que su disponibilidad actual y futura se encuentra comprometida debido al progresivo incremento de la resistencia y los altos costos de investigación para el descubrimiento y desarrollo de nuevas moléculas (Graf *et al.*, 2004). Aunado a esto, el escaso conocimiento sobre los mecanismos moleculares de la resistencia a los ixodicidas en la garrapata *Boophilus microplus* ha retardado el desarrollo de métodos diagnósticos que mejoren los métodos toxicológicos actualmente empleados (Rosario-Cruz *et al.*, 2009).

Las pérdidas económicas generadas por la resistencia a los ixodicidas, son difíciles de estimar debido a que el incremento de los costos de producción tienen que ver con la pérdida de peso del ganado por los hábitos hematófagos de la garrapata, así como con la mortalidad del ganado debido a la transmisión de enfermedades como la anaplasmosis y babesiosis, así como el uso de pesticidas y fármacos para abatir las poblaciones de garrapatas y las enfermedades transmitidas por este vector.

México exporta cerca de 1.3 millones de cabezas de animales en pie a los EE.UU., y a pesar de las condiciones adversas, las ganancias por concepto de la exportación de bovinos representan un negocio que genera divisas que fluctúan entre los 500 y 700 millones de dólares por año (González-Sáenz, 2007; Rhonda *et al.*, 2004), el cual, se ve seriamente amenazado por la resistencia de las garrapatas a los pesticidas, por lo que la presencia de este fenómeno se ha convertido en una emergencia sanitaria de fuerte impacto para la movilización y comercialización del ganado que se exporta a los EE.UU. debido a la reciente documentación de brotes de infestaciones por garrapatas resistentes en los Estados Unidos (Miller, 2007). Si las garrapatas no pueden ser erradicadas

debido a la resistencia a los pesticidas, los productores y exportadores enfrentarían la dificultad de movilizar a los animales por el país debido a las estaciones de inspección sanitaria y al rechazo de los lotes de ganado mexicano por los inspectores del Departamento de Agricultura (USDA) de los EE.UU. por lo que el futuro de la importación y exportación de ganado podría dejar de ser un negocio viable (George, 2008).

Las bases genéticas de la resistencia a los pesticidas

La resistencia a pesticidas, es una condición genética que le confiere a una población de garrapatas, la capacidad para adaptarse exitosamente a un ambiente tóxico a partir de un proceso de selección promovido en la naturaleza (por genes asociados con la hidrólisis de compuestos alelopáticos) y/o artificialmente (por la aplicación de pesticidas) (Rosario-Cruz *et al.*, 2009).

Derivado de esta definición, el fenómeno de resistencia a los garrapaticidas puede entenderse como un importante ejemplo de “recreación” de la selección natural (Ffrench-Constan *et al.*, 2004), que sirve como un excelente modelo biológico para el estudio de las adaptaciones evolutivas en individuos pertenecientes a poblaciones de artrópodos sometidos a una constante presión de selección por el uso constante de pesticidas (Palumbi, 2001).

En la naturaleza este proceso de coevolución dirigido por las interacciones aleloquímicas entre las plantas y los artrópodos ha tomado millones de años (Wheat *et al.*, 2007) y como resultado de la interacción recíproca entre estos dos grupos de organismos (Rauscher, 2001), los artrópodos han seleccionado dentro de sus genomas, las características que le han conferido una ventaja evolutiva para garantizar la sobrevivencia de la especie. Es decir, estas moléculas como toxinas y repelentes producidas por las plantas y que funcionan como mecanismos de defensa contra los insectos herbívoros (Kessler y Baldwin, 2002; Wittstock y Gershenson, 2002), han desarrollado en los artrópodos complejos mecanismos de detoxificación para inhibir la toxicidad potencial de la planta de la cual se alimentan (Ranson *et al.*, 2002), una especie de resistencia debida a la exposición natural a los metabolitos producidos por las plantas.

En contraste con el gradual proceso de evolución de la resistencia, el desarrollo de resistencia a los ixodicidas ha sido extremadamente rápido (Davey *et al.*, 2008) esto obedece a que los insectos pueden utilizar los mecanismos previamente desarrollados como estrategias de defensa (Howe y Jander, 2008), y por la analogía estructural entre los metabolitos secundarios de las plantas y los pesticidas (Isman, 2006; Mencke, 2006).

El desarrollo de la resistencia a los productos químicos depende de las presiones evolutivas y de constantes ajustes (Wheat *et al.*, 2007), que involucran factores de variabilidad genética, causada por mutaciones al azar ó rearrreglos genéticos; que son seleccionados por el uso constante de los pesticidas, permitiendo de esta manera, la reproducción de individuos con el rasgo de resistencia (Miller *et al.*, 2007) y la concomitante aparición de la resistencia.

La resistencia ocurre cuando las mutaciones que ocurren de manera natural, le permiten a una pequeña proporción de la población (alrededor de 1 en 1 000 000 de individuos) resistir y sobrevivir a los efectos de los productos químicos empleados como pesticidas (Roush, 1993). Antes de la aplicación de un ixodocida a una población de garrapatas, los individuos con alelos que confieren resistencia son escasos, por lo tanto, la mayoría de individuos son susceptibles. Cuando un ixodocida es aplicado los individuos con alelos resistentes tienen una ventaja adaptativa; sobreviven al tratamiento con el ixodocida, se reproducen y dan origen a una nueva generación de garrapatas también resistentes. A medida que nuevas aplicaciones del tratamiento, son realizadas, los individuos susceptibles son eliminados de la población y como resultado predominan los individuos resistentes. Si esta ventaja es mantenida aun con la continua exposición del ixodocida, los individuos resistentes se reproducen y los cambios genéticos que confieren resistencia se transfieren a su descendencia de modo que llegan a conformar poblaciones de garrapatas resistentes. Como consecuencia del incremento del número de individuos resistentes, la eficacia del producto disminuye.

Mecanismos de resistencia en *Boophilus microplus*

La resistencia a los ixodocidas puede ocurrir por detoxificación metabólica y/o modificación del sitio blanco (Rosario-Cruz *et al.*, 2009). La resistencia metabólica es predominantemente causada por la actividad elevada de enzimas agrupadas en familias multigénicas tales como: citocromo P450, glutatión-s-transferasas y carboxilesterasas (Miller *et al.*, 2008; Baffi *et al.*, 2008), las cuales degradan y/ó secuestran las moléculas de pesticidas dependiendo de que sistema enzimático ó familia de pesticidas esté involucrada. En general se reconoce, la participación de mecanismos de sobreexpresión de esterases involucradas en la resistencia a organofosforados, sin embargo se ha expresado al menos una esterasa de la cepa Coatzacoalcos, involucrada en la resistencia a piretroides sintéticos, en especial la cipermetrina. La cepa Coatzacoalcos ha sido caracterizada toxicológicamente por el bioensayo de paquete de larvas (Ortiz *et al.*, 1995) y su mecanismo molecular ha sido dilucidado. Esta cepa posee un incremento

significativo de la actividad general de esterases así como de hidrólisis de la permetrina, lo cual sugiere la participación de mecanismos metabólicos mediados por esterases asociados con la resistencia a permetrina (Pruet *et al.*, 2002), que son el resultado de eventos de duplicación del gen CzEST9 de la cepa Coatzacoalcos, que conduce a la sobreexpresión de esta esterasa en particular (Jamroz *et al.*, 2000). Actualmente, el gen que codifica a esta esterasa ha sido secuenciado a partir del material genético de la cepa Coatzacoalcos y la proteína de 62.8 Kd codificada por este gen se sugiere que es la CzEST9 (Pruet *et al.*, 2002), asociada con la resistencia a la permetrina, ya que es interesante anotar que la cepa Coatzacoalcos, no posee la mutación tipo *Kdr* encontrada en cepas Mexicanas, lo cual sugiere que existen dos mecanismos de resistencia a los piretroides actuando de manera independiente, aunque el mecanismo más común está asociado con la presencia de la mutación *Kdr* (Rosario-Cruz *et al.*, 2005).

Este mecanismo, consiste en la presencia de una mutación en el gen del canal de sodio que le confiere al canal la incapacidad de unión con el pesticida, inhibiendo de esta manera su efecto tóxico, debido a la modificación estereoquímica de la estructura del canal de sodio. El canal de sodio es el sitio blanco de los piretroides, por esta razón a este mecanismo se le conoce como modificación del sitio blanco o resistencia tipo *Kdr* por su denominación en inglés (Knock down resistance) y es uno de los mecanismos mejor documentados en insectos. En *B. microplus* se ha documentado la substitución de una fenilalanina por una isoleucina (Phe-Ile) en el gen del canal de sodio de cepas mexicanas, localizada en el dominio III del segmento 6 (III-S6), la cual confiere resistencia a la familia de los piretroides sintéticos (He *et al.*, 1999).

Recientemente en este mismo gen se ha encontrado una nueva mutación en el gen del canal de sodio que produce una substitución de una leucina por una isoleucina (Le-Ile) en la posición 190, localizada en el puente que une los segmentos 4 y 5 del dominio II (II-S4-5) del canal de sodio de cepas Australianas, semejante a la encontrada en *Bemisia tabaci*, pero nunca antes fue identificada en garrapatas (Morgan *et al.*, 2009).

El mecanismo de modificación del sitio blanco (Tipo *Kdr*), es el más documentado en insectos vectores de enfermedades y otras especies de artrópodos, y se encuentra presente en *B. microplus*, en donde se ha demostrado su papel y contribución en la resistencia a los piretroides sintéticos (Rosario-Cruz *et al.*, 2005).

Estos hallazgos han sido confirmados mediante experimentos basados en las diferencias en la temperatura de fusión (Tm), de fragmentos de DNA alelo específicos provenientes de larvas individuales,

provenientes de México y de Australia, en las cuales se ha encontrado de manera exclusiva la sustitución II-S4-5 en las cepas australianas y la sustitución III-S6 únicamente en las cepas Mexicanas (Chen *et al.*, 2009).

Esto demuestra que por lo menos dos diferentes mecanismos de resistencia basados en la presencia de sustituciones (Phe-Ile y Le-Ile) localizadas en diferentes posiciones de la estructura del canal de sodio, se han desarrollado de manera independiente entre cepas australianas y mexicanas de *B. microplus*.

Otra modificación del sitio blanco ha sido estudiada en la acetilcolinesterasa de la garrapata *B. microplus* en la cual se ha encontrado una sustitución de una glutamina por una arginina en el gen de la acetilcolinesterasa 3, probablemente asociada con la resistencia a compuestos de la familia de organofosforados. (Temeyer *et al.*, 2007). En esencia la resistencia en la garrapata *B. microplus*, puede ser metabólica ó por la modificación del sitio blanco, y ambos mecanismos han sido ampliamente documentados, la penetración reducida del pesticida al través de la cutícula se ha estudiado pero no se han encontrado evidencias de que demuestren su eficacia como mecanismo de resistencia.

Diagnóstico de la resistencia en *Boophilus microplus*.

La falta de eficiencia de los ixodicidas que se aplican al ganado para controlar las infestaciones por garrapatas *Boophilus microplus* es un indicio de que se han seleccionado los genes que confieren resistencia a los individuos de esas poblaciones de garrapatas, sin embargo, la detección de la presentación del fenómeno requieren de técnicas y metodologías que nos permitan monitorear el problema con el fin de poder adoptar estrategias para controlar las poblaciones de garrapatas, prevenir la diseminación de garrapatas resistentes y disminuir las pérdidas económicas.

Existen diferentes métodos de diagnóstico que se han propuesto para la evaluación de la resistencia, los métodos actuales son bioensayos que consisten en la exposición de garrapatas a productos garrapaticidas para cuantificar su efecto toxicológico, comparando la eficacia de el producto en relación a una cepa sensible y una cepa resistente (FAO, 1971).

Los bioensayos entre los que destacan la prueba de inmersión de garrapatas adultas (PIA), la prueba de inmersión de larvas (PIL) y la prueba de paquete de larvas (PPL) son herramientas de utilidad que permiten identificar y tipificar el problema de la resistencia a ixodicidas, sin embargo, poseen serias limitaciones como su escasa sensibilidad para detectar alelos de

resistencia presentes en la población, requieren de una gran cantidad de material biológico y se requieren varias semanas para obtener resultados. Además, tales pruebas no proporcionan información individual de los organismos ya que para el momento cuando la resistencia es diagnosticada por estos métodos, la proporción de alelos resistentes en la población ya se encuentra altamente diseminada.

En busca de mejores alternativas para diagnosticar la resistencia se han realizado estudios encaminados a dilucidar las bases moleculares de la resistencia (Guerrero *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2008; Rosario *et al.*, 2005) que desarrollan las garrapatas para contrarrestar la intoxicación producida por la acción de los pesticidas utilizados para su control, conocimiento que ha permitido el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico basados en estrategias moleculares, rápidos, altamente sensibles y específicos en comparación con los bioensayos (Guerrero y Pruet, 2002). El progreso en el desarrollo de diagnósticos moleculares actualmente es alentador debido a que han mostrado ser lo suficientemente sensibles y específicos para diferenciar alelos mutantes usando un solo espécimen, lo cual es de gran utilidad para diagnosticar de forma rápida y eficiente la presencia de mutaciones responsables de la resistencia, además de determinar frecuencias bajas de alelos que confieren resistencia en poblaciones de campo (Rosario-Cruz *et al.*, 2005).

Vacunas contra garrapatas

El problema de resistencia de garrapatas a los ixodicidas ha motivado el interés por el desarrollo de vacunas contra garrapatas como una alternativa para evitar la infestación por estos artrópodos y a la vez bloquear la transmisión de enfermedades que transmiten a sus hospedadores. Las garrapatas, a diferencia de otros ectoparásitos, se alimentan de sangre lentamente manteniéndose adheridas al hospedador por varios días, esto las pone en contacto con la respuesta inmune, provocando una asociación entre el epitelio intestinal de la garrapata y los anticuerpos del hospedador (Willadsen, 2001).

La identificación del antígeno Bm86 y posteriormente el Bm95 en células intestinales de la garrapata *B. microplus* son el primer ejemplo de antígenos utilizados en vacunas para el control de garrapatas. La respuesta a la vacunación con estos antígenos produce anticuerpos que al estar en contacto con la garrapata provocan lisis de las células intestinales, trayendo como consecuencia la reducción en la sobrevivencia del artrópodo, disminución del peso y de la fertilidad (Willadsen y Kemp, 1998; de la Fuente, 2000; García-García *et al.*, 2000).

Mulenga y colaboradores (1999) identificaron una proteína de 29 kDa mediante mapeo inmunológico de antígenos a partir de glándulas salivales de *Haemaphysalis longicornis*. La inmunización de conejos con la proteína recombinante p29 confirió una reducción del 40 y 56 % en la ingurgitación y mortalidad de larvas y ninfas respectivamente.

El antígeno p64, es una proteína de 15 kDa que fue identificada en la garrapata de tres hospedadores *Rhipicephalus appendiculatus*, la función putativa de esta proteína esta relacionada al cemento y su papel en la adherencia y alimentación de garrapatas. El efecto de la inmunización con esta proteína en cobayos infestados con ninfas y adultos fue la disminución de la infestación de 48 y 70 % respectivamente (Revisado por de la Fuente y Kocan, 2003).

El factor limitante mas importante en el desarrollo de las vacunas contra garrapatas es la identificación de los antígenos, ya que tradicionalmente se han identificado mediante la evaluación de proteínas derivadas de extractos crudos utilizados para inmunizar animales que son sometidos posteriormente a infestaciones experimentales masivas con garrapatas. La purificación de una proteína a partir de un extracto total es un proceso largo y laborioso, por lo que en la actualidad, el uso de las bases de datos conteniendo los genomas facilitan el proceso reverso de determinar la función putativa de los genes de interés y observar el efecto de la inmunización con proteínas consideradas importantes para la función y sobrevivencia en experimentos de vacunación contra garrapatas (Wang y Nuttall, 1999).

El avance de las ciencias genómicas ha permitido la incorporación de técnicas masivas para el análisis e identificación de proteínas útiles, mediante ensayos de inmunización de bibliotecas genéticas de expresión (ELI) (Almazán *et al.*, 2003). Recientemente el silenciamiento de genes como una herramienta de la genómica funcional, que además de ayudarnos a predecir la función putativa de las proteínas codificadas por los genes de interés, nos permite observar el efecto del silenciamiento en las garrapatas. Esto nos permite hacer inferencias sobre la importancia de la función de la proteína en la fisiología del artrópodo, tal es el caso del gen del “subolesin” el cual fue descubierto en material genético de *Ixodes escapularis* como un antígeno protector y actualmente se sabe que es un gen conservado evolutivamente y también se ha identificado en *Aedes albopictus* (Canales *et al.*, 2009).

Las secuencias del subolesin de mosquitos y garrapatas, se sabe por los alineamientos múltiples

que mantiene epitopos conservados, y los experimentos de vacunación han demostrado que la inmunización con las proteínas ortologas del subolesin de mosquitos y garrapatas reducen significativamente las infestaciones y el peso de las garrapatas *Ixodes escapularis* de la misma manera. Por esta razón existen resultados preliminares que apuntan hacia el desarrollo de vacunas diseñadas para el control de múltiples vectores artrópodos utilizando las proteínas ortologas del subolesin, aunque se sugiere el uso de antígenos múltiples para producir una vacuna efectiva (Canales *et al.*, 2009).

Es importante señalar que las vacunas multiantigénicas han sido propuestas como una alternativa basadas en la premisa de que muchos antígenos proveerán una mejor protección, aunque en la práctica hay muchos ejemplos experimentales de que esto no es del todo cierto ya que “los resultados han sido escasos y contradictorios por lo que se sugiere que debe prestarse mayor atención a la eficacia de las vacunas multiantigénicas ya que deben tener un mayor sustento experimental del que hasta ahora han merecido” (Willandsen, 2008).

La interferencia de ARN (iARN) en garrapatas

La iARN o la inducción del silenciamiento de un gen específico se realiza mediante la introducción de cadenas cortas de ARN de doble cadena (ARNdc) del gen blanco mediante diferentes vías (Sorensen *et al.*, 2003). Esta metodología fue descrita en el nematodo *Caenorhabditis elegans* (Fire *et al.*, 1998). El análisis de la función génica mediante iARN fue publicado por primera vez en garrapatas por Aljamali *et al.* (2002). Posteriormente, la iARN fue utilizada en el tamizado de antígenos protectores contra garrapatas *I. scapularis* (de la Fuente *et al.*, 2005) y en la evaluación de la función del gen 4D8 en garrapatas *I. scapularis*, *D. variabilis*, *D. marginatus*, *A. americanum* y *R. sanguineus* mediante la inyección de cadenas cortas de ARNdc en la hemolinfa, estos estudios permitieron conocer la función de 4D8 en la modulación de la alimentación y reproducción de estas especies de garrapatas (de la Fuente *et al.*, 2006).

Debido a que la iARN representa una metodología rápida y sencilla en la identificación de antígenos protectores contra artrópodos y a los excelentes resultados obtenidos en garrapatas, los estudios de la genómica funcional junto con el uso de la información existente en las bases de datos de las secuencias de etiquetas expresadas (ESTs), la bioinformática, el análisis del transcriptoma y la proteómica, además del tamizado completo de genotecas de tejidos de artrópodos mediante herramientas como la iARN proveerán información valiosa de manera rápida y

eficiente en la identificación de antígenos que podrán incluirse en el desarrollo de vacunas que impidan o disminuyan el parasitismo por artrópodos de importancia veterinaria.

CONCLUSIONES

La discusión sobre la reclasificación de *Boophilus microplus*, va más allá de la simple discrepancia de opiniones en cuanto a la metodología empleada para el análisis filogenético de las poblaciones de garrapatas, dado que aun cuando desde el punto de vista molecular se consideren la misma especie, desde el punto de vista biológico, no podemos decir, dadas las evidencias notables de infertilidad de la progenie, que se trate de la misma especie. Por lo tanto y hasta no resolver la verdadera posición taxonómica de las cepas Australianas de *Boophilus microplus*, se debe tomar con cautela el cambio del nombre y su reclasificación taxonómica.

Las garrapatas son consideradas a nivel mundial como los primeros y más importantes vectores de patógenos causantes de enfermedades en animales salvajes y domésticos. Por esta razón, el creciente problema de la resistencia en México, requiere de investigación que genere conocimientos profundos sobre los mecanismos de la resistencia, que puedan ser útiles como herramientas para desarrollar un rápido diagnóstico y la predicción de la aparición de la resistencia, además de la distribución de los alelos de resistencia en las poblaciones de garrapatas, para poder establecer y diseñar mejores programas de control estratégico.

La resistencia a los acaricidas, impacta directamente la competitividad de los productores desde la perspectiva económica ya que la presencia de resistencia en los ranchos implica los gastos inherentes al control no solo de las garrapatas sino de las enfermedades transmitidas por estos ectoparásitos. Se requieren buenos programas de control para mitigar los efectos de la presencia de garrapatas resistentes, para disminuir como consecuencia la prevalencia de las enfermedades transmitidas por este vector, sin afectar la estabilidad enzoótica.

La resistencia es una condición genética y preadaptativa que implica la presencia de una colección de genes dentro de la población de artrópodos cuya función principal es la detoxificación de las estructuras químicas utilizadas para el control de las garrapatas, lo cual explica la rápida aparición de la resistencia cuando las poblaciones se exponen a ambientes tóxicos, ya que estas condiciones eliminan eficientemente las fracciones alélicas asociadas con la susceptibilidad, permitiendo la sobrevivencia de los organismos mejores adaptados a esta nueva condición

de resistencia, es decir, las fracciones alélicas asociadas con la resistencia a los acaricidas.

Por lo menos dos diferentes mecanismos de resistencia basados en la presencia de sustituciones (Phe-Ile y Le-Ile) localizadas en diferentes posiciones de la estructura del canal de sodio, se han desarrollado de manera independiente entre cepas Australianas y Mexicanas de *B. microplus* resistentes a la familia de los piretroides

Los avances en las ciencias genómicas, acelerarán el desarrollo de nuevas herramientas diagnósticas e inmunoproliféricas, en la medida en que se encuentren nuevos candidatos diagnósticos y vacunales que ayuden a prevenir la resistencia, inmunizar al ganado, disminuir las enfermedades transmitidas y mejorar las estrategias y decisiones ejecutivas para el diseño de programas que coadyuven a mejorar los programas de mitigación de la resistencia en las regiones tropicales y subtropicales de México y de otras partes del mundo.

Es indispensable que se de prioridad a los proyectos encaminados a descifrar los genomas de los parásitos importantes que afectan a la ganadería Mexicana, en este caso el genoma de *B. microplus*, para disminuir los costos de la investigación ya que el conocimiento de los genomas facilita la generación de tecnologías a partir de las bases de datos que se generan a partir de este tipo de proyectos. Tenemos que dar un pequeño paso hacia la consecución de este tipo de conocimientos, por el bien de la Ciencia, del país y de la industria ganadera de México y del mundo.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada a la MC Delia Inés Domínguez García inscrita en el programa doctoral de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana. Este trabajo fue parcialmente financiado por el proyecto 90195 del programa de CONACYT de apoyos complementarios otorgado a Dr. Rodrigo Rosario Cruz.

REFERENCIAS

- Aguirre, E.J., Sobrino, L., Santamaría, V.M., Aburto, S., Roman, E., Hernandez, M., Ortiz, M., Ortiz, N.A. 1986. Resistencia de garrapatas en Mexico. In Seminario Internacional de Parasitología Animal, Memorias (ed. Cavazzani, A.H., Garcia, Z.), 282–306. Cuernavaca, Morelos, México.
- Aljamali, M.N., Sauer, J.R., Essenberg, R.C. 2002. RNA interference: applicability in tick

- research. *Experimental and Applied Acarology* 28:89-96.
- Almazán, C., Kocan, M.K., Bergman, K.D., García-García, C.J., Blouin, F.E., de la Fuente, J. 2003. Identification of protective antigens for the control of *Ixodes scapularis* infestations using cDNA expression library immunization. *Vaccine*. 21:1492-1501.
- Baffi, M.A., de Souza, G.R., de Sousa, C.S., Ceron, C.R., Bonetti, A.M. 2008. Esterase enzymes involved in pyrethroid and organophosphate resistance in a Brazilian population of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari, Ixodidae). *Molecular and Biochemical Parasitology*. 160(1):70-73.
- Barker, S.C., Murrell, A. 2004. Systematics and evolution of ticks with a list of valid genus and species names. *Parasitology*. 129:15-36.
- Bram, R.A., George, J.E., Reichard, R.E., Tabachnick, W.J. 2002. Threat of foreign arthropod-borne pathogens to livestock in the United States. *Journal of Medical Entomology*. 39:405-416.
- Buczek, A., Bartosik, K. 2006. [Tick-host interactions]. *Przegląd Epidemiologiczny*. 1:28-33.
- Canales, M., Naranjo, V., Almazán, C., Molina, R., Tsuruta, S.A., Szabó, M.P., Manzano-Roman, R., Pérez de la Lastra, J.M., Kocan, K.M., Jiménez, M.I., Lucientes, J., Villar, M., de la Fuente, J. 2009. Conservation and immunogenicity of the mosquito ortholog of the tick-protective antigen, subolesin. *Parasitology Research*. 105:97-111.
- Castro, M.B., Wright, S.A. 2007. Vertebrate hosts of *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae) in California. *Journal of Vector Ecology*. 32:140-9.
- Chen AC, He H, Temeyer KB, Jones S, Green P, Barker SC 2009. A survey of *Rhipicephalus microplus* populations for mutations associated with pyrethroid resistance *Journal of Economical Entomology* 102:373-380.
- Clifford, C.M., Kohls, G.M., Sonenshine, D.E. 1964. The systematics of the subfamily Ornithodorinae (Acarina: Argasidae) I. The genera and subgenera. *Annals of the Entomological Society of America* 57:429-437.
- Davey, R.B., Miller, R.J., George J.E. 2008. Efficacy of amitraz applied as a dip against an amitraz-resistant strain of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) infested on cattle. *Veterinary Parasitology*. 152:127-35.
- de la Fuente J. 2000. Immunological control of ticks through vaccination with *Boophilus microplus* gut antigens. *Annals of the New York Academy of Science*. 916:617-621.
- de la Fuente J, Kocan, K.M. 2003. Advances in the identification and characterization of protective antigens for development of recombinant vaccines against tick infestations. *Expert Review of Vaccines*; 2:583-93.
- de la Fuente J, Almazán, C, Blouin, E.F., Naranjo, V., Kocan, K.M. 2005. RNA interference screening in ticks for identification of protective antigens. *Parasitology Research*; 96:137-141.
- de la Fuente, J., Almazán, C., Blas-Machado, U., Naranjo, V., Manglod, A., Blouin, E., Gortazar, C., Tocan, K.M. 2006. The tick protective antigen 4D8, is a conserved protein involved in modulation of tick feeding and reproduction. *Vaccine*. 24:4082-95.
- de la Fuente, J., Estrada-Pena, A., Venzal, J.M., Kocan, K.M., Sonenshine, D.E. 2008. Overview: Ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals. *Frontiers in Bioscience*. 13:6938-6946.
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. 1971. Recommended methods for the detection and measurement of resistance of agricultural pests to pesticides—tentative method for larvae of cattle ticks, *Boophilus microplus* spp. FAO method No. 7. *FAO Plant Proceedings Bulletin*. 19:15–18.
- Ffrench-Constant, R.H., Daborn, P.J., Le Goff, G. 2004. The genetics and genomics of insecticide resistance. *Trends in Genetics*. 20:163-70.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., Mello, C.C. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*; 391:806-811.
- Garcia-Garcia, J.C., Montero, C., Redondo, M., Vargas, M., Canales, M., Boue, O.,

- Rodriguez, M., Joglar, M., Machado, H., Gonzalez, I., Valdes, M., Mendez, L., de la Fuente, J. 2000. Control of ticks resistant to immunization with Bm86 in cattle vaccinated with the recombinant antigen Bm95 isolated from the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Vaccine*; 18:2275-2287.
- George, J.E. 2000. Present and future technologies for tick control. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 916:583-588.
- George, J.E., Davey, R.B., Pound, J.M. 2002. Introduced ticks and tick-borne diseases: the threat and approaches to eradication. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 18:401-416.
- George, J.E., Pound, J.M., Davey, R.B. 2004. Chemical control of ticks on cattle and the resistance of these parasites to acaricides. *Parasitology*. 129:353-366.
- George, J.E. 2008. The effects of global change on the threat of exotic arthropods and arthropod-borne pathogens to livestock in the United States. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1149:249-254.
- González-Sáenz, J.R. 2007. Importancia de las garrapatas *Boophilus* en la exportación de ganado. In *Simposium Internacional: Garrapatas, Babesiosis y Anaplasmosis*. Cd. Victoria, Tamaulipas. México. 30-34.
- Graf, J.F., Gogolewski, R., Leach-Bing, N., Sabatini, G.A., Molento, M.B., Bordin, E.L., Arantes, G.J. 2004. Tick control: An industry point of view. *Parasitology*. 129:427- 442.
- Guerrero, F.D., Bendele, K.G., Chen, A.C., Li, A.Y., Miller, R.J., Pleasance, E., Varhol, R., Rousseau, M.E., Nene, V.M. 2007. Serial analysis of gene expression in the southern cattle tick following acaricide treatment of larvae from organophosphate resistant and susceptible strains. *Insect Molecular Biology*. 16:49-60.
- Guerrero, F.D., Pruet, J.H., Li, A.Y. 2002. Molecular and biochemical diagnosis of esterase-mediated pyrethroid resistance in a Mexican strain of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Experimental and Applied Acarology*. 28:257-264.
- He, H., Chen, A.C., Davey, R.B., Ivie, G.W., George, J.E. 1999. Identification of a point mutation in the para-type sodium channel gene from a pyrethroid-resistant cattle tick. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 261:558-561.
- Horak, I.G., Camicas, J.L., Keirans, J.E. 2002. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida): a world list of valid tick names. *Experimental and Applied Acarology*. 28:27-54.
- Howe, G.A., Jander, G. 2008. Plant immunity to insect herbivores. *Annual Review of Plant Biology*. 59:41-66
- Isman, M.B. 2006. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annual Review of Entomology*. 51:45-66.
- Jamroz, R.C., Guerrero, F.D., Pruet, J.H., Oehler, D.D., Miller, R.J. 2000. Molecular and biochemical survey of acaricide resistance mechanisms in larvae from Mexican strains of the southern cattle tick, *Boophilus microplus*. *Journal of insect physiology*. 46:685-695.
- Jonsson, N.N., Bock, R.E., Jorgensen, W.K. 2008. Productivity and health effects of anaplasmosis and babesiosis on *Bos indicus* cattle and their crosses, and the effects of differing intensity of tick control in Australia. *Veterinary Parasitology*. 155:1-9.
- Keirans, J.E., Durden, L.A. 2001. Invasion: exotic ticks (Acari: Argasidae, Ixodidae) imported into the United States. A review and new records. *Journal of Medical Entomology*. 38:850-861.
- Kessler, A., Baldwin, I.T. 2002. Plant responses to insect herbivory: the emerging molecular analysis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 53:299-328.
- Klompen, J.S.H., Black, W.C.I.V., Keirans, J.E., Oliver, J.H. Jr. 1996. Evolution of ticks. *Annual Review of Entomology*. 41:141-161.
- Labruna, B.M., Naranjo, V., Mangold, J.A., Thompson, C., Estrada-Peña, A., Guglielmone, A.A., Jongejan F., and de la Fuente, J. 2009. Allopatric speciation in ticks: genetic and reproductive divergence between geographic strains of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *BMC Evolutionary Biology* 9:46-58.

- Mencke, N. 2006. Acaricidal and repellent properties of permethrin, its role in reducing transmission of vector-borne pathogens. *Parassitologia*. 48:139-140.
- Miller, R.J., Li, A.Y., Tijerina, M., Davey, R.B., George, J.E. 2008. Differential response to diazinon and coumaphos in a strain of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) collected in Mexico. *Journal of Medical Entomology*. 45:905-911.
- Miller, R.J., Davey, R.B., White, W.H., George, J.E. 2007. A comparison of three bioassay techniques to determine amitraz susceptibility in *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*. 44:283-294.
- Morgan, J.A., Corley, S.W., Jackson, L.A., Lew-Tabor, A.E., Moolhuijzen, P.M., Jonsson, N.N. 2009. Identification of a mutation in the para-sodium channel gene of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* associated with resistance to synthetic pyrethroid acaricides. *International of Parasitology*. 39:775-779.
- Mulenga, A., Sugimoto, C., Sako, Y., Ohashi, K., Musoke, A., Shubash, M., Onuma, M. 1999. Molecular characterization of a *Haemaphysalis longicornis* tick salivary gland-associated 29-kilodalton protein and its effect as a vaccine against tick infestation in rabbits. *Infection and Immunity*. 67:1652-1658.
- Murrell, A., Barker, S.C. 2003. Synonymy of *Boophilus* Curtice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). *Systematic Parasitology*. 56:169-172.
- Ortiz, E.M., Santamaria, E.M., Fragoso, S.H. 1994. Resistencia en garrapatas *Boophilus microplus*, a los ixodicidas en México. In XIV Pan American Congress on Veterinary Sciences, Proceedings (ed. Perez Trujillo, J.M., González Padilla, E.). 473-474. Acapulco, Guerrero, México.
- Ortiz, E.M., Santamaría, V.M., Ortiz, N.A., Soberanes, C.N., Osório, M.J., Franco, B.R., Martínez, I.F., Quezada, D.R., Fragoso, S.H. 1995. Characterization of *Boophilus microplus* resistance to ixodicidas in México. In: Seminario internacional de Parasitología Animal Acapulco, Gro. México. Pp 58-66.
- Palumbi, S.R. 2001. Humans as the world's greatest evolutionary force. *Science*. 293:1786-1790.
- Pruett, J.H., Guerrero, F.D., Hernandez, R. 2002. Isolation and identification of an esterase from a Mexican strain of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Journal of Economical Entomology*. 95:1001-1007.
- Ranson, H., Claudianos, C., Ortelli, F., Abgrall, C., Hemingway, J., Sharakhova, M.V., Unger, M.F., Collins, F.H., Feyereisen, R. 2002. Evolution of supergene families associated with insecticide resistance. *Science*. 298:179-181.
- Rodríguez-Vivas, R.I., Rivas, A.L., Chowell, G., Fragoso, S.H., Rosario-Cruz, R., García, Z., Smith, S.D., Williams, J.J., Schwager, S.J. 2007. Spatial distribution of acaricide profiles (*Boophilus microplus* strains susceptible or resistant to acaricides) in southeastern Mexico. *Veterinary Parasitology*. 146:158-169.
- Rosado-Aguilar, J.A., Rodríguez-Vivas, R.I., García-Vázquez, Z., Fragoso-Sánchez, H., Ortiz-Nájera, A., Rosario-Cruz, R. 2008. Development of amitraz resistance in field populations of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) undergoing typical amitraz exposure in the Mexican tropics. *Veterinary Parasitology*. 152:349-353.
- Rosario-Cruz, R., Almazan, C., Miller, R.J., Domínguez-García, D.I., Hernández-Ortiz, R., de la Fuente, J. 2009. Genetic basis and impact of tick acaricide resistance. *Frontiers in Bioscience*. 14:2657-2665.
- Rosario-Cruz, R., Guerrero, F.D., Miller, R.J., Rodríguez-Vivas, R.I., Domínguez-García, D.I., Cornel, A.J., Hernández-Ortiz, R., George, J.E. 2005. Roles played by esterase activity and by a sodium channel mutation involved in pyrethroid resistance in populations of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) collected from Yucatan, Mexico. *Journal of Medical Entomology*. 42:1020-1025.
- Roush, R.T. 1993. Occurrence, genetics and management of insecticide resistance. *Parasitology Today*. 9:174-179.
- Rauscher, M.D. 2001. Co-evolution and plant resistance to natural enemies. *Nature*. 411:857-864.

- Samir, M., Shoura, E., Hoogstraal S.M.H., Roshdy, M.A. 1984. *Nuttalliella namaqua* (Ixodoidea: Nuttalliellidae): Female Internal Morphology. *Journal of Parasitology*. 70:114-120.
- Soberanes, C.N., Santamaria, V.M., Fragoso, S.H., Garcia, V.Z., 2002. Primer caso de resistencia al amitraz en la garrapata del ganado *Boophilus microplus* en México. *Tecnica Pecuaria en México*. 40:81-92.
- Temeyer, K.B., Pruetz, J.H., Chen, A.C. 2007. R86Q a mutation in BmAChE3 yielding a *Rhipicephalus microplus* organophosphate - insensitive acetylcholinesterase. *Journal of Medical Entomology*. 1013-1018.
- Uilenberg, G., Goff, W.L. 2006. Polyphasic Taxonomy. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1081:492-497.
- Wang, H., Nuttall, PA. 1999. Immunoglobulin-binding proteins in ticks: new target for vaccine development against a blood-feeding parasite. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 56:286-295.
- Wheat, C.W., Vogel, H., Wittstock, U., Braby, M.F., Underwood, D., Mitchell-Olds, T. 2007. The genetic basis of a plant-insect coevolutionary key innovation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104(51):20427-20431.
- Wijngaarden, P.J., van den Bosch, F., Jeger, M.J., Hoekstra, R.F. 2005. Adaptation to the cost of resistance: a model of compensation, recombination, and selection in a haploid organism. *Proceedings of Biological Sciences/The Royal Society*. 272:85-89.
- Willadsen, P., Kemp, D.H. 1998. Vaccination with concealed antigens for tick control. *Parasitology Today*. 4:196-198.
- Willadsen, P. 2001. The molecular revolution in the development of vaccines against ectoparasites. *Veterinary Parasitology*. 101:353-367.
- Willadsen, P. 2008. Antigen cocktails: Valid hypothesis or unsubstantiated hope? *Trends in Parasitology*. 24:164-167.
- Wittstock, U., Gershenzon, J. 2002. Constitutive plant toxins and their role in plant defense. *Current Opinion in Plant Biology*. 5:300-307.

Submitted June 25, 2009 – Accepted August 28, 2009

Revised received September 08, 2009