

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

“Estudio proteómico comparativo de intestinos de garrapatas
Rhipicephalus microplus resistentes y susceptibles a ivermectina”

TESIS

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

PRESENTA
ARELI LÓPEZ ESPARZA

QUERÉTARO, QRO, JUNIO 2019.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

“Estudio proteómico comparativo de intestinos de garrapatas *Rhipicephalus microplus* resistentes y susceptibles a ivermectina”

TESIS

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE
LICENCIADO EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

PRESENTA

ARELI LÓPEZ ESPARZA

DIRIGIDO POR:

Dra. GABRIELA AGUILAR TIPACAMÚ

CO-DIRIGIDO POR:

Dra. ELBA RODRÍGUEZ HERNÁNDEZ

Dra. GABRIELA AGUILAR TIPACAMÚ

PRESIDENTE

Dra. ELBA RODRÍGUEZ HERNÁNDEZ

SECRETARIO

Dra. MARÍA ELIZBETH ÁLVAREZ SÁNCHEZ

VOCAL

Dr. JUAN JOEL MOSQUEDA GUALITO

VOCAL

Dra. BERTHA ISABEL CARVAJAL GAMEZ

VOCAL

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Junio 2019
México

RESUMEN

La garrapata *Rhipicephalus microplus* es considerada el ectoparásito más importante del ganado bovino en términos de pérdidas económicas y daño a la salud animal. La utilización de químicos es el principal método de control para estas garrapatas, siendo la ivermectina (IVM) el producto preferido empleado por productores para el control de infestaciones por *R. microplus*, pero su uso indiscriminado ha favorecido la aparición de poblaciones resistentes, atribuyéndose el mecanismo de resistencia a modificaciones del sitio de acción del fármaco en la garrapata y a un aumento del metabolismo oxidativo mediado por citocromo P450, glutatión-S-transferasa, esterasas y transportadores ABC; no obstante, los mecanismos moleculares de resistencia no se conocen en su totalidad, por esto, es importante estudiar los cambios en la expresión de las proteínas en garrapatas tratadas con IVM. Herramientas proteómicas como la electroforesis bidimensional (2DE) y programas bioinformáticos (PDQuest) fueron utilizados en este trabajo para obtener el mapa proteómico del intestino de garrapatas *R. microplus* susceptibles y resistentes a IVM y determinar las diferencias en la expresión de proteínas. Los resultados indican que existe un perfil diferente en la expresión de proteínas intestinales entre las cepas comparadas; la electroforesis 2DE reveló 62 manchas comunes entre las cepas, 36 manchas únicas para la cepa susceptible y 37 para la cepa resistente con diferencias significativas en la intensidad de área. Este estudio permitirá a futuro la identificación de moléculas involucradas en el mecanismo de resistencia de *R. microplus* a la IVM y dará pauta a estrategias innovadoras que aumenten la vida útil de este químico o la producción de nuevos ixodicidas.

Palabras clave: *Rhipicephalus microplus*, ivermectina, resistencia, proteómica.

SUMMARY

The tick *Rhipicephalus microplus* is considered the most important ectoparasite of cattle in terms of economic losses and damage to animal health. The use of chemicals is the main method of control for these ticks, being ivermectin (IVM) the preferred drug used by farmers for the control of infestations by *R. microplus*, but its indiscriminate use has favored the emergence of resistant populations, attributing the mechanism of resistance to modifications in the site of action by the drug in the ticks and an increase of the oxidative metabolism mediated by cytochrome P450, glutathione-S-transferase, esterases and ABC transporters; however, the molecular mechanisms of resistance are not fully understood yet, therefore, it is important to study the changes in protein expression in ticks treated with IVM. Proteomics tools as two-dimensional electrophoresis (2DE) and bioinformatics programs (PDQuest) were used in this work to obtain the proteomic map of the intestine of *R. microplus* ticks susceptible and resistant to IVM in order to determine the differences in protein expression. The results indicate that there is a different profile in the expression of intestinal proteins between the strains compared; 2DE electrophoresis revealed 62 common spots between the strains, 36 spots unique for the susceptible strain and 37 for the resistant strain with significant differences in area intensity. This study will allow future identification of molecules involved in resistance mechanism of *R. microplus* to IVM and will provide guidelines to innovate strategies that increase the useful life of this chemical or the production of new ixodicides.

Key words: *Rhipicephalus microplus*, ivermectin, resistance, proteomics.

DEDICATORIAS

A todos mis seres queridos que me acompañaron y apoyaron durante la realización de este trabajo de investigación el cual coincidió con una experiencia de vida muy significativa y personal.

AGRADECIMIENTOS

Les doy el mayor de los agradecimientos a mis padres Patricia y Francisco, sin su educación, apoyo y amor incondicional no sería la persona que soy ahora. Gracias a todos los recursos que me han brindado puedo concluir satisfactoriamente esta etapa de mi vida profesional.

A mi hermana Sarahí, mi mejor amiga y ejemplo a seguir, por resolver todas mis dudas a lo largo de mi carrera y más importe aún por ser la persona que me impulsó a terminar este escrito con porras y regaños. Sin ti no hubiera sido posible.

Un agradecimiento especial a mi directora Dra. Gabriela A. Tipacamú, por creer en mí desde el instante que la conocí, por compartir sabios consejos referentes al ámbito profesional y emocional, y permitirme realizar estancias académicas en instituciones de prestigio.

A todo mi comité tutorial, mi co-directora Dra. Elba Rodríguez y sinodales Dra. Elizabeth Álvarez, Dr. Juan Mosqueda y Dra. Bertha Carbajal por compartir sus conocimientos, recomendaciones y tiempo otorgado.

A la Universidad Autónoma de Querétaro por concederme un Fondo de Proyectos Especiales de Rectoría (FOPER), al CONACYT Ciencia Básica CB201501257257 por el financiamiento; al CENID-INIFAP y UACM por los recursos humanos y materiales.

A MVZ. Rodrigo Morales, MVZ. Eréndira Peña, MVZ. Yunier Hernández y M. en C. Ilwikatzin Guerrero por mostrarme el valor del trabajo en equipo y compañerismo.

A Mayra González y Laura, por ser mis guías de laboratorio, sin ellas los resultados de este trabajo no existirían.

Para todos mis amigos que estuvieron a lo largo de mi carrera y proceso de titulación, por llenar esos días de diversión y amor, en especial a Quique, Moni y Toño.

ÍNDICE

Contenido

| | |
|---|------|
| RESUMEN | i |
| SUMMARY | ii |
| DEDICATORIAS..... | iii |
| AGRADECIMIENTOS..... | iv |
| ÍNDICE | v |
| ÍNDICE DE CUADROS..... | vii |
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | viii |
| I. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| II. REVISIÓN DE LITERATURA | 4 |
| 2.1 Generalidades de las garrapatas. | 4 |
| 2.1.1 Clasificación taxonómica. | 4 |
| 2.2 Características del género y especie <i>Rhipicephalus microplus</i> | 5 |
| 2.2.1 Morfología. | 5 |
| 2.2.2 Ciclo de vida. | 6 |
| 2.2.3 Distribución geográfica de <i>R. microplus</i> a nivel mundial | 8 |
| 2.2.4 Distribución geográfica de <i>R. microplus</i> en México. | 9 |
| 2.2.5 Impacto de <i>R. microplus</i> en la ganadería bovina. | 10 |
| 2.2.6 Control de <i>R. microplus</i> | 11 |
| 2.2.7 Métodos de control químico. | 12 |
| 2.2.8 Métodos de control alternativos. | 13 |
| 2.2.9 Resistencia de <i>R. microplus</i> a ixodicidas. | 15 |
| 2.3 Lactonas macrocíclicas. | 18 |
| 2.3.1 Avermectinas. | 19 |
| 2.4 Resistencia a ivermectina..... | 26 |
| 2.5 Estudios proteómicos en artrópodos y <i>R. microplus</i> | 28 |
| OBJETIVOS..... | 30 |
| HIPÓTESIS..... | 30 |
| III. METODOLOGÍA | 31 |

| | | |
|-----|--|----|
| 3.1 | Obtención de intestinos de garrapatas <i>R. microplus</i> susceptibles y resistentes a IVM. | 31 |
| 3.2 | Extracción y purificación de proteínas de intestinos de <i>R. microplus</i> | 32 |
| 3.3 | Preparación de las muestras. | 32 |
| 3.4 | Electroforesis 2DE. | 33 |
| 3.5 | Análisis de los geles de doble dimensión mediante el programa PDQuest y análisis estadístico. | 35 |
| IV. | RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 36 |
| V. | LITERATURA CITADA..... | 59 |
| VI. | APÉNDICE | 73 |

ÍNDICE DE CUADROS

| | |
|---|----|
| Cuadro 1. Ixodicidas y lactonas macrocíclicas utilizados en México para el control de garrapatas en el ganado bovino..... | 13 |
| Cuadro 2. Concentración de proteínas intestinales de <i>R. microplus</i> resistentes y susceptibles a IVM..... | 37 |
| Cuadro 3. Nivel de intensidad de área así como el promedio, desviación estándar y diferencia de intensidad de área de las manchas identificadas entre los tratamientos evaluados para los geles 2DE, pH 3-10..... | 41 |
| Cuadro 4. Análisis de la intensidad de área de las proteínas expresadas diferencialmente en los intestinos de garrapatas <i>R. microplus</i> resistentes y susceptibles a ivermectina. Geles 2DE, pH 4-7..... | 45 |
| Cuadro 5. Análisis de la intensidad de área de las proteínas expresadas diferencialmente en los intestinos de garrapatas <i>R. microplus</i> resistentes y susceptibles a ivermectina. Geles 2DE, pH 7-10..... | 51 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Distribución taxonómica de familias y subfamilias de garrapatas. | 4 |
| Figura 2. Distribución geográfica de la garrapata <i>R. microplus</i> | 9 |
| Figura 3. Situación actual de la campaña nacional para el control de la garrapata <i>R. microplus</i> | 10 |
| Figura 4. Origen y clasificación de las lactonas macrocíclicas; avermectinas y milbemicinas. | 19 |
| Figura 5. Estructura química básica de las avermectinas..... | 19 |
| Figura 6. Estructura química básica de las milbemicinas. | 19 |
| Figura 7. Estructura básica de las avermectinas y sustituyentes de los principales compuestos del grupo..... | 20 |
| Figura 8. Fórmula estructural de la Ivermectina..... | 21 |
| Figura 9. Representación sistémica de LGICs..... | 23 |
| Figura 10. Mecanismo por el cual la IVM promueve la apertura de los canales GluCl. | 24 |
| Figura 11. Curva estándar de albúmina bovina con reactivo de Bradford utilizada para la determinación de concentración de proteína de las muestras. | 36 |
| Figura 12. Análisis de integridad de proteínas por gel de poliacrilamida 1D..... | 38 |
| Figura 13. Mapas proteómicos intestinales obtenidos a través de geles 2DE de <i>R. microplus</i> susceptibles a IVM, pH 3-10..... | 40 |
| Figura 14. Mapas proteómicos intestinales obtenidos a través de geles 2DE de <i>R. microplus</i> resistentes a IVM, pH 3-10. | 40 |
| Figura 15. Análisis comparativo entre los geles 2DE, pH 3-10 de intestinos de <i>R. microplus</i> susceptibles y resistentes a IVM..... | 42 |
| Figura 16. Análisis de la relación entre las proteínas de intestino de <i>R. microplus</i> susceptibles y resistentes a IVM identificadas en los geles 2DE, pH 4-7 realizado a través del Diagrama de Venn, mediante el software Lucichart. | 43 |
| Figura 17. Análisis comparativo entre los geles 2DE, pH 4-7 de intestinos de <i>R. microplus</i> susceptibles y resistentes a IVM..... | 44 |

| | |
|---|----|
| Figura 18. Análisis comparativo de intensidad de área de proteínas expresadas diferencialmente entre los proteomas intestinales de <i>R. microplus</i> susceptibles y resistentes a IVM, realizado por el software PDQuest. Geles 2DE, pH 4-7..... | 48 |
| Figura 19. Análisis de la relación entre las proteínas de intestino de <i>R. microplus</i> susceptibles y resistentes a IVM identificadas en los geles 2DE, pH 7-10 realizado a través del Diagrama de Venn, mediante el software Lucichart. | 49 |
| Figura 20. Análisis comparativo entre los geles 2DE, pH 7-10 de intestinos de <i>R. microplus</i> susceptibles y resistentes a IVM..... | 50 |
| Figura 21. Análisis comparativo de intensidad de área de proteínas expresadas diferencialmente entre los proteomas intestinales de <i>R. microplus</i> susceptibles y resistentes a IVM, realizado por el software PDQuest. Geles 2DE, pH 7-10..... | 54 |
| Figura 22. Análisis de la relación entre las proteínas totales identificadas de intestino de <i>R. microplus</i> susceptibles y resistentes a IVM a través del Diagrama de Venn, mediante el software Lucichart. | 56 |

I. INTRODUCCIÓN

Las garrapatas son los parásitos más importantes en términos económicos para el ganado bovino (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2017). *Rhipicephalus microplus* es una garrapata endémica de las regiones tropicales y subtropicales del mundo (Powell *et al.*, 1982); las pérdidas económicas en ganadería debido a este ectoparásito están relacionadas con la baja producción de leche y ganancia de peso, mortalidad, daño a la piel, transmisión de hemoparásitos (*B. bigemina*, *B. bovis* y *A. marginale*) y costos de control de plagas (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2017).

El desarrollo de poblaciones de garrapatas resistentes a ixodicidas, es uno de los principales obstáculos para el control químico de estos parásitos (Rosario-Cruz *et al.*, 2005). Existen casos a nivel mundial confirmados de resistencia en *R. microplus* a diversos químicos, entre ellos organofosforados (OP), piretroides sintéticos (PS), amitraz (Am) y fipronil en las últimas décadas (Soberanes *et al.*, 2002; Pohl *et al.*, 2011), lo que ha propiciado la búsqueda de métodos alternativos de control de esta plaga en la industria bovina, tales como selección de razas resistentes, control biológico (hongos entomopatógenos, depredadores y plantas), uso de vacunas y lactonas macrocíclicas (LMs) (Lanusse *et al.*, 1997, Rodríguez-Vivas *et al.*, 2010).

Las LMs son antiparasitarios ampliamente utilizados para el control de endo y ectoparásitos (endectocidas) (Lanusse *et al.*, 1997), su efecto consiste en la activación del canal de cloro dependiente de glutamato (GluCl), incrementando la permeabilidad de la membrana celular por los iones cloro (Cl⁻), con la consecuente hiperpolarización de la membrana, cesando el estímulo nervioso y originando una parálisis flácida de la musculatura faríngea y somática de los parásitos causando su desprendimiento y muerte (Wolstenholme, 2012).

Actualmente, la ivermectina (IVM) es la LM mayormente empleada para el control de parásitos en la ganadería bovina (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2014), sin embargo, a pesar de los resultados positivos, la presión selectiva causada por la aplicación intensiva de este químico en los últimos años ha desencadenado el desarrollo de resistencia en distintos parásitos, entre ellos los nematodos *Onchocerca volvulus*,

Cooperia spp. y *Haemonchus contortus* (Townson *et al.*, 1994; Coles *et al.*, 2001; Kaplan, 2004) y ácaros como *Sarcoptes scabiei* y *Tetranychus urticae* (Currie *et al.*, 2004; Know *et al.*, 2010); la resistencia a IVM en *R. microplus* ha sido raramente documentada, reportándose cepas resistentes en Brasil (Martins y Furlong, 2001; Klafke *et al.*, 2006), México (Pérez-Cogollo *et al.*, 2010; Salas *et al.*, 2012) y Uruguay (Castro-Janer *et al.*, 2011).

El mecanismo molecular de resistencia a las LMs aún no se esclarece; la resistencia a IVM en nematodos y algunos artrópodos como la cucaracha común (*Blattella germanica*), la polilla de la col (*Plutella xylostella*) y el escarabajo de la papa (*Leptinotarsa decemlineata*) ha sido asociada a la insensibilidad del receptor GluCl, a un incremento en el metabolismo oxidativo mediado por familias de enzimas como el citocromo P450, esterasas, glutatión-S-transferasa y los transportadores dependientes de ATP (McCavera *et al.*, 2009; Kwon *et al.*, 2010; Guerrero *et al.*, 2012; Le Gall *et al.*, 2018).

La problemática actual de resistencia de *R. microplus* a los diferentes ixodicidas del mercado, requiere de propuestas innovadoras que ayuden a mitigar el problema. La genómica ha dominado el área de investigación de la biología molecular durante las décadas pasadas, pero la proteómica ha ganado terreno en este ámbito, la razón fundamental de ello, es el hecho de que el patrón proteico de una muestra biológica es más informativo sobre el estado fisiológico de un organismo que su genoma; el proteoma es un elemento altamente dinámico y puede cambiar debido a alteraciones en su ambiente, como situaciones de estrés, acción de fármacos, requerimientos energéticos, o su estado fisiológico (Pando y Ferreira, 2007); con la finalidad de controlar *R. microplus* como especie vector de patógenos, se ha analizado el perfil proteómico del sialome, ovarios e intestino medio para el desarrollo de vacunas contra este ectoparásito (Tirloni *et al.*, 2014; Rachisky *et al.*, 2007b; Kongsuwan *et al.*, 2009) y más recientemente el proteoma de la hemolinfa de garrapatas multirresistentes a ixodicidas (OP, PS y Am) (Aguilar-Díaz *et al.*, 2018), sin embargo, a la fecha no existe algún estudio similar a éstos donde se

analicen y comparen los proteomas de cepas de garrapatas susceptibles y resistentes a IVM, siendo este trabajo una primera aproximación a la identificación de posibles biomarcadores involucrados en el mecanismo de resistencia de *R. microplus* a IVM que permita a futuro el diseño de nuevos métodos efectivos de control.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Generalidades de las garrapatas.

Las garrapatas son parásitos externos (ectoparásitos) del orden de los ácaros (Ixodida) que forman parte de los artrópodos (Gambetta, 2014). Se alimentan de la sangre (hematófagos) de una gran diversidad de especies animales, para sobrevivir y reproducirse (Tene, 2002). Entre los hospederos que ataca, están el humano y los bovinos, ocasionando problemas de salud pública a través de los patógenos que transmiten y grandes pérdidas económicas a la ganadería (Domínguez *et al.*, 2010).

2.1.1 Clasificación taxonómica.

Las garrapatas se encuentran dentro del filo Arthropoda, Clase Arachnida, Superorden Parasitiformes (Metastigmata), Orden Ixodida (Figura 1) cuya característica principal es la posición de los estigmas respiratorios, en posición latero-ventral, posteriores al cuarto par de patas (Barker *et al.*, 2008; Bowman *et al.*, 2008; Bermúdez *et al.*, 2010). Están incluidas en la Subclase Acari, distinguiéndose de otros individuos por su gran tamaño, que va de 2 a 3 mm y en hembras repletas puede llegar hasta 2 cm, y su aparato bucal, el cual posee una serie de dentículos, que permite la fijación en la piel de los animales (Komplen *et al.*, 1996).

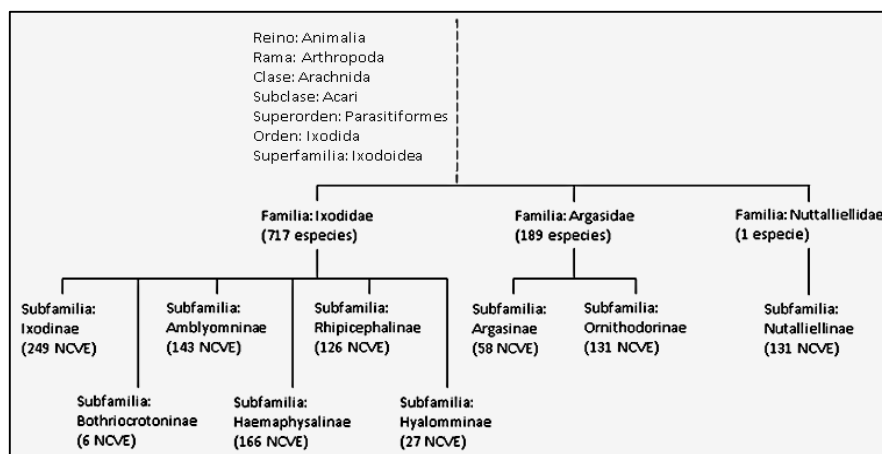


Figura 1. Distribución taxonómica de familias y subfamilias de garrapatas (Barker *et al.*, 2008, Dantas *et al.*, 2008).

El orden Ixódida se divide en tres familias: Ixodidae, Argasidae y Nuttalliellidae. Las garrapatas pertenecientes a la familia Ixodidae se conocen como garrapatas duras ya que presentan un escudo rígido de quitina, localizado en la superficie dorsal del macho y sobre la parte anterior de las hembras. Las garrapatas de la familia Argasidae se denominan garrapatas blandas y se caracterizan por la ausencia de escudo dorsal. La familia Nuttalliellidae incluye especies con características entre Ixodidae y Argasidae (Barker *et al.*, 2008).

2.2 Características del género y especie *Rhipicephalus microplus*.

2.2.1 Morfología.

La garrapata *R. microplus* pertenece a la familia Ixodidae (Salazar, 2015); esta se caracteriza por tener el abdomen y cefalotórax fusionados, por lo que las regiones corporales están compuestas por el prosoma (aparato bucal) y el idiosoma (cuerpo y cuatro pares de patas) (Gambetta, 2014).

El prosoma junto con el cuello forma el capítulo, el cual es corto y ancho, con márgenes laterales redondeados. El capítulo tiene una sustancia quitinosa que protege su sistema nervioso, a su vez está compuesto por dos órganos llamados quelíceros; ambos tienen dentículos afilados, los cuales rasgan la piel del hospedero e introducen un órgano de succión llamado hipostoma (Hagen *et al.*, 1999). A lado del hipostoma se sitúan dos palpos que actúan como soporte para adherirse al hospedero, estos están conformados por varios segmentos; en el último se encuentra el órgano papal, encargado de detectar las zonas más delgadas de la piel y donde existe mayor irrigación sanguínea (Parra *et al.*, 1999).

La garrapata en su estado de larva posee tres pares de patas, mientras que en estado de ninfa y adulto cuatro pares de patas; estas se articulan con el cuerpo mediante una estructura denominada coxa, cada pata está dividida en seis segmentos, coxa, trocánter, fémur, tibia, tarso y metatarso. Un par de garras y una

almohadilla está presente en cada tarso. Un elemento sensorial conocido como “órgano de Haller” se encuentra en la superficie dorsal del tarso del primer par de patas, este órgano recibe estímulos de tipo vibratorio particularmente del ganado cuando se mueve (Hagen *et al*, 1999; Bautista, 2006).

En la región dorsal se localizan un par de ojos, uno a cada lado del escudo. Estas garrapatas carecen de festones y ornamentación, además el dimorfismo sexual es muy pronunciado, la hembra es de mayor tamaño y carece de orificio anal, siendo que el macho es más pequeño y presenta muy tenue el orificio anal (Parra *et al.*, 1999).

La anatomía interna de las garrapatas cuenta con un aparato circulatorio simple de tipo abierto, el sistema digestivo está compuesto por un aparato bucal, faringe y un esófago que dan continuidad al estómago o intestino medio, el cual presenta divertículos gástricos (Doreste, 1988). En estas estructuras se desdobra la sangre a sustancias básicas para poder ser absorbidas mediante ósmosis y pasar a la cavidad general del cuerpo para diluirse en hemolinfa (Gállego, 2006; Parra *et al.*, 1999).

2.2.2 Ciclo de vida.

Estas garrapatas presentan un ciclo de vida que se caracteriza por poseer un solo hospedero, generalmente bovino, aunque puede parasitar a otras especies domésticas (caballos y perros) y silvestres (venados), incluso el humano (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2008). Su ciclo biológico está dividido en tres fases: vida libre, encuentro y vida parasitaria (Ramos *et al.*, 2009).

2.2.2.1 Fase de vida libre.

Comienza con el desprendimiento de la hembra repleta después de alimentarse del hospedero, y termina con la aparición de las larvas en la vegetación (Alonso *et al.*, 2007). Durante esta fase ocurren cuatro etapas de desarrollo de la garrapata:

- a) Preoviposición o protoquia: es el periodo comprendido entre el desprendimiento y la llegada a las pasturas. En esta etapa el factor más importante es la temperatura (80-90%), en condiciones ambientales óptimas se puede realizar en 2-4 días, mientras que en áreas templadas puede tener grandes variaciones (Nuñez *et al.*, 1982).
- b) Oviposición u ootoquia: comprende desde que la hembra inicia la postura del primer huevo hasta el último. El desove puede completarse entre los 5 a 17 días en condiciones favorables de temperatura (21°C – 36°C). El número de huevos ovipositados varía, con una media de 3000 por garrapata (Nuñez *et al.*, 1982).
- c) Incubación: esta fase inicia con el fin de la oviposición y termina con la eclosión larvaria. Los factores ambientales influyen directamente sobre la evolución de los huevos, los periodos de incubación óptimos se dan entre los 15 °C y 37 °C y una humedad relativa del 95% (Nuñez *et al.*, 1982)
- d) Eclosión: es la etapa durante la cual las larvas emergen del huevo; dura de 14 a 60 días. (Nuñez *et al.*, 1982).

2.2.2.2 Fase de encuentro.

Una vez que las larvas han eclosionado a los 5-14 días han adquirido la viabilidad necesaria para resistir los efectos del ambiente y suben a las plantas; ahí, las larvas esperan la llegada del hospedero, el cual es detectado mediante quimiorreceptores, a través de los cuales perciben el bióxido de carbono emitido por el vertebrado (Canales, 2007; Alonso *et al.*, 2013). Al percibir la presencia del posible hospedero, las larvas aumentan su actividad y adoptan una posición particular, extendiendo sus patas anteriores para adherirse (Núñez *et al.*, 1982)

2.2.2.3 Fase de vida parasitaria.

Esta fase es completada en un periodo entre los 17 a 30 días, el mayor porcentaje de hembras cae a los 23 días post-infestación. Comprende tres etapas las cuales se subdividen; una etapa larval: neolarva, larva y metalarva, una etapa ninfa: ninfa y metaninfa y una etapa adulta: meandro, ganandro, neógina, partenógina y teleógina (Gambetta, 2014).

- a) Larval: comprende desde el momento que la larva sube al hospedero, busca zonas finas de la piel donde la misma sea laxa y vascularizada; ahí comienza la succión de sangre. A medida que succionan sangre, las larvas van sufriendo transformaciones y aproximadamente en tres días pueden mudar al siguiente estadio (Gambetta, 2014).
- b) Ninfa: se presenta alrededor de los cinco días post-infestación. Al día 9 post-infestación la ninfa se inmoviliza y comienza la segunda muda.
- c) Adulta: comienza luego de haber salido de su envoltura metaninfal, aquí inicia el dimorfismo sexual, presentando una diferencia en el tamaño bien marcada. En esta etapa es posible observar en la hembra distintos momentos de maduración:
 - Neógina: la más pequeña de todas, mide 2 mm, de una coloración verdosa. Se distingue de la ninfa por poseer miembros más largos que gruesos.
 - Partenógina: mide entre 3 y 4 mm.
 - Teleógina (hembra repleta): mide entre 7 y 13 mm, marca el fin de la vida parasitaria sobre el animal.

2.2.3 Distribución geográfica de *R. microplus* a nivel mundial.

R. microplus se encuentra distribuida en regiones tropicales y subtropicales (Powell *et al.*, 1982). Originaria del continente asiático y de la Isla de Java; su presencia ha sido descrita en Asia (India), África (Madagascar) Oceanía (Australia) y en América,

desde el norte de Argentina hasta México, incluyendo las islas del Caribe y las Antillas; en zonas geográficas con altitudes entre 2000 y 2640 msnm (Estrada *et al.*, 2006; Ramos *et al.*, 2009).

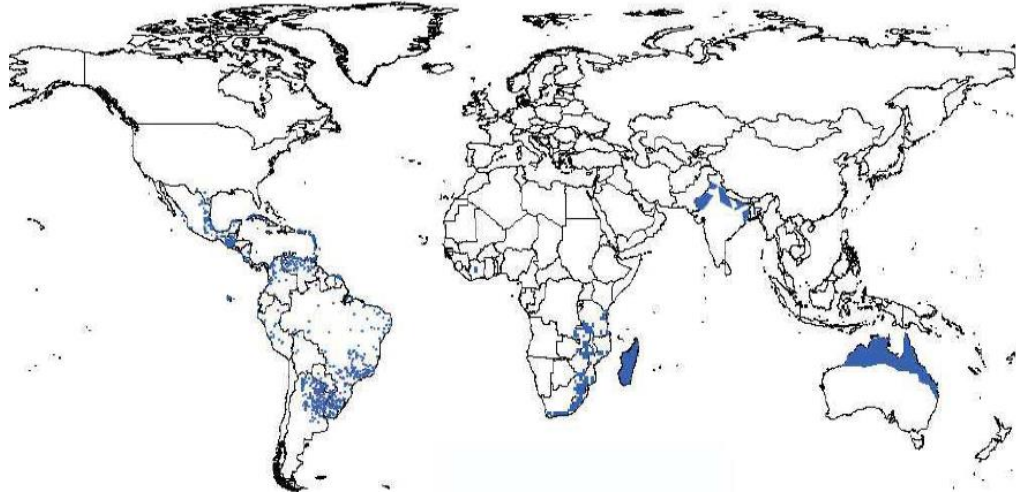


Figura 2. Distribución geográfica de la garrapata *R. microplus* (Gambetta, 2014).

2.2.4 Distribución geográfica de *R. microplus* en México.

La garrapata *R. microplus* se distribuye en el trópico y subtrópico de las regiones húmedas de México; esto se atribuye a factores ambientales como la temperatura, humedad, vegetación, pero sobre todo al traslado de los hospederos, que son los determinantes para su distribución (Camino, 1981; Quiroz *et al.*, 2005).

La situación geográfica de la campaña nacional contra la garrapata *R. microplus* está referida a cada una de las fases del programa (libre, erradicación y control); la superficie libre comprende el 30.60% del territorio nacional, se reconoce a los estados de Sonora, Tlaxcala, Aguascalientes, Baja California y Chihuahua y el norte de Baja California Sur como libres del ectoparásito. Las áreas en erradicación abarcan el 3.44% del territorio mexicano, encontrándose los municipios de Los Cabos y la parte sur de la Paz en Baja California Sur; el norte de Sinaloa y la zona desierto del estado de Coahuila. El resto del país comparte regiones en control y

zonas libres naturales de *R. microplus*, comprendiendo el 65.96% del territorio nacional (SENASICA, 2019).

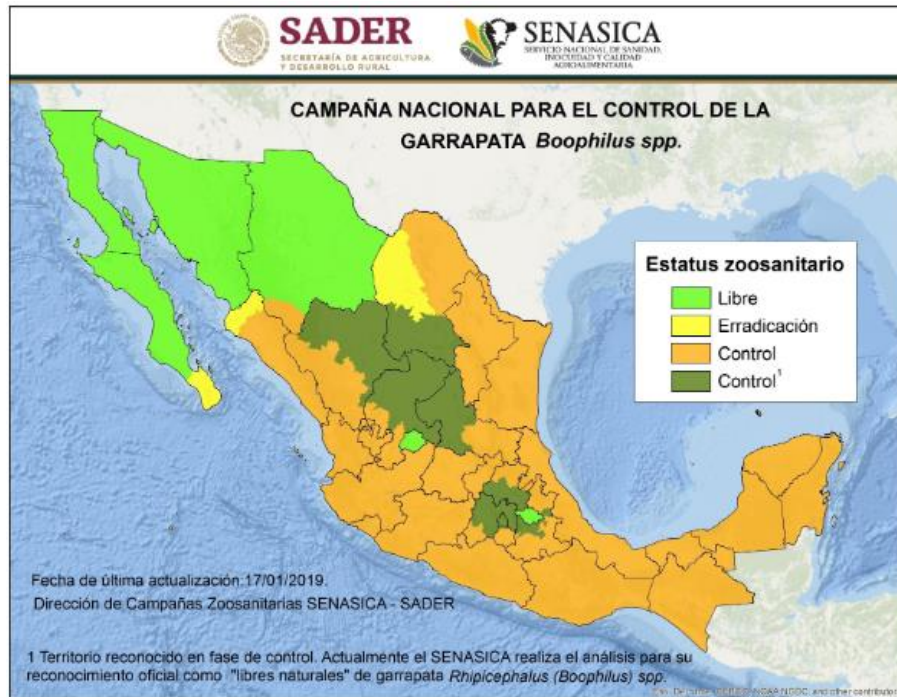


Figura 3. Situación actual de la campaña nacional para el control de la garrapata *R. microplus* (SENASICA, 2019).

2.2.5 Impacto de *R. microplus* en la ganadería bovina.

La presencia de un alto número de garrapatas *R. microplus* en un sistema de producción pecuario del trópico, puede llevar a pérdidas económicas relacionadas con la disminución en la producción, control del ectoparásito y tratamiento de enfermedades transmitidas por las garrapatas (Jonsson, 2006).

R. microplus es el vector de los hemoprotozoarios *Babesia bovis* y *B. bigemina*, causantes de la babesiosis bovina, y la rickettsia intraeritrocítica *Anaplasma marginale*, agente causal de anaplasmosis (Pérez de León *et al.*, 2014; Aubry y Geale., 2011). Estas enfermedades son consideradas como uno de los mayores problemas sanitarios para el desarrollo de la producción ganadera en regiones tropicales y subtropicales del mundo (García, 2010). Al menos en México, el 75%

del ganado bovino se considera en riesgo de infectarse con *B. bovis* y *B. bigemina* (Bautista *et al.*, 2012).

Se estima que el 80% de la población mundial de ganado bovino se encuentra expuesto a infestaciones por garrapatas (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2017). El costo global anual estimado asociado con garrapatas y patógenos que transmiten es entre \$13.9 y \$18.7 billones de dólares (De Castro *et al.*, 1997).

De acuerdo con la campaña nacional para el control de la garrapata *R. microplus* el 65% del territorio mexicano está infestado por este ectoparásito (SENASICA, 2019); basado en esta información, el número estimado de cabezas de ganado en riesgo de infestación por *R. microplus* es de 24'973,983 (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2017).

Las garrapatas *R. microplus* son responsables de una reducción de 90.24 litros de leche por vaca por periodo de lactación; la pérdida estimada para el rebaño lechero de México es \$ 68'878,694 dólares; para el ganado cárnico de 0.18 y 1.37 g por garrapata por animal para las cruzas *Bos indicus* x *Bos taurus* y la raza *B. taurus*, respectivamente, que en número representarían \$ 573'608,076 dólares por año (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2017).

2.2.6 Control de *R. microplus*.

El control de *R. microplus* es una práctica que debe realizarse forzosamente dentro del manejo rutinario en las unidades de producción bovina de las zonas tropicales y subtropicales, debido a los efectos negativos que generan; para lograrlo, se han empleado diferentes estrategias de control como el uso de químicos, razas de bovinos resistentes, vacunas, hongos entomopatógenos, plantas bioactivas, así como pastoreo (Patarroyo *et al.*, 2002; Hernández, 2005; Alonso *et al.*, 2013).

2.2.7 Métodos de control químico.

El uso de sustancias químicas es la principal herramienta utilizada para el control de las garrapatas (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2010), puesto que presentan como ventajas, la visualización de un efecto casi inmediato, una forma de aplicación muy sencilla y una larga duración (Guglielmone *et al.*, 2007).

Los métodos de control químico, tienen como función romper los ciclos de vida de las garrapatas a través de la aplicación de ixodicidas a intervalos determinados por la región ecológica, especies a las que se va a combatir, eficiencia residual o persistencia del antiparasitario (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2014b). Los químicos empleados en el tratamiento de ectoparásitos de importancia veterinaria actúan de forma sistémica después de la absorción del compuesto en los tejidos del huésped o por contacto directo con los parásitos diana después de la aplicación externa (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2014a), Prácticamente todos los ectoparasiticidas son neurotoxinas, que ejercen su efecto sobre el sistema nervioso del ectoparásito (Taylor, 2001). Los métodos tradicionales para la administración de un tratamiento químico acaricida al ganado para el control de garrapatas requieren de formulaciones tales como polvo, concentrado emulsionable o productos fluidos. Los acaricidas convencionales y lactonas macrocíclicas (LMs) utilizadas se pueden aplicar al ganado por baños de inmersión, aspersion, vía parenteral (inyectables), en un bolo intrarruminal, epicutánea (pour-on) o usando otros dispositivos impregnados de feromonas y acaricidas (George *et al.*, 2004).

El uso de estos químicos se remonta a 1895, cuando se empezaron a utilizar los compuestos arsenicales, posteriormente siguieron los carbamatos, organoclorados, organofosforados, piretroides y formamidinas. En la actualidad, se cuenta con otros acaricidas alternativos a los tradicionales, como el fluazurón, fipronil y lactonas macrocíclicas (Sutherst *et al.*, 1983).

En México existen más de 50 productos para el control de garrapatas que incluyen seis familias distintas con diferencias en sus mecanismos de acción. En el Cuadro 1 se presentan los ixodicidas utilizados en México para el control de *R. microplus*

en el ganado bovino (organofosforados [OF], piretroides sintéticos [PS], amidinas [Am], fenilpirazolonas, reguladores del crecimiento y lactonas macrocíclicas [LMs]).

Cuadro 1. Ixodicidas y lactonas macrocíclicas utilizados en México para el control de garrapatas en el ganado bovino (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2014b).

| Familia | Sustancia activa | Forma de aplicación |
|----------------------------|------------------|-------------------------------|
| Organofosforados | Coufamos | Inmersión, aspersion |
| | Clorpirifos | Inmersión, aspersion |
| | Clorfenvinfos | Inmersión, aspersion |
| Piretroides sintéticos | Cipermetrina | Inmersión, aspersion, pour-on |
| | Deltametrina | Inmersión, aspersion, pour-on |
| | Fumetrina | Inmersión, aspersion, pour-on |
| | Labdacyalotrina | Pour-on |
| | Alfacipermetrina | Inmersión, aspersion, pour-on |
| Amidinas | Amitraz | Inmersión, aspersion |
| Lactonas macrocíclicas | Ivermectina | Inyectable, pour-on |
| | Moxidectina | Inyectable |
| | Doramectina | Inyectable |
| Fenilpirazolonas | Fipronil | Pour-on |
| Inhibidores del desarrollo | Fluazurón | Pour-on |

2.2.8 Métodos de control alternativos.

A causa de la aparición de poblaciones de garrapatas *R. microplus* resistentes a la mayoría de los ixodicidas, así como la toxicidad que éstos provocan en el hombre y el medio ambiente, se han implementado métodos alternativos de control que disminuyen el empleo de sustancias químicas (Castelblanco *et al.*, 2013; Pulido y Cruz, 2013). Dentro de los principales métodos de control no químico de *R. microplus* se encuentran:

a). Selección de hospederos resistentes. El ganado *Bos indicus* es más resistente a las garrapatas que el *Bos taurus*, debido a sus características fenotípicas y a su capacidad para desarrollar una respuesta inmune más eficiente después de la primera infestación; la resistencia a las garrapatas también varía en relación al sexo, edad, estado de gestación, lactación y temporada del año (Jonsson, 2006., Utech *et al.*, 1978). El uso de ganado resistente a las garrapatas se puede lograr por la selección de animales que presenten menos garrapatas, y su posterior cruzamiento con otros animales con la misma característica, así como introducir sangre cebú en el hato, sin embargo, tiene sus desventajas ya que se requiere de un proceso lento de selección, colaboración de los dueños del ganado y evaluar productivamente a los animales (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2005).

b). Manejo de potreros. Estas prácticas están relacionadas con el mantenimiento de praderas e involucran actividades como la quema controlada y la rotación de potreros, cuyo principio es modificar el hábitat, afectando adversamente el desarrollo y la dinámica poblacional de las garrapatas por el efecto que se produce sobre el micro y mesoclima. Esta práctica tiene efecto sobre la fase de vida libre y una de sus ventajas es que es completamente ecológico (Martins, 2006).

c). Control biológico. Los agentes biológicos que potencialmente pueden ser usados para el control de garrapatas se clasifican en hongos entomopatógenos (*Metarhizium sp*; *Beauveria sp*), bacterias (*Cedecea lapagei*, *Escherichia coli* y *Enterobacter agglomerans*), nematodos entomopatógenos (*Heterorhabditidae* y *Steinernematidae*) y hormigas reguladoras (*Solenopsis germinata*, *S. saevissima*, *Camponotus rengira* y *Ectatomma quadridens*); todos estos agentes afectan principalmente los estadios de vida libre de las garrapatas (Ojeda-Chi *et al.*, 2011).

d). Extractos de plantas. Estudios han revelado que algunos extractos de plantas provocan mortalidad en garrapatas adultas y larvas e inhibición de la

oviposición y eclosión. Algunas de ellas con este efecto son *Leucaena leucocephala* (guaje), *Piscidia piscipula* (jabín), *Azadiractha indica* (neem), *Copaifera reticulata* (copaiba), *Hypericum polyanthemum* (hipérico), *Piper aduncum* (cordoncillo blanco) y *Lysiloma latisiliquum* (tzalam), así como gramíneas y leguminosas, por ejemplo, *Brachiaria brizantha* (insurgentes), *Melinis minutiflora* (pasto gosdura) y *Stylosanthes spp.* (stylo) (Alonso *et al.*, 2013).

e). Vacunas. En la década de los noventa se generó una vacuna que induce protección inmunológica en el ganado bovino contra infestaciones de *R. microplus* (Alonso *et al.*, 2013). Actualmente se cuenta comercialmente con dos vacunas denominadas TickGARDPLUS® en Australia y Gavac® en América Latina. Las vacunas contienen el antígeno Bm86 de *R. microplus* que es una glicoproteína asilada de las células del intestino de la garrapata. Los anticuerpos anti-Bm86 aparentemente se unen a la superficie de las células epiteliales del intestino de la garrapata e interrumpen la endocitosis causando lisis de las células y reduciendo la capacidad reproductiva de las hembras repletas (Willadsen, 1997). Los efectos de la vacuna sobre la garrapata *R. microplus* es su disminución de la capacidad reproductiva (50-90%), número de garrapatas repletas (20-30%), peso de las garrapatas (30%) y peso de los huevos (60-80%), sin embargo, no produce mortalidad (Jonsson *et al.*, 2000; De la Fuente *et al.*, 2007).

2.2.9 Resistencia de *R. microplus* a ixodicidas.

El uso frecuente de ixodicidas ha provocado la selección de poblaciones de garrapatas resistentes (Kunz y Kemp, 1994). La Organización Mundial de la Salud (1992), definió el fenómeno de resistencia en artrópodos como una característica heredada que imparte una mayor tolerancia a un químico o grupo de químicos, de tal manera que los individuos resistentes sobreviven a una dosis que normalmente sería letales para la especie. Metcalf (1989) menciona también la resistencia

cruzada (RC) la cual es el mecanismo que utilizan las especies de insectos resistentes para sobrevivir a la exposición de insecticidas relacionados químicamente, usando un patrón de detoxificación genérico; y la resistencia múltiple (RM) cuya peculiaridad es la utilización de varios mecanismos hacia la acción de diferentes clases de insecticidas no relacionados químicamente.

El desarrollo de resistencia es un proceso evolutivo que aparece por selección genética (Lee *et al.*, 1999), y se divide en tres fases (Fragoso y Soberanes, 2001):

- a) Fase de establecimiento. Cuando surge el alelo resistente en una población, habitualmente este proceso se efectúa por mutaciones naturales y en forma independiente a la presión de selección.
- b) Fase de desarrollo. Es el aumento del número de individuos resistentes y ocurre por la tasa de sobrevivencia sobre los individuos susceptibles después del uso de productos químicos.
- c) Fase de emergencia. Ocurre por una elevada tasa de presión de selección, es una fase corta y el alelo resistente es lo común en la población para manifestar una reducción de la efectividad del ixodicida.

La plasticidad del genoma de las garrapatas ha facilitado el desarrollo de resistencia hacia los ixodicidas más importantes (Rosario y Hernández, 2001); de acuerdo al tipo de respuesta al químico la resistencia ha sido agrupada en cuatro categorías (Alonso *et al.*, 2006):

- a) Resistencia del comportamiento. Cuando la garrapata modifica su conducta para evitar el contacto con el ixodicida.
- b) Resistencia de la penetración. Es una modificación del exoesqueleto para inhibir o retardar la penetración del químico, y que en general tiene que ver con la concentración de lípidos que facilitan o retardan la penetración del ixodicida a través de esta estructura.

- c) Resistencia metabólica. Es la detoxificación del químico por procesos enzimáticos que radica en la modificación de las vías metabólicas de la garrapata. Las formas más importantes de resistencia metabólica involucran oxidasas multifuncionales, glutatión-S-transferasa y esterasas. En general se reconoce, la participación de mecanismos de sobreexpresión de esterasas involucradas en la resistencia a organofosforados y se ha encontrado al menos una esterasa de la cepa Coatzacoalcos de México, involucrada en la resistencia a piretroides sintéticos, es especial la cipermetrina (Ortíz *et al.*, 1995; Hernández *et al.*, 2000; Pruett *et al.*, 2002).
- d) Insensibilidad del sitio de acción. Es la modificación del sitio de acción del insecticida para disminuir la sensibilidad del químico. Cuando esta es la causa de la resistencia los niveles de resistencia regularmente son altos (1000x) comparados a la detoxificación (50x). En cepas de garrapatas mexicanas, ha sido encontrada la mutación tipo *Kdr* (Knock down resistance); este mecanismo, consiste en la presencia de una modificación en el gen del canal de sodio que le confiere la incapacidad de unión con el acaricida, inhibiendo de esta manera su efecto tóxico. En *R. microplus* se ha documentado la sustitución de una fenilalanina por una isoleucina en el gen del canal de sodio, 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., Guerrero *et al.* 2001). Otra modificación del sitio blanco ha sido estudiada en la acetilcolinesterasa de la garrapata *R. 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). La resistencia a formamidinas, como el amitraz ha sido demostrada en trabajos con cepas de garrapatas mexicanas y brasileñas, donde se encontraron dos sustituciones en las secuencias de nucleótidos, A por C y T por C, que las diferenciaron de individuos susceptibles y que posiblemente traducen aminoácidos que alteran el receptor de octopamina, sitio de acción del

amitraz, mostrando que, en poblaciones de *R. microplus* el mecanismo de insensibilidad en el sitio blanco sí podría ser responsable del fenómeno de resistencia (Chen *et al.*, 2007).

En México, fue documentado por primera vez el fenómeno de resistencia en poblaciones *R. microplus* a partir de fallas de control en la región de Tuxpan, Veracruz con organofosforados, a partir de este suceso se permitió la comercialización de nuevos ixodicidas como los piretroides y amidinas, siendo los piretroides los más usados debido a su poder residual y su estabilidad en los baños de inmersión (Aguirre *et al.*, 1986), después de 8 años de uso se detectaron los primeros casos de resistencia a piretroides en los estados de Tabasco, San Luis Potosí, Veracruz y Chiapas (Ortiz *et al.*, 1995). A partir del establecimiento de la resistencia a los organofosforados y piretroides, se incrementó la utilización de amitraz como una alternativa prometedora, detectándose en 2001 en el estado de Tabasco el primer caso de resistencia a amidinas (Soberanes *et al.*, 2002).

2.3 Lactonas macrocíclicas.

El uso de lactonas macrocíclicas (LMs) para el control de *R. microplus* incrementó en los últimos 10 años como una alternativa a otros acaricidas a los cuales las garrapatas han desarrollado resistencia (Klafke *et al.*, 2012).

Las LMs comprenden un grupo de fármacos caracterizados por poseer un anillo lactónico de 16 componentes, unido a un grupo benzofurano (C₂ a C₈) y a un anillo espiroquetal (C₁₇ a C₂₅). Atendiendo a su estructura química y actinomiceto de cuya fermentación provienen se clasifican en dos familias: avermectinas y milbemicinas; las primeras poseen un radical de naturaleza glucídica (disacárido) en el C₁₃, del que carecen las milbemicinas. Estas son moléculas de gran tamaño con masa molecular entre 600 kDa (milbemicinas) y 800 kDa (avermectinas) (Lifschtz *et al.*, 2002).

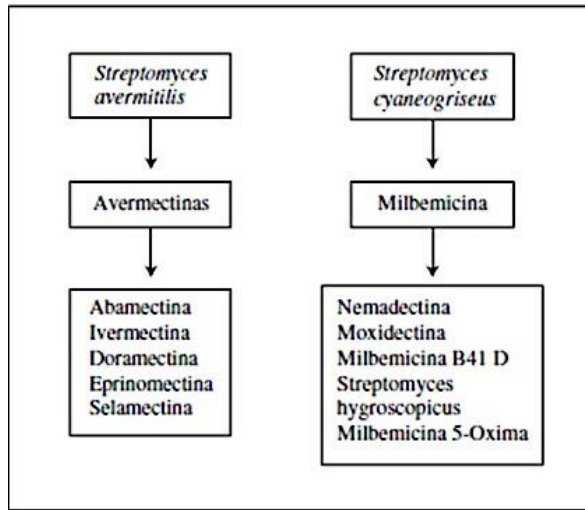


Figura 4. Origen y clasificación de las lactonas macrocíclicas; avermectinas y milbemicinas (Lifschitz *et al.*, 2002).

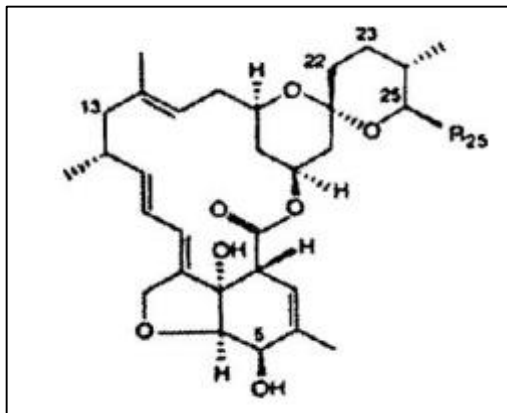


Figura 6. Estructura química básica de las milbemicinas (Carrasco *et al.*, 1998).

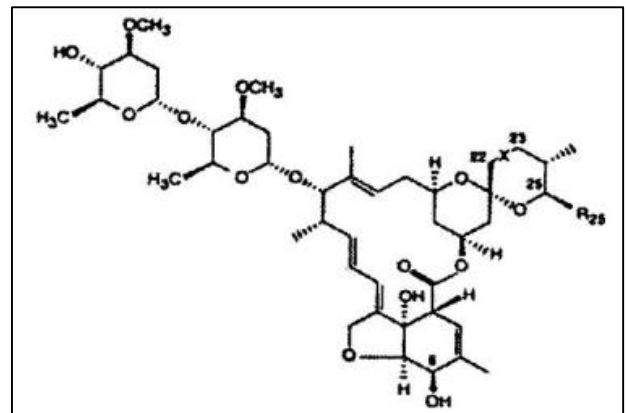


Figura 5. Estructura química básica de las avermectinas (Carrasco *et al.*, 1998).

2.3.1 Avermectinas

Las avermectinas naturales, procedentes de la fermentación de *Streptomyces avermitilis*, se producen como una mezcla de ocho compuestos diferentes, que se denominan: A1_a, A1_b, A2_a, A2_b, B1_a, B1_b, B2_a y B2_b. Las tres avermectinas naturales que se producen de forma mayoritaria son A2_a, B1_a y B2_a. El producto más potente y con mayor amplitud de espectro contra artrópodos es el B1. La avermectina B1 natural, también conocida como abamectina, es el producto de partida para la obtención de la ivermectina (Carrasco *et al.*, 1998).

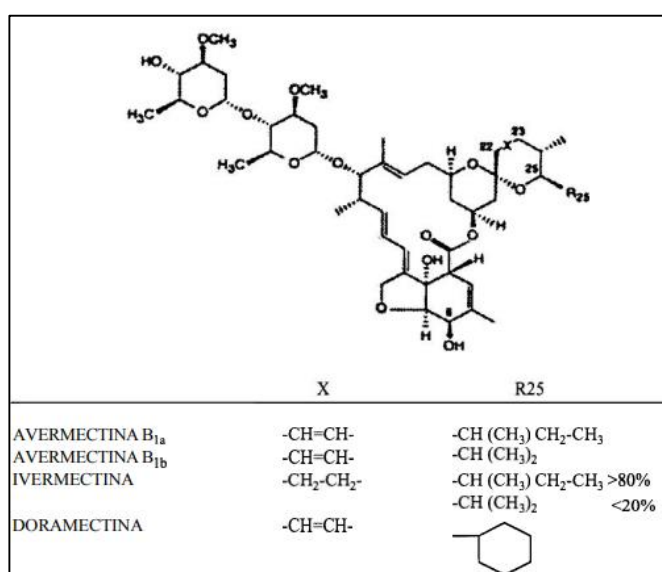


Figura 7. Estructura básica de las avermectinas y sustituyentes de los principales compuestos del grupo (Carrasco *et al.*, 1998).

2.3.1.1 Ivermectina.

La ivermectina (IVM) es una avermectina semisintética introducida en medicina veterinaria en 1981; su amplio espectro, potencia sin precedentes, buen margen de seguridad y nuevo mecanismo de acción, la convirtieron rápidamente en el tratamiento de elección en parasitosis por nematodos y artrópodos en ganado bovino (Campbell *et al.*, 1983; Campbell, 1985). Es un fármaco muy liposoluble y poco hidrosoluble, por lo que se puede aplicar por todas las vías siendo las más

recomendadas la subcutánea (SC), intramuscular (IM) y tópica (“pour-on”) (Lifschitz *et al.*, 2002).

La ivermectina, está compuesta de una mezcla que contiene como mínimo 80-90% de 22,23-dihidroaivermectina B1_a y 10-20% de 22,23-dihidroaivermectina B1_b (Figura 8) (Lifschitz *et al.*, 2002).

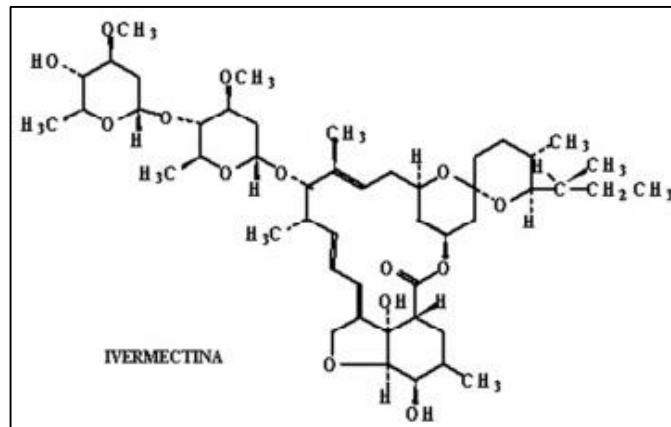


Figura 8. Fórmula estructural de la Ivermectina (Engormix, 2018).

2.3.1.1.1 Farmacocinética.

Los laboratorios que comercializan ivermectina han desarrollado varias formulaciones que permiten la aplicación por diferentes vías (subcutánea, oral y tópica). La fórmula para vía oral muestra menor disponibilidad; por vía intrarruminal se estima que el fármaco alcanza el 40% de biodisponibilidad, pero sus valores en plasma pueden durar de siete a 14 días. No se recomienda la vía intramuscular. En bovinos, la ivermectina se detecta en plasma después de una hora de haberlas aplicado y hasta 30 días después de la administración de una dosis de 0.2 mg/kg por vía subcutánea. Los bolos de liberación prolongada proveen dosis eficaces inmediatamente después de ser administrarlos; a partir de ahí la dosis terapéutica (12 mg/día) se libera durante alrededor de 135 días (Rodríguez *et al.*, 2002).

El volumen de distribución (Vd) es muy alto: >5.3 L/kg, con ligeras variantes en las diferentes especies. Se distribuyen ampliamente en los tejidos y por lo general se encuentran residuos en bilis, grasa, hígado y menos en cerebro. El amplio Vd indica

que una gran cantidad se localiza en los diferentes tejidos, incluyendo la piel, dato que es importante en la medicina veterinaria por dos razones: 1) si la carne o subproductos de animales tratados con ivermectina llegan a ser consumidos por el ser humano, suele constituir un problema de salud pública; 2) el efecto residual del fármaco puede llegar a ser de 10-12 semanas, y esto es considerado ideal para el control de ectoparásitos como pulgas, garrapatas o moscas (Sumano *et al.*, 2006).

Parece ser que el metabolismo de la ivermectina se realiza por procesos de hidroxilación en rumen o intestino, independientemente de la vía de administración. Se elimina por bilis, por lo que se detectan grandes cantidades en heces, aunque también se excreta por la orina y en la leche. En bovinos, la excreción fecal representa el 98% o más del total de la dosis administrada. (Sumano *et al.*, 2006).

2.3.1.1.2 Mecanismo de acción.

Las lactonas macrocíclicas pueden penetrar el organismo del parásito ya sea por vía oral o transcuticular. La forma transcuticular es relevante solo en parásitos no hematófagos, ya que no pueden atravesar la membrana cuticular. La vía oral es eficiente y con mayor repercusión en estos parásitos (Rodríguez *et al.*, 2002).

Las lactonas macrocíclicas actúan sobre los canales de cloro ligados a los receptores de glutamato (GluCl), presentes de forma exclusiva en las neuronas y células musculares de los invertebrados. El canal GluCl pertenece a una clase de receptores ionotrópicos que median las respuestas inhibitorias rápidas al glutamato (Rodríguez *et al.*, 2002). La neurotransmisión química rápida está mediada por la activación de receptores ionotrópicos; la llamada clase “cys-loop” de canales iónicos activados por ligando (LGICs), forman una superfamilia de receptores ionotrópicos que incluye varios tipos de canales permeables a los aniones, entre ellos GluCl (Raymond *et al.*, 2002).

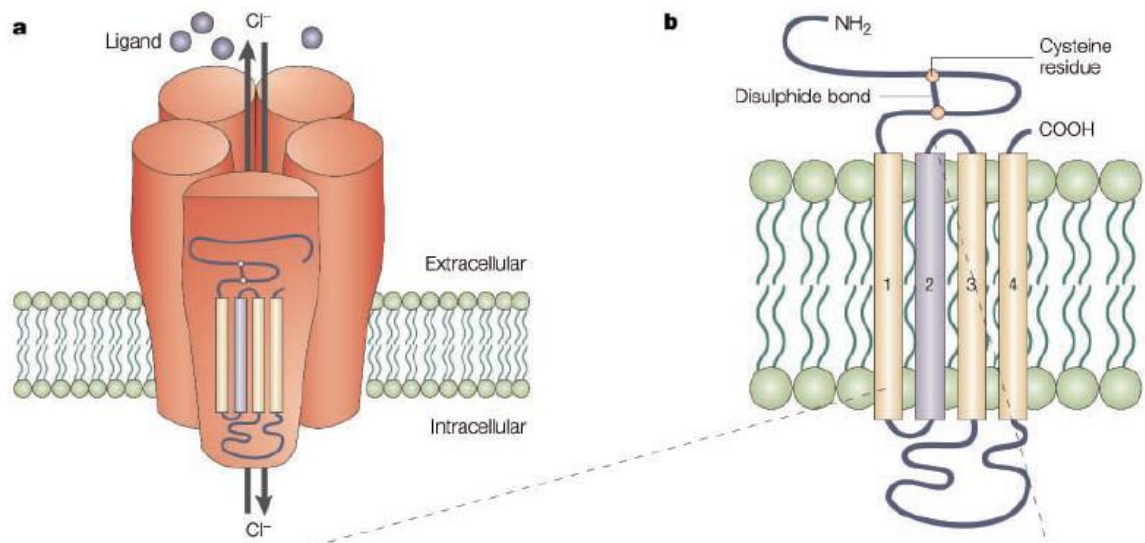


Figura 9. a. Representación sistémica de LGICs el cual indica la configuración pentamérica. b. Representación de una subunidad de un LGIC. Se muestra la topología de las subunidades transmembrana (M1-M4) y el bloque Cys (Raymond *et al.*, 2002).

Los receptores “cys-loop” LGICs, están formados por la oligomerización de cinco subunidades que forman un poro central (Figura 9a); cada subunidad tiene un par de residuos de cisteína unidos por disulfuro que están separados por 13 aminoácidos en el dominio extracelular amino-terminal (Figura 9b). Cada subunidad tiene un largo dominio extracelular amino-terminal seguido de cuatro regiones transmembrana (M1-M4) y un gran bucle citoplásmico entre M3 y M4 (Karlin, 2002).

En el modelo experimental *Caenorhabditis elegans*, se logró la primera clonación molecular del ADN complementario (cDNA) de GluCl, resultando en la expresión de un receptor multimérico GluCl α (GLC-1) y GluCl β (GLC-2) (Cully *et al.*, 1994), sin embargo, la mayoría de los receptores GluCl que han sido expresados exitosamente *in vitro* a la fecha en esta y otras especies son monoméricos (Cully *et al.*, 1996; Vassilatis *et al.*, 1997; Horoszok *et al.*, 2001; McCavera *et al.*, 2009; Njue *et al.*, 2004), lo cual ha conducido a un avance importante; el conocimiento de la estructura tridimensional del canal iónico GLC-1, revelando los sitios de unión a glutamato e ivermectina (Hibbs *et al.*, 2011). El glutamato se une al receptor

homomérico de GLC-1 solo después de que la ivermectina ya se ha unido, en contraste con casi todos los otros GluCl, donde el ligando puede unirse y activar el canal en ausencia del fármaco. El sitio de unión a ivermectina se encuentra en el dominio del canal que se encuentra entre M3 y M1 de dos subunidades adyacentes, con el fármaco en contacto con M2, que recubre el canal iónico, y el bucle M2-M3 (Wolstenholme, 2012) (Figura 10).

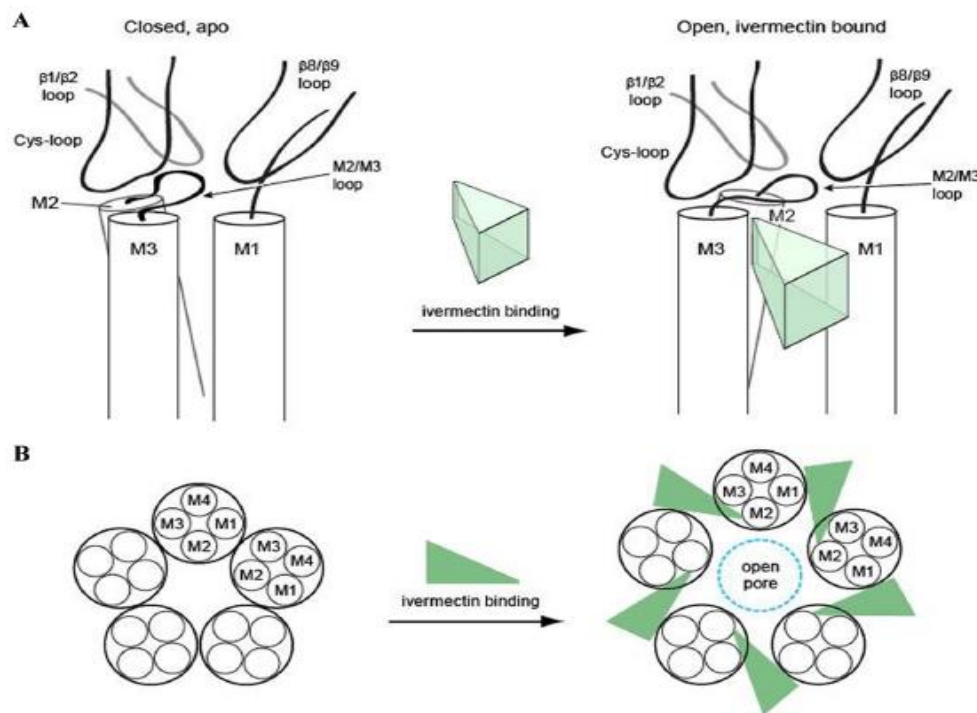


Figura 10. Mecanismo por el cual la IVM promueve la apertura de los canales GluCl. La IVM se une a los dominios M1 y M3 de las subunidades adyacentes, abriendo así el canal. (Hibbs *et al.*, 2011). a. vista lateral. b. vista desde arriba.

Las lactonas macrocíclicas pueden abrir directamente los canales iónicos, o pueden aumentar los efectos de las concentraciones submáximas del agonista normal (Cully *et al.*, 1996); es decir, a bajas concentraciones, potencian el efecto del glutamato y a concentraciones elevadas producen, por sí mismas, la apertura del canal; la afluencia de iones Cl^- produce una hiperpolarización de la neurona o músculo

(Wolstenholme, 2012), como consecuencia, se produce una parálisis flácida que origina pérdida de motilidad y termina provocando la muerte del parásito (Rodríguez *et al.*, 2002).

Los canales de GluCl tienen un amplio rango de funciones en el sistema nervioso de invertebrados, y se pueden dividir en tres categorías: el control y modulación de locomoción, regulación de la alimentación y la mediación de impulsos sensoriales (Wolstenholme, 2012).

Las funciones de los canales GluCl mejor estudiadas son las de los nematodos, donde los canales se expresan ampliamente en las neuronas sensoriales, las interneuronas y neuronas motoras, modulando el comportamiento del parásito (Wolstenholme, 2012). La faringe de los nematodos es un órgano muscular y su función es absorber y procesar los alimentos antes de bombearlos en el intestino. El bombeo es un proceso cíclico e incluye una fase de relajación desencadenado por la neurona motora inhibitoria glutamérgica llamada M3, la cual implica la presencia de receptores inhibitorios de glutamato en las células musculares post-sinápticas (Lee *et al.*, 1999). El bombeo faríngeo en nematodos es extremadamente sensible a las LMs, y en muchas especies la faringe es el órgano más sensible al efecto de las drogas; esto podría significar que el principal efecto de las LMs en los parásitos es en la faringe; la inhibición del bombeo está ligado a la presencia de canales GluCl en las células faríngeas musculares, la activación irreversible de estos receptores por ivermectina conduce a la despolarización del músculo, probablemente debido a la alta concentración interna de Cl⁻ en la célula y el consiguiente cese del bombeo (Pemberton *et al.*, 2001). Laughton *et al* (1997) han reportado en el nematodo *C. elegans* la expresión de los genes *avr-15* y *glc-2* en las células musculares de la faringe, los cuales codifican las subunidades GluCl α 2 y β . El segundo efecto principal de las LMs en los nematodos es una parálisis del músculo de la pared corporal, que los inmoviliza, sin embargo, estudios indican que este es un efecto indirecto, ya que no existen pruebas de que GluCl se exprese en las células musculares; la locomoción de los nematodos se controla mediante

neuronas motoras tanto excitadoras como inhibitorias, organizadas en cordones nerviosos ventrales y dorsales, cada uno de los cuales inerva el músculo de la pared del cuerpo (Wolstenholme, 2012). Reportes han demostrado que la ivermectina bloquea la transmisión entre interneuronas y neuronas motoras excitadoras en el cordón ventral, y también la transmisión ventral inhibitoria en *A. suum* (Kass *et al.*, 1984), esto predeciría que las subunidades de GluCl se expresan en estas neuronas motoras, comprobándose en las especies *C. elegans* y *H. contortus* donde se expresan los genes *avr-14* y *avr-15*, los cuales codifican para las subunidades GluCl α , α 3A, α 3B y β , además, algunas de estas subunidades han sido detectadas en las interneuronas (Dent, 2000). También se ha observado en el tratamiento de nematodos con ivermectina efectos en la reproducción y fecundidad, implicando un rol para los canales GluCl o canales estrechamente relacionados con estos procesos, Wolstenholme (2012) menciona que *C. elegans* es portador de mutaciones en algunos genes GluCl provocando una reducción en la producción de huevos, sin embargo, el mecanismo es desconocido, puesto que no se ha informado la presencia de canales GluCl en algún tejido reproductivo.

2.4 Resistencia a ivermectina.

La ivermectina ha sido el fármaco más utilizado en la última década para el control de endo y ectoparásitos incluyendo *R. microplus* en México (Aguilar *et al.*, 2003; Fox *et al.*, 2006; Guerrero *et al.*, 2012). Los resultados positivos de esta lactona macrocíclica en términos de control de parásitos, ha causado la presión selectiva por la aplicación intensiva de este producto, provocando la resistencia en varios de estos parásitos, incluidos los nematodos *Onchocerca volvulus* (Townson *et al.*, 1994), *Cooperia spp.* (Coles *et al.*, 2001) y *Haemonchus contortus* (Kaplan, 2004) y ácaros como *Sarcoptes scabiei* (Currie *et al.*, 2004) y *Tetranychus urticae* (Know *et al.*, 2010), y artrópodos como la cucaracha común (*Blattella germanica*), la polilla de la col (*Plutella xylostella*) y el escarabajo de la papa (*Leptinotarsa decemlineata*) (Guerrero *et al.*, 2012), sin embargo, la resistencia de garrapatas a lactonas

macrocíclicas ha sido raramente documentada. El primer reporte de resistencia en garrapatas a lactonas macrocíclicas fue realizado por Martins y Furlong (2001) en Brasil, en un ensayo de campo en *R. microplus*, donde se informó resistencia cruzada a doramectina, ivermectina y moxidectina; posteriormente Klafke *et al.* (2006), reportaron una población de *R. microplus* resistente a ivermectina en Sao Paulo, Brasil, con una relación de resistencia (RR) de 3.78. En México el primer informe de resistencia a ivermectina en cepas de campo de *R. microplus* fue realizado por Pérez Cogollo *et al.* (2010) en el estado de Yucatán; y en 2012 Fernández Salas *et al.* encontraron poblaciones de *R. microplus* multirresistentes a acaricidas (organofosforados, piretroides sintéticos y amidinas) e ivermectina. Finalmente, en Uruguay, Castro Janer *et al.* (2011) reportaron poblaciones de garrapatas de campo *R. microplus* con RR entre 1.38 y 1.98 a través de la Prueba de Inmersión Larval (LIT), lo cual es indicativo de una resistencia incipiente a ivermectina.

Las bases moleculares de resistencia a las lactonas macrocíclicas aún se desconoce; la resistencia a ivermectina en nematodos y algunos artrópodos ha sido asociada a la insensibilidad del receptor GluCl, lo que previene la unión del fármaco a su sitio blanco (McCavera *et al.*, 2009; Kwon *et al.*, 2010). En artrópodos, la resistencia a lactonas macrocíclicas también ha sido asociada a un incremento en el metabolismo oxidativo; estos mecanismos metabólicos de detoxificación son mediados por familias de enzimas, incluyendo el citocromo P450, esterasas y glutatión-S-transferasa; estas enzimas oxidan, hidrolizan y conjugan el sustrato; y otras proteínas como los transportadores ABC, las cuales transportan los xenobióticos al exterior de las células (Le Gall *et al.*, 2018).

Estudios han demostrado que el papel más importante de detoxificación de ivermectina en *R. microplus* lo desempeñan los transportadores ABC, seguidos de las enzimas esterasas, glutatión-S-transferasa y citocromo P450 (Le Gall *et al.*, 2018). Pohl *et al.* (2011) evidenciaron un aumento en la toxicidad por ivermectina, disminución de la oviposición y viabilidad del huevo en garrapatas hembras adultas

alimentadas con sangre tratada con inhibidores de transportadores ABC (ciclosporina A [CsA] y el leucotrieno MK571) e ivermectina; así mismo otra investigación probó que la unión del inhibidor CsA a los transportadores ABC evita la translocación de sustancias tóxicas desde el entorno intracelular al extracelular, permitiendo que se produzcan los mecanismos tóxicos de la ivermectina en *R. microplus*, provocando un aumento del 60% en la mortalidad de las garrapatas resistentes a este fármaco y una reducción del 50% en el tiempo necesario para matar larvas (Le Gall *et al.*, 2018).

2.5 Estudios proteómicos en artrópodos y *R. microplus*.

El término proteoma se refiere a todas las proteínas que son expresadas por el genoma de un tejido o célula, siendo que la mayoría de las funciones biológicas de los organismos vivos son mediadas por dichas proteínas (Chinnasamy, 2005; Pando y Ferreira, 2007). El proteoma es un elemento enormemente dinámico en los organismos, ya que sus componentes varían dependiendo del tejido, célula o compartimento celular que se estudie y estos a su vez, pueden cambiar debido a alteraciones en su ambiente, como situaciones de estrés, acción de fármacos, requerimientos energéticos y estado fisiológico (normal o patológico) (Pando y Ferreira, 2007).

La proteómica es un método preciso, sensible y de alto rendimiento que proporciona información sobre los cambios fisiológicos a nivel celular (Shen *et al.*, 2017); a la fecha existen estudios proteómicos realizados en garrapatas; Rachinsky *et al.* (2007a, 2007b) estudiaron la expresión diferencial de proteínas en ovarios e intestino medio de garrapatas *R. microplus* infectadas y no infectadas con *B. bovis*, con la finalidad de identificar proteínas específicas involucradas en la transmisión del patógeno. Posteriormente, se obtuvo el proteoma intestinal de *R. microplus* semi-repletas con el objetivo de determinar proteínas implicadas en el proceso de alimentación de la garrapata, ya que el intestino es la primer región del cuerpo de las garrapatas donde la sangre de los bovinos y microorganismos son ingeridos y

tienen contacto con los tejidos internos (Kongsuwan *et al.*, 2009); además se ha investigado el mapa proteómico del sialome de *R. microplus* (Tirloni *et al.*, 2014), contribuyendo al entendimiento del rol de los moduladores salivales en la defensa inmunológica de las garrapatas y la identificación de nuevos antígenos para el desarrollo de vacunas contra *R. microplus*.

El análisis de perfiles proteómicos también pueden proporcionar información útil para comprender la relación entre los ixodíctidos y los mecanismos de resistencia y susceptibilidad de las garrapatas, junto con la identificación de proteínas que tienen un papel clave en estos procesos fisiológicos. Aguilar-Díaz *et al.* (2018), lograron caracterizar las diferencias entre los proteomas de hemolinfa de cepas *R. microplus* susceptibles y multi-resistentes a ixodíctidos (organofosforados, piretroides y amidinas). Referente a la resistencia a lactonas macrocíclicas en artrópodos, el único reporte proteómico que se tiene a la fecha es en el ácaro rojo de los cítricos (*Panonychus citri*) expuesto a abamectina, lográndose visualizar a través de electroforesis 2DE 26 proteínas expresadas diferencialmente en respuesta a la exposición del fármaco, de las cuales 16 proteínas fueron identificadas por espectrometría de masas (MS) y se encontró que estas estaban involucradas principalmente en el metabolismo energético y detoxificación del ácaro (Shen *et al.*, 2017).

OBJETIVOS

General

Determinar las diferencias del mapa proteómico intestinal entre garrapatas *R. microplus* susceptibles y resistentes a IVM.

Específicos

1. Realizar electroforesis 2DE de los intestinos de *R. microplus* susceptibles y resistentes a ivermectina.
2. Realizar el análisis comparativo de los proteomas de intestino de garrapatas *R. microplus* susceptibles y resistentes a ivermectina.

HIPÓTESIS

Existe un perfil proteómico de expresión diferencial entre las proteínas intestinales de garrapatas *R. microplus* susceptibles y resistentes a ivermectina.

III. METODOLOGÍA

3.1 Obtención de intestinos de garrapatas *R. microplus* susceptibles y resistentes a IVM.

Las muestras biológicas en esta investigación, se obtuvieron a partir de dos cepas de *R. microplus*; una de ellas susceptible a IVM, para esta propuesta se usó la cepa Media Joya, la cual es referencia a nivel nacional ya que se ha demostrado ser susceptible a todos los ixodicidas. La cepa resistente a IVM se obtuvo generacionalmente a partir de las garrapatas susceptibles presionadas continuamente con IVM a una dosis de 50 µg/kg de peso del animal como lo realizado por Klafke *et al.* (2006).

Las muestras intestinales se obtuvieron de garrapatas semi-repletas *R. microplus*, para lo cual se infestó un bovino con 1g de larvas de garrapatas *R. microplus* susceptibles a IVM y otro bovino con 1g de larvas de garrapatas resistentes a IVM; ambas cepas mantenidas en el laboratorio bajo condiciones controladas. Los bovinos que se utilizaron para mantenimiento de las cepas de *R. microplus* estuvieron alojados en la Nave de Infectómica Animal (NINFA) ubicada en el rancho de Amazcala de la Facultad de Ciencias Naturales-UAQ. Entre los 17 y 19 días post-infestación se colectaron las garrapatas para la disección de intestinos. Las garrapatas se lavaron con agua corriente y se desinfectaron con solución de cloruro de benzalconio al 10%. La disección de los intestinos se realizó siguiendo la metodología descrita por Edwards *et al.* (2009); se preparó una caja Petri colocando 1 cm de cinta doble cara en donde se posicionó a la garrapata con ayuda de pinzas entomológicas para inmovilizarla, se cubrió la garrapata con una gota de solución salina de fosfatos (PBS pH7) para evitar su desecación, con tijeras entomológicas se cortó alrededor del borde del escudo de la garrapata, posteriormente se levantó el exoesqueleto dorsal con una pinza y se comenzó a diseccionar y separar el tejido conectivo, traqueolas, ovarios, glándulas salivales y otros órganos hasta encontrar el intestino, el cual es una estructura color rojo

oscuro en forma de telaraña (todo este proceso se efectuó bajo el microscopio estereoscópico). Una vez separados los intestinos se colocaron en una caja Petri con PBS y se lavaron por agitación con ayuda de pinzas para retirar la mayor cantidad posible de sangre. Posteriormente se separaron éstos en grupos de ocho en un tubo eppendorf de 1.5 ml mantenido en hielo con PBS y cóctel de inhibidor de proteasas (Complete Protease Inhibitor Cocktail. No. Cat. 11 697 498 001. ROCHE, Alemania). Las muestras fueron almacenadas a -80 °C.

3.2 Extracción y purificación de proteínas de intestinos de *R. microplus*.

Las alícuotas de intestinos fueron descongeladas individualmente, cada una se mezcló por agitación hasta lisar los intestinos; posteriormente se lavaron tres veces con PBS (pH 7) centrifugado a 14,000 rpm por 5 minutos a 4 °C, el sobrenadante se eliminó y a la pastilla se le añadió 500 µl de amortiguador de lisis TNTE (Tris 50mM [pH 7.4], NaCl 150 mM, tritón 0.5% y EDTA 1mM) y 20 µl de cóctel de inhibidores de proteasas (Complete Protease Inhibitor Cocktail. No. Cat. 11 697 498 001. ROCHE, Alemania), se mezcló por agitación y se dejó actuar por 15 minutos a 4°C. Las muestras se sometieron a una segunda lisis celular mediante ultrasonicación (en baño de hielo) por un tiempo total de 3 minutos, en ciclos compuestos por pulsos de 30 segundos (80% de amplitud) y pausas de 30 segundos. El lisado se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 minutos a 4 °C. Se colectó la muestra de la capa intermedia del tubo eppendorf y se purificó mediante el kit comercial ReadyPrep 2D Cleanup (No. Cat. 163 2130. BIO-RAD, USA).

3.3 Preparación de las muestras.

Una vez purificadas las muestras intestinales, se procedió a la cuantificación de proteínas para todas las muestras por el método de Bradford. Se realizaron seis diluciones (2, 1.75, 1.5, 1.25, 1 y 0.75 mg/ml) de albúmina sérica bovina (No. Cat. 5000206. BIO-RAD, USA) mezclada con reactivo de Bradford (No. Cat. 5000205.

BIO-RAD, USA); la placa con las diluciones de albúmina y muestras fueron ingresadas al espectrofotómetro para su lectura a 565 nm. A partir de un coeficiente de determinación (R^2) mayor a 0.98 obtenido en la curva estándar se calculó la concentración final de proteínas de las muestras analizadas.

Se prepararon alícuotas de 20 μ l de las muestras purificadas (10 μ l de muestra y 10 μ l de amortiguador de carga para proteínas), para evaluar la integridad de las proteínas en un gel 1D; éstas se hirvieron durante 5 minutos y centrifugaron a 14,000 rpm por 5 minutos a 4 °C, el gel de poliacrilamida se preparó al 12%, en el primer pocillo se cargó marcador de masa molecular Precision Plus Protein Dual Color Standards (No. Cat. 161-0374. BIO-RAD, USA) y en los siguientes pocillos un aproximado de 40 μ g de muestra de ambos tratamientos. El gel se electroforó a 108 V por aproximadamente dos horas, con amortiguador de electroforesis de proteínas (Glicina 192 mM, Tris base 25 mM y SDS 0.1%), posteriormente se tiñó con azul de Coomassie G-250 (No. Cat. 161 0786. BIO-RAD, USA) para la visualización de las proteínas.

Posteriormente las proteínas de las muestras se prepararon a una concentración de 225 μ g, la cuales se disolvieron en un volumen total de 130 μ l con amortiguador de hidratación para electroforesis 2D (urea 8 M, ditiotreitól [DTT] 50 mM, CHAPS 2%, azul de bromofenol 0.001% y anfolinas 0.2% [100X Bio-Lyte 3-20 ampholytes, No. Cat. 1632094, BIO-RAD, USA]). Con estas muestras se hidrataron tiras IPG de 7 cm con un rango de pH de 3-10, (ReadyStrip IPG, No. Cat. 163-2099. BIO-RAD, USA), pH 4-7 (ReadyStrip IPG, No. Cat. 163 2099. BIO-RAD, USA) y pH 7-10 (ReadyStrip IPG, No. Cat. 163 2005 BIO-RAD, USA).

3.4 Electroforesis 2DE.

La separación de las proteínas mediante un gradiente de pH en primera dimensión, se realizó por isoelectroenfoco (IEF). Las tiras IPG se colocaron sobre la cámara de rehidratación cuidadosamente con el gel en contacto con las muestras

preparadas y sobre éstas se agregaron 1,000 µl de aceite mineral y se dejaron hidratar toda la noche. La cámara de isoelectroenfoque se preparó colocando en los extremos y sobre los electrodos papeles rectangulares (Electrode Wicks, No. Cat. 1654071, BIO-RAD, USA) en cada canal de la cámara, y se agregaron 20 µl de agua ultrapura (Ready Prep Proteomics Garde Water, No. Cat. 1632091, BIO-RAD, USA) sobre los papeles. Posteriormente se sacaron las tiras de la cámara de rehidratación con pinzas y se lavaron con amortiguador de electroforesis de proteínas (Glicina 192 mM, Tris base 25 mM y SDS 0.1%) y se colocaron sobre la cámara de isoelectroenfoque cuidadosamente. Sobre las tiras se agregó 1 ml de aceite mineral. El protocolo de isoelectroenfoque constó de 3 pasos: Paso 1: 250 V con una duración de T: 40 minutos Lineal. Paso 2: 4000 V con una duración de T:3 horas Lineal. Paso 3: 4000 V con una duración de T: 10,000 V/hr Rápido. El tiempo total del procedimiento de separación fue aproximadamente de 7 horas.

Antes de la separación de las proteínas de acuerdo a su masa molecular, se equilibraron las tiras IPG en amortiguador de equilibrio que contiene urea 6 M, Glicerol 30%, Tris HCl 0.375 M pH 8.8, SDS 2 % w/v y Azul de bromofenol 0.002 %; con unas pinzas se retiraron la tiras de la cámara de isoelectroenfoque, se lavaron y se incubaron en 5 ml de amortiguador de equilibrio (DTT al 2 % por 15 minutos). Después se incubaron en 5 ml del mismo amortiguador de equilibrio (iodacetamida al 2.5 % por 15 minutos).

La separación de las proteínas de acuerdo a su masa molecular se realizó mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida. Los geles se prepararon al 12 % y para colocar el marcador de masa molecular se utilizó un trozo de papel filtro con 3 µl de marcador Precision Plus Protein Dual Color Standards (No. Cat. 161-0374. BIO-RAD, USA); se colocaron las distintas tiras en los geles y sobre la preparación se añadió agarosa al 0.5 % con azul de bromofenol 0.002 % para sellar las tiras. Los geles fueron electroforados a 108 V por aproximadamente dos horas, con amortiguador de electroforesis de proteínas (Glicina 192 mM, Tris base 25 mM y SDS 0.1%). Los geles de doble dimensión se tiñeron con azul de Coomassie G-250

(No. Cat. 161 0786. BIO-RAD, USA) bajo las condiciones del proveedor y en el caso necesario con plata (Silver Stain Plus kit, No. Cat. 1610449, BIO-RAD, USA).

3.5 Análisis de los geles de doble dimensión mediante el programa PDQuest y análisis estadístico.

Los mapas proteómicos obtenidos fueron comparados en el programa PDQuest (PDQuest Advanced 2D Analysis Software, No. Cat. 170-9630. BIO-RAD, USA). Las manchas (proteínas) se detectaron al sobreponer las imágenes de los geles con el gel maestro previamente obtenido. La imagen cruda del gel maestro se le restó fondo y filtró para obtener la intensidad en píxeles de las manchas seleccionadas para todos los tratamientos evaluados. Las proteínas expresadas diferencialmente fueron analizadas para determinar la significancia estadística entre condiciones; el análisis estadístico se realizó a través de la normalización de las manchas en base a un modelo de regresión lineal. Las diferencias estadísticamente significativas fueron calculadas a partir de un análisis de grupos para determinar las diferencias en el nivel de expresión entre las condiciones analizadas registrados a un nivel de confianza de 90% por grupo (t-student); en el caso necesario las diferencias de intensidad de área en píxeles entre las manchas de los grupos comparados fueron valorados en el programa Excel. Las proteínas expresadas diferencialmente en los proteomas analizados se seleccionaron y marcaron con su punto isoeléctrico y peso molecular.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las muestras proteicas obtenidas de la extracción y purificación con el kit ReadyPrep 2D Clean up se cuantificaron empleando el reactivo de Bradford; se obtuvo una curva estándar a partir de albúmina sérica bovina (Figura 11), con la media de tres réplicas a concentraciones de 2, 1.75, 1.5, 1.25, 1, 0.75 mg/ml de proteína, la absorbancia fue medida a una longitud de onda de 595 nm. El criterio de elección tomado en consideración fue un coeficiente de determinación (R^2) mayor a 0.98. Los resultados obtenidos muestran un R^2 de 0.99, de tal manera que el intervalo de concentración comprendido, satisface las condiciones de linealidad del método analítico. La ecuación $y= 0.1900x-0.0279$, se empleó para calcular la concentración de proteínas desconocida (x) correspondiente a cada muestra intestinal purificada de ambos grupos de garrapatas a evaluar.

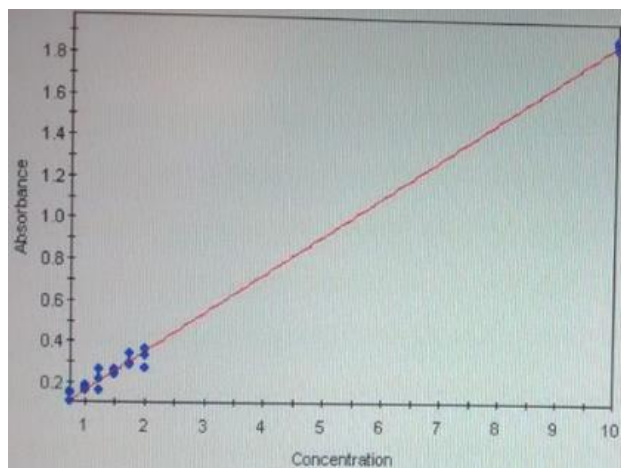


Figura 11. Curva estándar de albúmina bovina con reactivo de Bradford utilizada para la determinación de concentración de proteína de las muestras.

La concentración de proteínas de las muestras evaluadas de los intestinos de garrapatas *R. microplus* resistentes y susceptibles a ivermectina se muestran en el Cuadro 2. El promedio de concentración de proteína para la cepa susceptible fue de 3.5316 mg/ml y para la cepa resistente 2.1876 mg/ml, presentándose más de 1.6

mg de proteínas por mililitro en las garrapatas susceptibles en relación con las resistentes a ivermectina, este suceso podría estar relacionado con la toma y preparación las de muestras biológicas, la talla individual de las garrapatas, longitud de los intestinos recolectados y lavado de los mismos; además podría justificarse con teorías de evolución, las cuales proponen que los organismos expuestos a condiciones ambientales adversas tienen que lidiar con la compensación de energía y tener recursos limitados para el crecimiento, reproducción y defensa para hacer frente a esas condiciones (Tilman, 2000), viéndose de esta forma afectada la producción de proteínas en las garrapatas presionadas con ivermectina.

Cuadro 2. Concentración de proteínas intestinales de *R. microplus* resistentes y susceptibles a IVM.

| Cepa <i>R. microplus</i> | Ensayo | Concentración [mg/ml] | Concentración promedio [mg/ml] |
|---------------------------------|---------------|------------------------------|---------------------------------------|
| Susceptible | 1 | 2.338 | 3.5316 |
| | 2 | 2.343 | |
| | 3 | 3.350 | |
| | 4 | 4.943 | |
| | 5 | 4.684 | |
| Resistente | 1 | 2.638 | 2.1876 |
| | 2 | 2.319 | |
| | 3 | 2.655 | |
| | 4 | 2.786 | |
| | 5 | 3.178 | |

La concentración de proteínas estimada mediante el método de Bradford y la integridad de las proteínas para los dos tratamientos fue verificada a través de una electroforesis SDS PAGE, dicho gel se electroforó a 108 V permitiendo la separación de las proteínas de acuerdo a su masa molecular. En la Figura 12 se observa el patrón electroforético de proteínas para la cepa susceptible tanto para la resistente, siendo que en los carriles del gel se cargaron 5, 10 y 15 µl de extracto de proteínas de las muestras purificadas.

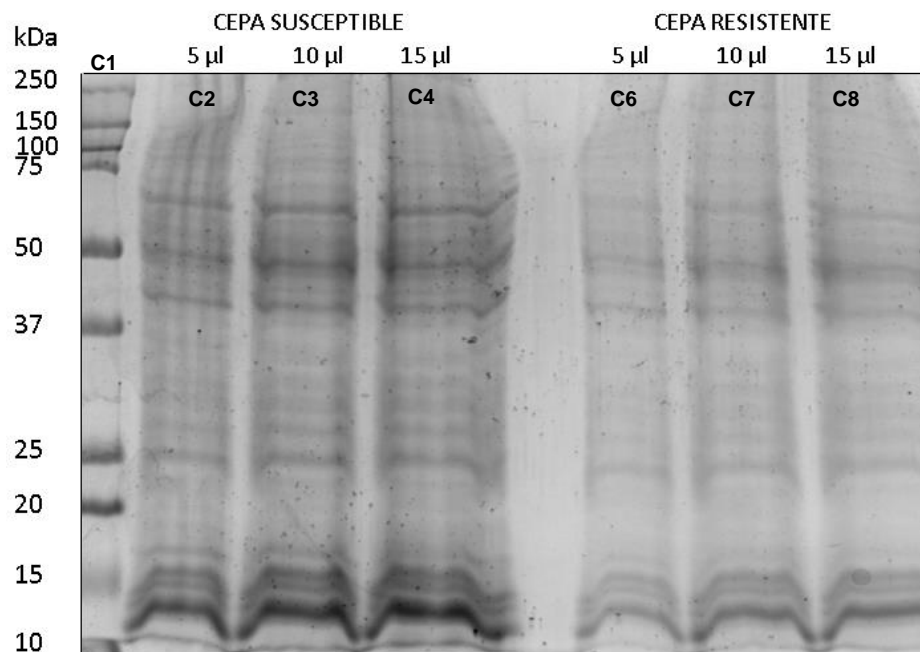


Figura 12. Análisis de integridad de proteínas por gel de poliacrilamida 1D. Carril 1: marcador de masa molecular, carril 2, 3 y 4: 5, 10 y 15 μ l de extracto de proteínas cepa susceptible, carril 6, 7 y 8: 5, 10, 15 μ l de extracto de proteínas cepa resistente.

Una vez evaluada la integridad y concentración de proteínas, se llevó a cabo la electroforesis 2DE para las muestras intestinales de garrapatas *R. microplus* susceptibles y resistentes a ivermectina. En las Figuras 13 y 14 se muestra el patrón electroforético bidimensional de las proteínas intestinales de garrapatas susceptibles y resistentes a ivermectina, en cada figura se exponen tres geles 2DE que pertenecen a las réplicas biológicas de los experimentos. Los geles 2DE corresponden al formato preparativo en tiras de gel de poliacrilamida en gradiente inmobilizado de 7 cm, pH 3-10, donde la mayoría de las manchas se visualizaron en un pI de 5-8 y un rango de masa molecular que va de 10 a 80 kDa, este resultado concuerda con lo reportado por Kongsuwan *et al.* (2009), quienes estudiaron el mapa proteómico del intestino medio de garrapatas *R. microplus* semirepletas para la identificación de proteínas involucradas en la alimentación del parásito mediante

electroforesis 2DE, demostrando que la mayoría de las proteínas se encontraron en un pl de 4-8 con masas moleculares oscilantes entre 10-80 kDa.

Las réplicas de los de los geles 2DE pH 3-10 de ambos grupos de garrapatas *R. microplus* se obtuvieron con la finalidad de ser analizadas mediante el programa PDQuest. El programa identificó en promedio 63 manchas para el proteoma intestinal de las garrapatas susceptibles a ivermectina y 49 para las resistentes. El análisis estadístico para determinar la significancia de las diferencias en los ensayos se realizó a través de la normalización de las manchas con base a un modelo de regresión lineal con un nivel de confianza del 90% entre la cepa susceptible y resistente, en la cual se obtuvo un coeficiente de relación de 0.55 entre grupos; 13 proteínas se observaron dos veces más sobreexpresadas y cuatro proteínas más de dos veces subexpresadas de acuerdo a los resultados graficados por el programa PDQuest.

Los resultados obtenidos a partir de la regresión lineal y las diferencias en intensidad de área entre las manchas identificadas en el proteoma de las garrapatas susceptibles y resistentes a ivermectina (Cuadro 3), demuestran que se sobreexpresaron más de 2 veces un mayor número de proteínas en el intestino de la cepa resistente a ivermectina en comparación con las susceptibles. En la Figura 15 se muestran algunas de las proteínas expresadas diferencialmente entre tratamientos.

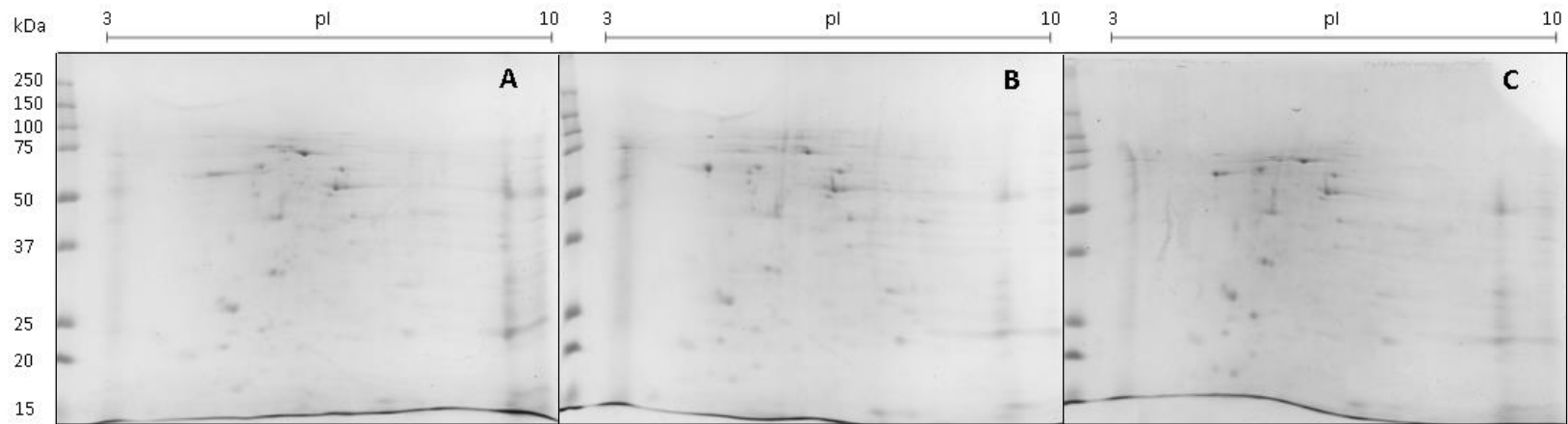


Figura 13. Mapas proteómicos intestinales obtenidos a través de geles 2DE de *R. microplus* susceptibles a IVM. Cada imagen (A,B,C) representa un ensayo, 225 μ g de proteínas fueron cargadas en los geles 2DE, pH 3-10.

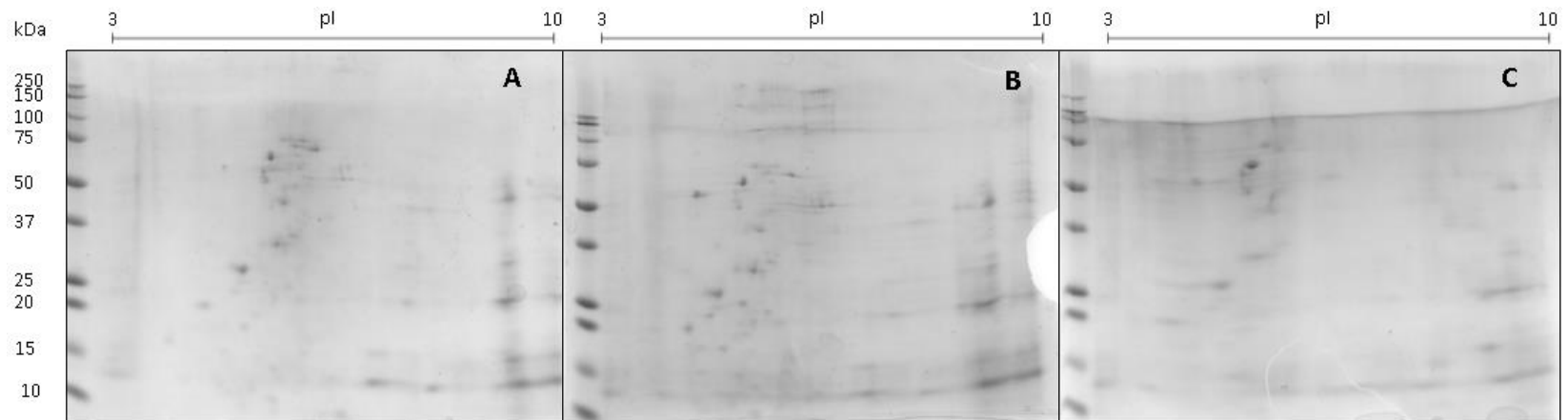


Figura 14. Mapas proteómicos intestinales obtenidos a través de geles 2DE de *R. microplus* resistentes a IVM. Cada imagen (A,B,C) representa un ensayo, 225 μ g de proteínas fueron cargadas en los geles 2DE, pH 3-10.

Cuadro 3. Nivel de intensidad de área así como el promedio, desviación estándar y diferencia de intensidad de área de las manchas identificadas entre los tratamientos evaluados para los geles 2DE, pH 3-10.

| Código de la mancha | SUSCEPTIBLES | | | | | RESISTENTE | | | | | Diferencia en intensidad de área |
|---------------------|--------------|-----------|-----------|-----------------------------|---------------------|------------|-----------|-----------|-----------------------------|---------------------|----------------------------------|
| | Ensayo 1 | Ensayo 2 | Ensayo 3 | Promedio intensidad de área | Desviación estándar | Ensayo 1 | Ensayo 2 | Ensayo 3 | Promedio intensidad de área | Desviación estándar | |
| A | 218730.6 | 1167313.5 | 447845.8 | 611296.633 | 494964.151 | 624817.8 | 9889544 | 4526309.5 | 5013557.1 | 4651542.28 | 0.12192873 |
| B | 2483858.3 | 5009193 | 2949079.5 | 3480710.27 | 1343987.46 | 965987.1 | 17544254 | 5535811 | 8015350.7 | 8562757.8 | 0.43425552 |
| C | 237408.8 | 220677.7 | 1740225.4 | 732770.633 | 872521.526 | 99655.9 | 717353.1 | 320062.8 | 379023.933 | 313041.162 | 1.93330966 |
| D | 1684753.1 | 3553965 | 5631705 | 3623474.37 | 1974393.83 | 2081517.9 | 18841410 | 130110032 | 50344320 | 69585559.6 | 0.07197385 |
| E | 2401247.3 | 1654804.3 | 1015123.1 | 1690391.57 | 693747.011 | 4944054 | 10353776 | 9057292 | 8118374 | 2824437.69 | 0.208218 |
| F | 1321113.8 | 531417.9 | 2348467.5 | 1400333.07 | 911111.454 | 3312724.8 | 16350766 | 3243407.8 | 7635632.87 | 7547606.27 | 0.1833945 |
| G | 266671.6 | 1013139.7 | 207932.4 | 495914.567 | 448891.916 | 1818586.8 | 797367.2 | 442797.9 | 1019583.97 | 714306.652 | 0.48638914 |
| H | 164726 | 86170.5 | 242899.5 | 164598.667 | 78364.5776 | 3080587 | 12652.9 | 124994.4 | 1072744.77 | 1739749.4 | 0.15343693 |
| I | 2268143 | 1963507.8 | 2886576 | 2372742.27 | 470339.75 | 413153.1 | 6128111.5 | 11118067 | 5886443.87 | 5356547.19 | 0.40308586 |
| J | 1133706.4 | 63265.2 | 366944.5 | 521305.367 | 551662.531 | 445477.1 | 1443172.4 | 2896638 | 1595095.83 | 1232622.4 | 0.32681758 |
| K | 3019182.8 | 786318.9 | 3650127 | 2485209.57 | 1504724.15 | 1781694.3 | 5265829 | 2884252 | 3310591.77 | 1780764.68 | 0.75068439 |
| L | 272734.2 | 928696.7 | 814732.7 | 672054.533 | 350484.657 | 1272728.6 | 1375670 | 76950080 | 26532826.2 | 43662652.9 | 0.02532917 |
| M | 2035640.3 | 126467.8 | 2434026.3 | 1532044.8 | 1233455.67 | 843802.5 | 2614520.3 | 190903.5 | 1216408.77 | 1254035.95 | 1.25948188 |
| N | 787059.4 | 1494081.4 | 2078623.9 | 1453254.9 | 646749.423 | 1967841.8 | 4094704.5 | 79939 | 2047495.1 | 2008567.65 | 0.7097721 |
| O | 7692177 | 2888371.8 | 2582571 | 4387706.6 | 2865837.05 | 8791625 | 32302958 | 44997936 | 28697506.3 | 18370457.3 | 0.15289505 |
| P | 1085625 | 91545.6 | 1681752.8 | 952974.467 | 803359.731 | 1506226 | 2171463.8 | 356173.4 | 1344621.07 | 918371.888 | 0.70873088 |
| Q | 8147727.5 | 1475070.6 | 6453628.5 | 5358808.87 | 3468437.7 | 3891597.5 | 30501888 | 8301430.5 | 14231638.7 | 14261921.9 | 0.37654194 |

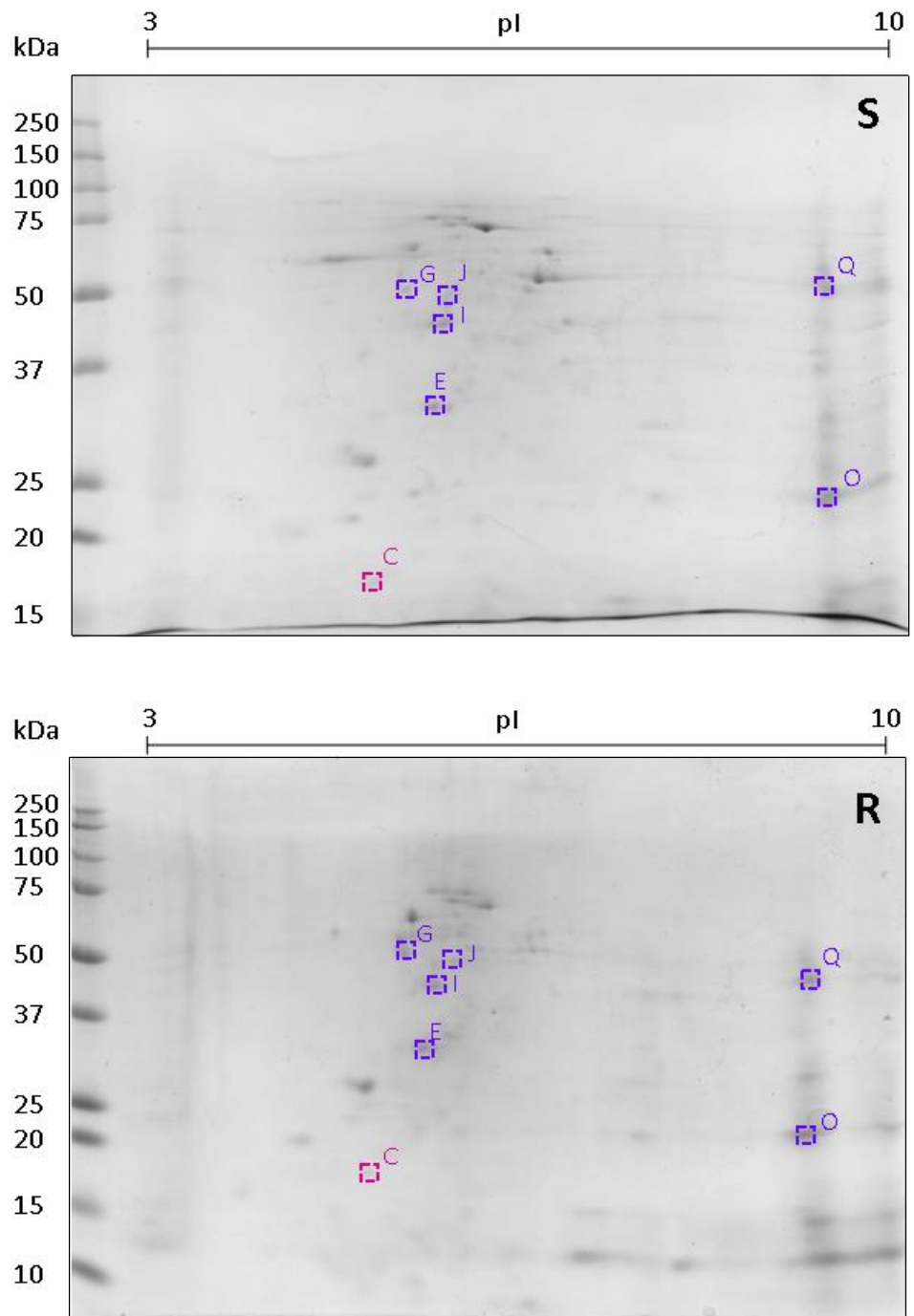


Figura 15. Análisis comparativo entre los geles 2DE, pH 3-10 de intestinos de *R. microplus* susceptibles (S) y resistentes (R) a IVM. En rojo se muestran las proteínas sobreexpresadas en el grupo S y en morado las proteínas sobreexpresadas en el grupo R.

La visualización de los geles 2DE con pH 3-10 fue óptima, no obstante, se decidió ampliar el rango de pH de los geles 2DE para lograr una detallada visualización de las manchas, por lo cual se realizaron geles con formato preparativo en tiras de gel de poliacrilamida con gradiente inmovilizado de 7 cm, pH 4-7 y 7-10.

Los geles 2DE con pH 4-7 mostraron un patrón de proteínas con masas moleculares de 12 a 80 kDa para ambos tratamientos. El análisis comparativo de los geles en el programa PDQuest (Figura 16) reveló un total de 41 manchas para el proteoma intestinal de las garrapatas *R. microplus* susceptibles a ivermectina y 38 manchas para la cepa resistente, de los cuales se detectaron 15 manchas específicas para la cepa susceptible y 12 para la resistente, y 26 manchas coincidieron en ambos grupos, dichas manchas (proteínas) disminuyeron o aumentaron su expresión entre tratamientos (Cuadro 4 y Figura 17).

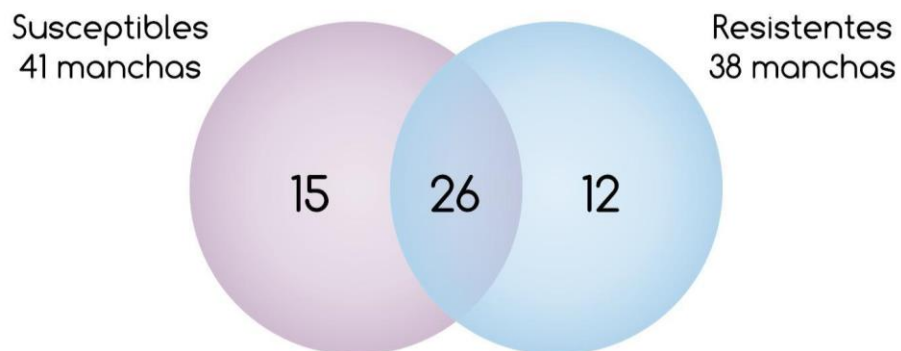


Figura 16. Análisis de la relación entre las proteínas de intestino de *R. microplus* susceptibles y resistentes a IVM identificadas en los geles 2DE, pH 4-7 realizado a través del Diagrama de Venn, mediante el software Lucichart.

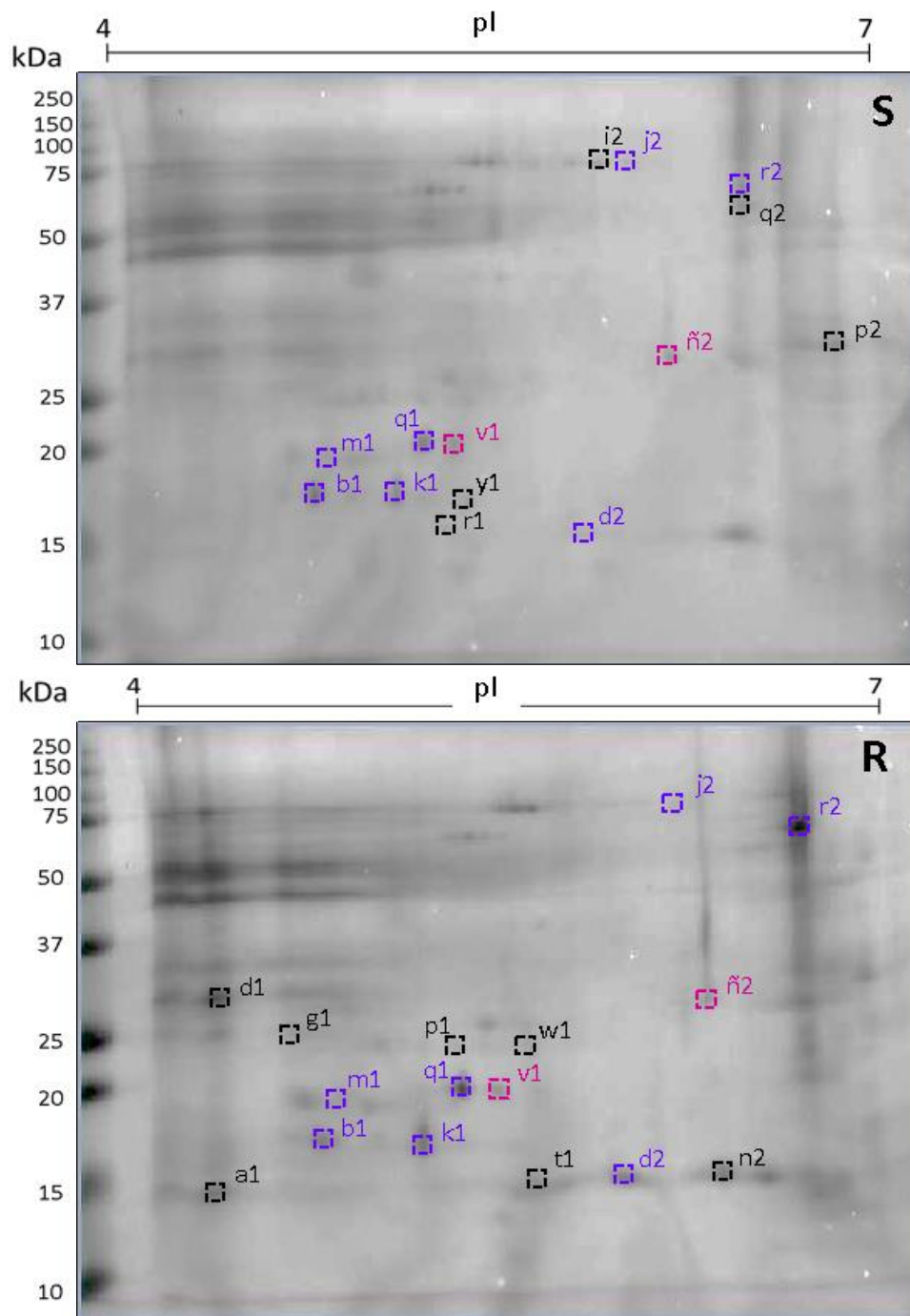


Figura 17. Análisis comparativo entre los geles 2DE, pH 4-7 de intestinos de *R. microplus* susceptibles (S) y resistentes (R) a IVM. En negro se muestran las proteínas exclusivas de cada cepa, en rojo las proteínas sobreexpresadas en el grupo S y en morado las proteínas sobreexpresadas en el grupo R.

El análisis para determinar las diferencias en la expresión de las proteínas entre los proteomas de los tratamientos evaluados garrapatas susceptibles y resistentes a ivermectina, se efectuó a través de una relación de intensidad de área de las manchas visualizadas entre el proteoma intestinal de las garrapatas *R. microplus* susceptibles y resistentes a ivermectina. En el Cuadro 4 se muestra la diferencia en intensidad de área de las manchas identificadas, dónde la flecha indica un aumento (↑) o una disminución (↓) en la expresión de proteínas de garrapatas susceptibles a ivermectina respecto a las resistentes, la ausencia de flecha indica una proteína presente únicamente en una cepa.

Cuadro 4. Análisis de la intensidad de área de las proteínas expresadas diferencialmente en los intestinos de garrapatas *R. microplus* resistentes y susceptibles a ivermectina. Geles 2DE, pH 4-7.

| CÓDIGO DE LA PROTEÍNA | NIVEL DE EXPRESIÓN | | DIFERENCIA DE INTENSIDAD DE ÁREA DE PÍXELES |
|-----------------------|--------------------|------------|---|
| | SUSCEPTIBLE | RESISTENTE | |
| a1 | | ↑ | |
| b1 | ↓ | ↑ | 3.0765 |
| c1 | ↓ | ↑ | 1.6522 |
| d1 | | ↑ | |
| f1 | | ↑ | |
| g1 | | ↑ | |
| h1 | ↑ | | |
| i1 | ↑ | | |
| j1 | ↑ | | |
| k1 | ↓ | ↑ | 3.4900 |
| l1 | ↓ | ↑ | 1.6691 |
| m1 | ↓ | ↑ | 1.5604 |
| n1 | | ↑ | |

| | | | |
|----|---|---|--------|
| o1 | ↓ | ↑ | 2.1078 |
| p1 | | ↑ | |
| q1 | ↓ | ↑ | 1.5542 |
| r1 | ↑ | | |
| s1 | ↓ | ↑ | 1.5558 |
| t1 | | ↑ | |
| u1 | | ↑ | |
| v1 | ↑ | ↓ | 1.3982 |
| w1 | | ↑ | |
| x1 | | ↑ | |
| y1 | ↑ | | |
| z1 | ↑ | | |
| a2 | ↑ | ↓ | 1.0037 |
| b2 | ↑ | | |
| c2 | ↑ | ↓ | 1.0689 |
| d2 | ↓ | ↑ | 6.2491 |
| e2 | ↑ | | |
| f2 | ↑ | | |
| g2 | ↓ | ↑ | 1.6608 |
| h2 | ↓ | ↑ | 1.5340 |
| i2 | ↑ | | |
| j2 | ↓ | ↑ | 2.0700 |
| k2 | ↑ | ↓ | 1.0951 |
| l2 | | ↑ | |
| m2 | ↓ | ↑ | 1.8229 |
| n2 | | ↑ | |
| ñ2 | ↑ | ↓ | 1.2303 |
| o2 | ↑ | | |
| p2 | ↑ | | |

| | | | |
|----|---|---|--------|
| q2 | ↑ | | |
| r2 | ↓ | ↑ | 4.3837 |

↑ proteína sobreexpresada, ↓ proteína subexpresada en pixeles.

Las diferencias en la expresión de proteínas intestinales entre el grupo susceptible y resistente a ivermectina, fueron graficadas automáticamente por el programa PDQuest a partir de la intensidad de área de pixeles de las manchas identificadas en los tratamientos comparados (Figura 18). Los resultados obtenidos en el análisis de intensidad de área de las manchas y los gráficos comparativos de PDQuest demuestran que existe mayor número de proteínas sobreexpresadas en el intestino de garrapatas resistentes a ivermectina en relación con las susceptibles. Las proteínas con código de identificación b1, k1, r2 y d2 mostraron visualmente mayores diferencias en el nivel de expresión, observándose significativamente sobreexpresadas en las garrapatas resistentes (Cuadro 4 y Figura 18).



Figura 18. Análisis comparativo de intensidad de área de proteínas expresadas diferencialmente entre los proteomas intestinales de *R. microplus* susceptibles y resistentes a IVM, realizado por el software PDQuest. Geles 2DE, pH 4-7. La barra izquierda representa la cepa resistente y la derecha la cepa susceptible.

Los proteomas intestinales visualizados en los geles 2DE con pH 7-10 de los tratamientos evaluados mostraron proteínas con masas moleculares de oscilantes entre 12-60 kDa (Figura 20). El análisis realizado en el programa PDQuest reveló un mapa proteómico intestinal con un total de 57 manchas en garrapatas *R. microplus* susceptibles a ivermectina y 61 para las garrapatas resistentes; de este total de manchas identificadas, 36 se presentaron en ambas condiciones, estas proteínas tuvieron diferente nivel de expresión de acuerdo a la intensidad de área de pixeles detectada en las manchas del proteoma de garrapatas susceptibles y resistentes a ivermectina (Cuadro 5 y Figura 20). Además, 21 manchas fueron encontradas exclusivamente en el mapa proteómico de las garrapatas susceptibles y 25 manchas en el caso de las garrapatas resistentes a ivermectina (Figura 19).

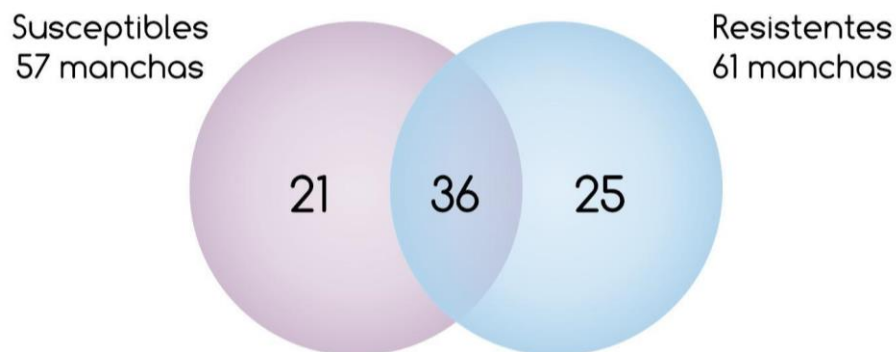


Figura 19. Análisis de la relación entre las proteínas de intestino de *R. microplus* susceptibles y resistentes a IVM identificadas en los geles 2DE, pH 7-10 realizado a través del Diagrama de Venn, mediante el software Lucichart.

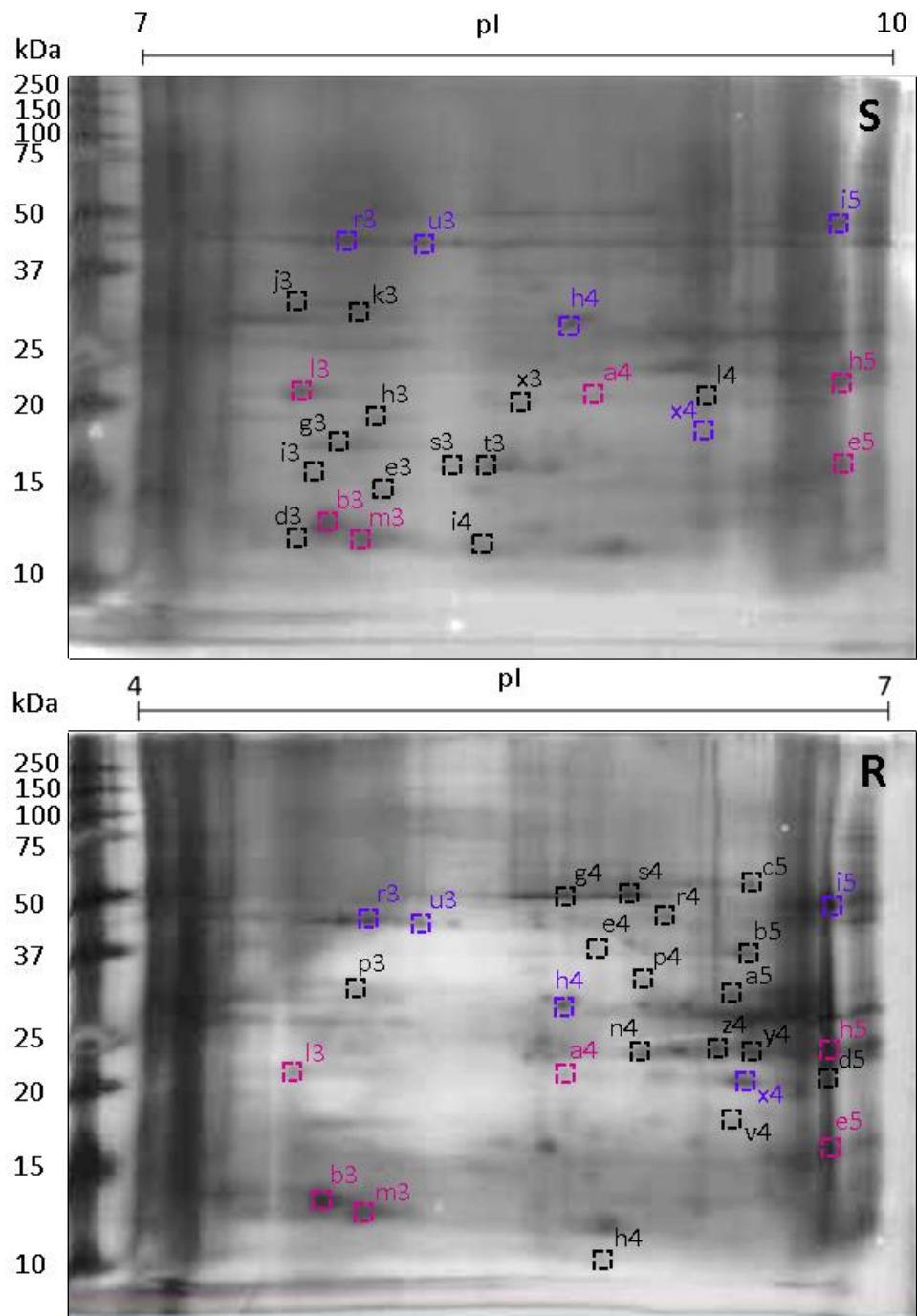


Figura 20. Análisis comparativo entre los geles 2DE, pH 7-10 de intestinos de *R. microplus* susceptibles (S) y resistentes (R) a IVM. En negro se muestran las proteínas exclusivas de cada cepa, en rojo las proteínas sobreexpresadas en el grupo S y en morado las proteínas sobreexpresadas en el grupo R.

La determinación de la sobreexpresión y subexpresión de las proteínas entre las cepas *R. microplus* susceptibles y resistentes a ivermectina identificadas en los geles 2DE con rango de pH de 7 -10, se realizó de la misma forma que con los geles con rango de pH 4-7, calculando el promedio de la intensidad de área de píxeles de cada mancha y la relación de intensidad entre la cepa susceptible y la resistente (Cuadro 5).

Cuadro 5. Análisis de la intensidad de área de las proteínas expresadas diferencialmente en los intestinos de garrapatas *R. microplus* resistentes y susceptibles a ivermectina. Geles 2DE, pH 7-10.

| CÓDIGO DE LA PROTEÍNA | NIVEL DE EXPRESIÓN | | DIFERENCIA DE INTENSIDAD DE ÁREA DE PÍXELES |
|-----------------------|--------------------|------------|---|
| | SUSCEPTIBLE | RESISTENTE | |
| a3 | ↓ | ↑ | 1.5788 |
| b3 | ↑ | ↓ | 7.5367 |
| c3 | ↑ | ↓ | 1.5665 |
| d3 | ↑ | | |
| e3 | ↑ | | |
| f3 | ↑ | | |
| g3 | ↑ | | |
| h3 | ↑ | | |
| i3 | ↑ | | |
| j3 | ↑ | | |
| k3 | ↑ | | |
| l3 | ↑ | ↓ | 2.0926 |
| m3 | ↑ | ↓ | 2.6986 |
| n3 | | ↑ | |
| ñ3 | | ↑ | |
| o3 | | ↑ | |
| p3 | | ↑ | |

| | | | |
|----|---|---|--------|
| q3 | ↑ | | |
| r3 | ↓ | ↑ | 3.0656 |
| s3 | ↑ | | |
| t3 | ↑ | | |
| u3 | ↓ | ↑ | 2.0838 |
| v3 | ↑ | ↓ | 1.7319 |
| w3 | ↓ | ↑ | 2.0267 |
| x3 | ↑ | | |
| y3 | ↑ | ↓ | 1.7625 |
| z3 | ↓ | ↑ | 2.0173 |
| a4 | ↑ | ↓ | 2.3936 |
| b4 | ↓ | ↑ | 1.7204 |
| c4 | ↓ | ↑ | 1.5457 |
| d4 | | ↑ | |
| e4 | | ↑ | |
| f4 | | ↑ | |
| g4 | | ↑ | |
| h4 | | ↑ | |
| i4 | ↑ | | |
| j4 | ↑ | | |
| k4 | ↑ | | |
| l4 | ↑ | | |
| m4 | ↑ | | |
| n4 | | ↑ | |
| o4 | ↓ | ↑ | 1.7737 |
| p4 | | ↑ | |
| q4 | ↓ | ↑ | 2.0162 |
| r4 | | ↑ | |
| s4 | | ↑ | |

| | | | |
|----|---|---|---------|
| t4 | ↑ | | |
| u4 | ↑ | ↓ | 1.9079 |
| v4 | | ↑ | |
| w4 | | ↑ | |
| x4 | ↓ | ↑ | 3.6449 |
| y4 | | ↑ | |
| z4 | | ↑ | |
| a5 | | ↑ | |
| b5 | | ↑ | |
| c5 | | ↑ | |
| d5 | | ↑ | |
| e5 | ↑ | ↓ | 15.4435 |
| f5 | ↓ | ↑ | 2.4120 |
| g5 | | ↑ | |
| h5 | ↑ | ↓ | 2.2267 |
| i5 | ↓ | ↑ | 2.6738 |

↑ proteína sobreexpresada, ↓ proteína subexpresada en pixeles.

El análisis comparativo entre los tratamientos se realizó igual al de los geles 2DE con pH 4-7. Los resultados arrojados por el programa PDQuest respecto a la intensidad de área de las manchas detectadas en los proteomas estudiados y los gráficos comparativos de nivel de expresión, demostraron que las mayores diferencias en nivel de expresión entre los dos grupos analizados se observaron en las proteínas con código de identificación e5 y b3, proteínas que inhibieron su expresión en las garrapatas resistentes a ivermectina en comparación con las susceptibles. En el caso contrario, las proteínas con código x4 Y r3 se visualizaron significativamente sobreexpresadas en el proteoma intestinal de *R. microplus* resistentes y subexpresadas en la cepa susceptible a ivermectina (Cuadro 5 y Figura 20).

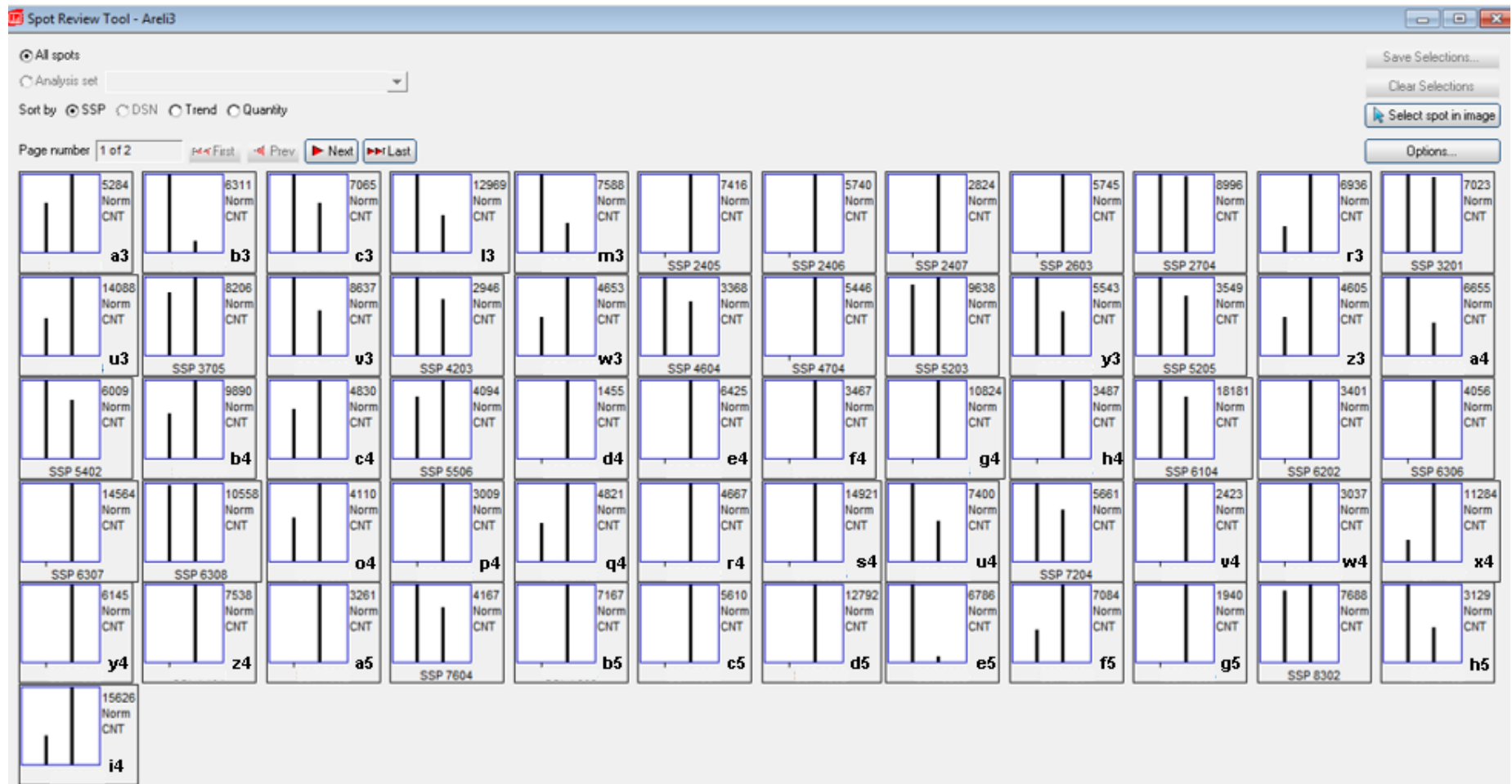


Figura 21. Análisis comparativo de intensidad de área de proteínas expresadas diferencialmente entre los proteomas intestinales de *R. microplus* susceptibles y resistentes a IVM, realizado por el software PDQuest. Geles 2DE, pH 7-10. La barra izquierda representa la cepa susceptible y la derecha la cepa resistente.

Los proteomas obtenidos de los geles 2DE con pH 4-7 y 7-10 en conjunto, revelaron un total de 98 manchas encontradas en el mapa proteómico de las garrapatas *R. microplus* susceptibles a ivermectina, de las cuales 36 fueron únicas de este grupo; en el proteoma intestinal de las garrapatas resistentes se expresaron 99 proteínas, siendo 37 de ellas exclusivas para este grupo, y un total de 62 proteínas fueron comunes para ambos grupos (Figura 22) las cuales se mostraron subexpresadas o sobreexpresadas. Comparado con el proteoma del intestino medio de garrapatas *R. microplus* obtenido por Kongsuwan *et al.* (2009) donde se identificaron 200 manchas, en este trabajo solamente se logró la visualización de la mitad del número de manchas por mapa proteómico de cada tratamiento, este resultado podría estar relacionado con algunas limitaciones técnicas o con el método de extracción de proteínas de las muestras intestinales, ya que Kongsuwan *et al.* lograron una separación de proteínas únicamente por centrifugación y amortiguador de extracción 2DE (10 mM Tris, 7 M urea, 2 M tiourea, 4% CHAPS y 1 mM inhibidor de proteínas) mientras que en este proyecto se extrajeron las proteínas intestinales por amortiguador de lisis TNTE (50 mM Tris [pH 7.4], 150 mM NaCl, tritón 0.5%, 1mM EDTA, e inhibidor de proteínas), ultrasonicación y por el kit ReadyPrep 2D Cleanup, siendo posible que se perdiera una cantidad considerable de proteínas por el proceso de extracción y purificación efectuado, aunado a ello, en la investigación de Kongsuwan utilizaron geles preparativos con tiras IPG de 24 cm y un rango de pH concentración final cargada en los geles de Kongsuwan fue de 1 mg de proteínas mientras que en los nuestros fue de 225 µg, permitiendo obtener un mapa proteómico intestinal con mayor número de manchas para Kongsuwan.

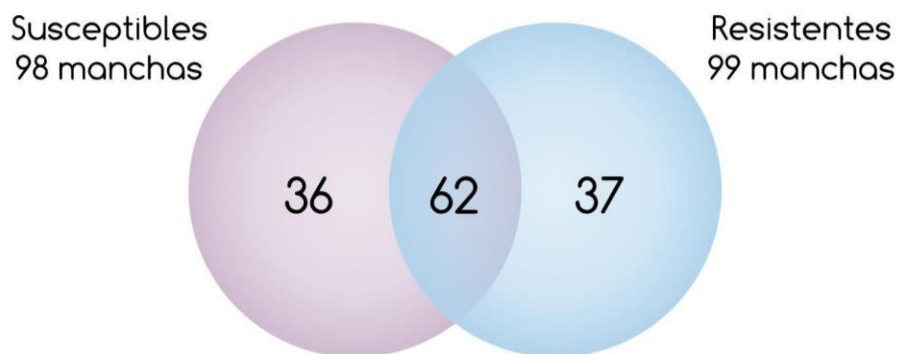


Figura 22. Análisis de la relación entre las proteínas totales identificadas de intestino de *R. microplus* susceptibles y resistentes a IVM a través del Diagrama de Venn, mediante el software Lucichart.

Existe un número limitado de estudios proteómicos enfocados a la resistencia de garrapatas a ixodicidas entre los que se encuentra un reporte de Aguilar *et al.* (2018) donde lograron obtener el mapa proteómico de la hemolinfa de cepas *R. microplus* susceptibles y multirresistentes a ixodicidas (organofosforados, piretroides y amidinas), revelando el análisis comparativo 68 manchas comunes para ambos tratamientos, 26 manchas únicas para las garrapatas susceptibles y cinco manchas para las resistentes; de acuerdo con los resultados de esta investigación la exposición continua de la garrapata a ixodicidas provoca cambios en la expresión de proteínas como se demostró en este trabajo, donde se detectaron 36 manchas exclusivas para el proteoma intestinal de garrapatas *R. microplus* susceptibles a ivermectina, 37 manchas para la cepa presionada con este químico y solamente 62 manchas comunes entre los tratamientos comparados.

Actualmente no se han reportado diferencias en el nivel de expresión de proteínas entre garrapatas susceptibles y resistentes específicamente a ivermectina, no obstante, hay investigaciones similares realizadas en ácaros como el de Shen *et al.* (2017) quienes encontraron diferencias en el nivel de expresión de proteínas entre los proteomas de grupos de *Panonychus citri* expuestos y no expuestos a abamectina; dentro de las proteínas sobreexpresadas en *P. citri* en presencia de la

abamectina, se encuentran la Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), encargada del aumento del metabolismo oxidativo, también presente en *Bactrocera dorsalis* expuesta a piretroides (Jin *et al.*, 2010); las proteínas F0F1-ATP sintasa y V-ATP sintasa cuya función es la síntesis de energía y enzimas detoxificantes; la peroxidasa tiorredoxina (TPx) también reportada en *Plutella xylostella* en respuesta a fipronil, acelerando el proceso de detoxificación y actuando como antioxidante; las carboxilesterasas (CarE), enzimas involucradas en la detoxificación de pesticidas como organofosforados, carbamatos y piretroides en la polilla *P. xylostella*, y proteínas de unión como el homólogo de lambda-cristalina (λ -CRY), ferrina (FER), proteína de choque térmico (sHsp), actina, complejo-T 1 subunidad eta (TCP-1- η), calreticulina (CALR) y el factor de elongación eucariota 2 (eEF2), esta última involucrada en la transcripción de citocromo P450 en *P. citri*; una superfamilia de enzimas responsables de la biotransformación de xenobióticos (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2012); estos resultados reportados por Shen *et al.* (2017), podrían asociarse con las diferencias en la expresión de proteínas entre las garrapatas susceptibles y resistentes a ivermectina obtenidas en este trabajo de investigación debido a la similitud química de la ivermectina con la abamectina por pertenecer a la misma familia de LMs y el nexo taxonómico de *R. microplus* con *P. citri* por tratarse de arácnidos de la subclase Acari.

El único estudio que se ha realizado hasta el momento en intestino medio de garrapatas *R. microplus* orientado específicamente al mecanismo de resistencia a ixodicidas fue realizado por Lara *et al.* (2015), quienes demostraron una sobreexpresión 2.5 veces mayor del gen RmABCB10 que codifica a proteínas transportadoras ABC en los hemosomas de garrapatas *R. microplus* resistentes al amitraz comparado con las garrapatas susceptibles al fármaco, sugiriendo esta vía de detoxificación como un nuevo mecanismo molecular de resistencia a los productos químicos de control; sería importante identificar las proteínas sobreexpresadas en el proteoma intestinal de la cepa resistente a ivermectina visualizadas en esta investigación para definir si también participan los

transportadores ABC en el proceso de detoxificación de ivermectina en la garrapata *R. microplus*.

La revisión bibliográfica nos señala la carencia de estudios proteómicos enfocados al mecanismo de resistencia a ixodicidas en *R. microplus*; no obstante, los datos obtenidos en este trabajo de investigación son una primera aproximación a la identificación de cambios en el nivel de expresión de proteínas intestinales en garrapatas resistentes a IVM. Los resultados comprueban que existe un patrón y nivel de expresión diferente de proteínas intestinales en garrapatas *R. microplus* susceptibles y resistentes a ivermectina; se detectó por el programa PDQuest proteínas que aumentaron o disminuyeron su expresión entre los tratamientos evaluados; lo cual sugiere un mecanismo fisiológico complejo involucrado en la respuesta de *R. microplus* al estrés de la exposición a la ivermectina; sin embargo para validar estos resultados, es necesario realizar nuevos estudios como la identificación de proteínas por espectrometría de masas (MS) o Western Blot, para determinar el papel que juegan en el metabolismo energético, detoxificación y unión a la ivermectina.

El análisis comparativo a través de herramientas proteómicas es fundamental para el reconocimiento de proteínas involucradas en el mecanismo de resistencia a ixodicidas como la ivermectina, para que con futuros estudios se logre elucidar la función de las moléculas diferenciales e identificar biomarcadores que permitan desarrollar nuevos métodos efectivos de control contra la garrapata del ganado bovino. Las perspectivas de este trabajo están enfocadas a determinar la identidad de estas proteínas y su caracterización dentro del mecanismo de resistencia a ivermectina; para proponer un conjunto de biomoléculas que permitan interferir el proceso de resistencia de las garrapatas.

V. LITERATURA CITADA

- Aguilar, H., Esquivel, M., Quiroz, R.E., Miranda, E., Conde, R.J.P., Cobaxín, M., Ostoa, P., Cossío, R. 2018. Comparative hemolymph proteomic and enzymatic analyses of two strains of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks resistant and susceptible to ixodocides. *BioMed Research International*, 1-16.
- Aguilar-Tipacamú, G., Rodríguez-Vias, R.I. 2003. Effect of moxidectin against natural infestation of the cattle tick *Boophilus microplus* (Acarina: Ixodidae) in the Mexican tropics. *Vet. Parasitol.* 111: 211-216.
- 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. Cuernavaca, Morelos, México, 282–306.
- Alonso, D.M.A., Fernández, S.A., Basurto, C.H. 2013. La garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: su comportamiento, control y resistencia a los acaricidas en el trópico mexicano. Manual Técnico. UNAM. Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Ganadería Tropical, Martínez de la Torre, Veracruz, México.
- Alonso-Díaz, M.A., Rodríguez-Vivas, R.I., Fragoso-Sánchez, H., Rosario-Cruz, R., 2006. Ixodicide resistance of the *Boophilus microplus* tick to ixodocides. *Archivos Medicina Veterinaria*, 38(2): 105-113.
- Aubry, P., Geale D.W. 2011. A review of bovine anaplasmosis. *Transbound. Emerg. Dis.*, 5(8): 1-30.
- Barker, S. C., Murrel, A. 2008. Systematic and evolution of ticks with a list of valid genus and species names. *Ticks Biology, Disease and Control*. Cambridge University Press. Reino Unido.
- Bautista-Garfias, C.R., Castañeda-Arriola, R., Álvarez-Martínez, J.A., Rojas-Martínez, C., Figueroa-Millán, J.V., Rodríguez-Lozano, A. 2012. The simultaneous vaccination of bovines with *Lactobacillus casei* and the bivalent vaccine against

bovine babesiosis induces a better protection against *Babesia bovis* and *B. bigemina* transmitted by ticks in extreme field conditions. *Vet Méx*, 43(3):189-200.

Bautista-Garfias, R. 2006. *Entomología Veterinaria Esencial*. INIFAP. Cuernavaca, Morelos, México 24-46.

Bermúdez, S., Miranda, C. 2010. *Entomología médica*, colección zoológica “Dr. Eustorgio méndez” Ing. Gilberto De León (Administración de Sistemas) Instituto conmemorativo Gorgas de estudios de la salud. Disponible en http://www.gorgas.gob.pa/index.php?option=com_content&view=article&id=60&lang=es. Consultado el [3/10/18].

Bowman, A. S., Nutall, P. 2008. *Ticks Biology, Disease and Control*. Cambridge Univerisity Press. Reino Unido.

Camino, L.M. 1981. The development of an integrated pest management system for the cattle tick, *Boophilus microplus* in Morelos state, Mex. *Acarology*, 41:3302-3303.

Campbell, W.C. 1985. Ivermectin: an update. *Parasitol. Today*, 1(1): 10-16.

Campbell, W.C., Fisher, M.H., Stapley, E.O., Albers, G. y Jacob, T.A. 1983. Ivermectin: a potent new antiparasitic agent. *Science*, 221: 823-828.

Canales-García, M. M. (2007). *Desarrollo de vacunas para el control de garrapatas* (Tesis Doctoral). Universidad de Castilla-La Mancha. Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos. España. 36-38.

Carrasco, M.S., Espuny, A., Escudero, E., Cárceles, C.M. 1998. Farmacología de los endectocidas: aplicaciones terapéuticas. *An. Vet. Murcia*, 14: 3-22.

Castelblanco, S.L., Sanabria, R.O.J., Cruz, C.A., Rodríguez, M.C.E. 2013. Reporte preliminar del efecto ixodicida de extractos de algunas plantas sobre garrapatas *Boophilus microplus*. *Rev. Cubana Plant Med.*, 18(1):118-130.

Castro-Janer, E., Rifran, L., González, P., Niell, C., Piaggio, J. 2011. Determination of the susceptibility of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) to

ivermectin and fipronil by Larval Immersion Test (LIT) in Uruguay. *Vet. Parasitol.* 178: 148-155.

Chen, A.C., He, H., Davey, R.B. 2007. Mutations in a putative octopamine receptor gene in amitraz-resistant cattle ticks. *Vet. Parasitol.* 148:379-383

Coles, G.C., Rhodes, A.C., Wolstenholme, A.J. 2005. Rapid selection for ivermectin resistance in *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* 129: 345-347.

Cortés, V.J.A., Bentacour, E.J.A., Arguelles, C.J., Pulido, H.L.A. 2010. Distribución de garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en bovinos y fincas del Altiplano cundiboyacense (Colombia). *Corpoica Cienc. Tecnol. Agropecu.*, 11(1):73-84.

Cully, D.F., Paress, P.S., Liu, K.K., Schaeffer, J.M., Arena, J.P. 1996. Identification of a *Drosophila melanogaster* glutamate-gated chloride channel sensitive to the antiparasitic agent avermectin. *J. Biol. Chem.* 271: 20187-20191.

Cully, D.F., Vassilatis, D.K., Liu, K.K., Paress, P.S., Van der-Ploeg, L.H., Schaeffer, J.M., Arena, J.P. 1994. Cloning of an avermectin-sensitive glutamate-gated chloride channel from *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 371: 707-711.

Currie, B.J., Harumal, P., McKinnon, M., Walton, S.F. 2004. First documentation of in vivo and in vitro ivermectin resistance in *Sarcoptes scabiei*. *Clin. Infect. Dis.*, 39: 8-12.

Dantas, F. 2008. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari Ixodidae): from taxonomy to control. *Vet. Parasitol.*, 152: 173-185.

De Castro, J.J., James, A.D., Minjauw, B., DiGiulio, G., Permin, A., Pegram, R.G., Chizyuka, H.G.B., Sinyangwe, P. 1997. Long-term studies on the economic impact of ticks on Sanga cattle in Zambia. *Exp. Appl. Acarol.*, 21:3-19.

De la Fuente, J., Almazan, C., Canales, M., Pérez de la Lastra, J.M., Kocan, K.M., Willadsen, P. 2007. A ten-year review of commercial vaccine performance for control of tick infestations on cattle. *Animal Health Research Reviews*, 8(1): 23-28.

Dent, J. A., Smith, M.M., Vassilatis, D. K., Avery, L. 2000. The genetics of avermectin resistance in *Caenorhabditis elegans*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 97(6): 2674-2679.

Domínguez, I., Rosario, R., Almazan, C., Saltijeral, A., De la fuente, J. 2010. *Boophilus microplus*: Aspectos biológicos y moleculares de la resistencia a los acaricidas y su impacto en la salud animal. Tropical and Subtropical Agroecosystems, 12: 181-192.

Doreste, E. 1988. Acarología. 2° ed. Costa Rica: IICA. 337-340.

Fernández-Salas, A., Rodríguez-Vivas, R.I., Alonso-Díaz, M.A. 2012. First report of a *Rhipicephalus microplus* tick population multi-resistant to acaricides and ivermectin in the Mexican tropics. Vet Parasitol., 186:338-342.

Engormix. 2016. Cloxantel Plus. Disponible en https://www.engormix.com/agrovet-market-animal-health/cloxantel-plus-closantel-fasciolicida-endectocida-bovinos-sh28_pr10793.htm consultado el [5/09/18].

Fox, L.M. 2006. Ivermectin: uses and impact 20 years on. Curr. Opin. Infect. Dis., 19(6): 588-593.

Fragoso, S.H., Soberanes, C.N. 2001. Control de la resistencia a los ixodícos a la luz de los conocimientos actuales, Memorias de XXV Congreso Nacional de Buiatría. Veracruz, Veracruz, México. Asociación Mexicana de Médicos especialistas en Bovinos. 40-48.

Gállego, J. 2006. Manual de parasitología: Morfología y biología de los parásitos de interés sanitario. 1° ed. España: Publicaciones I Ediciones de la Universidad de Barcelona. 368-369.

Gambetta, D. 2014. Caracterización e identificación de actividad proteolítica en extractos de la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Tesis de Pregrado). Universidad de la República. Uruguay. 16-18.

- García, Z. 2010. Garrapatas que afectan al ganado bovino y enfermedades que transmiten en México. Memorias de 1° Simposium de Salud y Producción de Bovinos de Carne en la Zona Norte-Centro de México. Aguascalientes, México. 22-27.
- 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(1):353–366.
- Guerrero, F.D., Lovis, L., Martins, J.R. 2012. Acaricide resistance mechanisms in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 21(1): 1-6.
- Hagen, S.J., Kopp, A. 1999. Estudios de resistencia a acaricidas en la garrapata bovina *Boophilus microplus* en América Central. Memorias de IV Seminario Internacional de Parasitología Animal. Puerto Vallarta, Jalisco. México, 33-35.
- 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. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 261(3):558–561.
- Hernández, F. 2005. El manejo integrado en el control de garrapatas. Manual de ganadería doble propósito. Venezuela. 17:384 -391.
- Hernández, R., He, H., Chen, A.C., Waghela, S.D., Ivie, G.W, George, J.E., Wagner, G.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(10): 969-977.
- Hibbs, R. E., Gouaux, E. 2011. Principles of activation and permeation in an anion-selective Cys loop receptor. *Nature*, 474(7349): 54–60.
- Horoszok, L., Raymond, V., Sattelle, D. B., Wolstenholme, A. J. 2001. GLC-3: a novel fipronil- and BIDN-sensitive, but picrotoxinin-insensitive, L-glutamate-gated chloride channel subunit from *Caenorhabditis elegans*. *British Journal Pharmacology*, 132(6): 1247–1254

- Jin, T., Zeng, L., Lu, Y., Xu, Y., Liang, G. 2010. Identification of resistance-responsive proteins in larvae of *Bactrocera dorsalis* (Hendel), for pyrethroid toxicity by a proteomic approach. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 96(1): 1-7.
- Jonsson, N. 2006. The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. *Veterinary Parasitology*, 137(1-2): 1-10.
- Jonsson, N.N., Matschoss, A.L., Pepper, P., Green, P.E., Albrecht, M.S., Hungerford, J., Ansell, J. 2000. Evaluation of tick-GARD (PLUS), a novel vaccine against *Boophilus microplus*, in lactating Holstein-Friesian cows. *Veterinary Parasitology*, 88(3-4): 275-285.
- Kaplan, R.M. 2004. Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. *Trends in Parasitology*, 20(10): 477–481.
- Karlin, A. 2002. Emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors. *Nature Rev. Neurosci.*, 3(2): 102–114.
- Kass, I.S., Stretton, A.O.W., Wang, C.C. 1984. The effects of avermectin and drugs related to acetylcholine and 4-aminobutyric acid on neurotransmitters in *Ascaris suum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 13(2): 213–225.
- Klafke, G.M., Sabatini, G., Albuquerque, T., Martins, J.R., Kemp, D., Miller, R.J. 2006. Larval immersion tests with ivermectin populations of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) from State of Sao Paulo, Brazil. *Vet. Parasitol.*, 142(3-4): 386-390.
- Klafke, G.M., Castro-Janer, E., Mendes, M.C., Namindome, A., Schumaker, T.T.S. 2012. Applicability of *in vitro* bioassays for the diagnosis of ivermectin resistance in *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *Vet. Parasitol.* 184(2-4): 212-220.
- Kongsuwan, K., Josh, P., Zhu, Y., Pearson, R., Gough, J., Colgrave, M. 2009. Exploring the midgut proteome of partially fed female cattle tick (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*). *Journal of Insect Physiology*, 56(2): 212-256.

- Kunz, S.E., Kemp, D.H. 1994. Insecticides and acaricides: resistance and environmental impact. *Rev. Sci. Tech.*, 13(4):1249–1286.
- Kwon, D.H., Yoon, K.S., Clark, J.M., Lee, S.H. 2010. A point mutation in a glutamate gated chloride channel confers abamectin resistance in the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch. *Insect. Mol. Biol.*, 19(4), 583–591.
- Lanusse, C., Lifschitz, A., Virkel, G., Alvarez, L., Sánchez, S., Sutra, J.F., Galtier, P., Alvinerie, M. 1997. Comparative plasma disposition kinetics of ivermectin, moxidectin and doramectin in cattle. *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, 20(2): 91-99.
- Lara, F.A., Polh, P.C., Gandara, A.C., Ferreira, J. da S., Nascimento-Silva, M.C., Bechara, G.H., Sorgine, M., Almeida, I.C., Vaz, I. da S., Oliveira, P.L. 2015. ATP Binding Cassete Transporter Mediates Both Heme and Pesticide Detoxification in Tick Midgut Cells. *PLOS ONE*, 10(8): 1.20.
- Laughton, D.L., Lunt, G.G., Wolstenholme, A.J. 1997. Alternative splicing of a *Caenorhabditis elegans* gene produces two novel inhibitory amino acid receptor subunits with identical ligand binding domains but different ion channels. *Gene*, 201(1-2): 119–125.
- Le Gall, V.L., Kafkle, G.M., Torres, T.T. 2018. Detoxification mechanisms involved in ivermectin resistance in the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Scientific reports*, 8(12401): 1-10.
- Lee, D., Park, Y., Brown, M.T., Adams E.M. 1999. Altered properties of neuronal sodium channels associated with genetic resistance to pyrethroids. *Mol. Pharmacol.* 55: 581-593.
- Lee, R.Y.N., Sawin, E.R., Chalfie, M., Horvitz, H.R., Avery, I. 1999. EAT-4, a homolog of a mammalian sodium-dependent inorganic phosphate cotransporter, is necessary for glutamatergic neurotransmission in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Neuroscience*, 19(1): 159–167.

- Lifschitz, A., Virkel, G., Imperiale, F., Pis, A., Lanusse, C. 2002. Fármacos endectocidas: avermectinas y milbemicinas. *Farmacología y Terapéutica Veterinaria*. 1° ed. España: McGraw-Hill-Interamericana. 545-558.
- Martins, J., Furlong, J. 2001. Avermectin resistance of the cattle tick *Boophilus microplus* in Brazil. *Vet. Rec.*, 149(2): 64.
- Martins, R.M. 2006. Estudio in vitro de la acción de acaricida del aceite esencial de la gramínea Citronela de Java (*Cymbopogon winterianus*) en la garrapata *Boophilus microplus*. *Rev. Bras. Pl. Med. Botucatu.*, 8(2):71-78.
- McCavera, S., Rogers, A.T., Yates, D.M., Woods, D.J., Wolstenholme, A.J. 2009. An ivermectin-sensitive glutamate-gated chloride channel from the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. *Mol. Pharmacol.* 75(6): 1347–1355.
- Metcalf, R.L. 1989. Insect resistance to insecticides. *Pesticide Science*, 26(4): 333-358.
- Njue, A. I., Hayashi, J., Kinne, L., Feng, X.P., Prichard, R.K. 2004. Mutations in the extracellular domains of glutamate-gated chloride channel $\alpha 3$ and β subunits from ivermectin-resistant *Cooperia oncophora* affect agonist sensitivity. *Journal of Neurochemistry*, 89(5): 1137–1147.
- Ojeda-Chi, M.M., Rodríguez-Vivas, R.I., Galindo-Velasco, E., Lezama-Gutiérrez, R., Cruz-Vázquez, R. 2011. Control de *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) mediante el uso del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae). *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 2(2): 177-192.
- Ortiz, E.M., Santamaría, V.M., Ortiz, N.A., Soberanes, C.N., Osorio, M.J., Franco, B.R., Martínez, I.F., Quezada, D.R., Fragoso, S.H. 1995. Characterization of *Boophilus microplus* resistance to ixodicides in México. *Memorias Seminario internacional de Parasitología Animal*. Acapulco, México, 58–66.
- Pando-Robles, V., Ferreira-Batista, C. 2007. Proteómica: hacia el entendimiento del lenguaje de las proteínas. *Una ventana al quehacer científico*, 1 (1): 97-108.

Parra, M.H., Pelaéz, S.L., Segura, C.F., Arcos, J.C., Londoño, A., Díaz, E., Venegas, M.A. 1999. Manejo integrado de garrapatas en bovinos. Serie modular para la capacitación en tecnologías agropecuarias, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, 2: 72-77.

Patarroyo, J., Portela, R., De Castro, R., Couto, J., Guzman, F., Patarroyo, R., Vargas, M, Prates, A., Dias, M. 2002. Immunization of cattle with synthetic peptides derived from the *Boophilus microplus* gut protein (Bm86). Veterinary Immunology and Immunopathology, 88(3-4): 163–172.

Pemberton, D. J., Franks, C. J., Walker, R. J., Holdendye, L. 2001. Characterization of glutamate-gated chloride channels in the pharynx of wild-type and mutant *Caenorhabditis elegans* delineates the role of the subunit GluCl-alpha 2 in the function of the native receptor. Molecular Pharmacology, 59(5): 1037–1043.

Pérez de León, A.A., Vannier, E., Almazán, C., Krause, P. 2014. Tick-borne protozoa. Biology of ticks. 2° ed, New York, USA: In: Sonenhine DE, Roe RM editors. 147-179.

Perez-Cogollo, L.C., Rodriguez-Vivas, R.I., Ramirez-Cruz, G.T., Rosado-Aguilar, J.A. 2010. Survey of *Rhipicephalus microplus* resistance to ivermectin at cattle farms with history of macrocyclic lactones use in Yucatan, Mexico. Vet. Parasitol., 172(1-2): 109-113.

Pohl, P.C., Klafke, G.M., Carvalho, D.D., Martins, J.R., Daffre, S., da Silva Vas, I., Masuda, A. 2011. ABC transporter efflux pumps: A defense mechanism against ivermectin in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Int. J. Parasitol., 41(13-14): 1323–1333.

Powell, R.T., Reid, T.J. 1982. Project tick control. Queensland Agricultural Journal, 12 (6): 279-300.

- 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 Economic Entomology*, 95(5):1001-1007.
- Pulido, S.N.J., Cruz. C.A. 2013. Eficacia de los extractos hidroalcohólicos de dos plantas sobre garrapatas adultas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Corpoica Cienc. Tecnol. Agropecu.*, 14(1):91-97.
- Quiroz, R.H. 2005. *Parasitología y Enfermedades Parasitarias de Animales Domésticos*. 1° ed. México: Editorial Limusa. 796-802.
- Rachinsky, A., Guerrero, F.D., Scoles, G.A. 2017a. Differential protein expression in ovaries of uninfected and *Babesia*-infected southern cattle ticks, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 37: 1291-1308.
- Rachinsky, A., Guerrero, F.D., Scoles, G.A. 2017b. Proteomic profiling of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* midgut responses to infection with *Babesia bovis*. *Vet. Parasitol.*, (152): 294-313.
- Ramos, A.J.A., García, V.Z.S. 2009. Estrategia para el control de la garrapata *Boophilus microplus* y la mitigación de la resistencia a los pesticidas. Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria. Jiutepec, Morelos, México. Folleto Técnico Núm. 6. 1-26.
- Raymond, V., Sattelle, D. 2002. Novel animal-health drug targets from ligand-gated chloride channels. *Nature Reviews Drug Discovery*, 1(6): 427-436.
- Rodríguez, C., Encinas, T., de Vicente, M. L. 2002. Lactonas macrocíclicas en medicina veterinaria. Disponible en <https://botplusweb.portalfarma.com/documentos/panorama%20documentos%20multimedia/Pam252%20VETERINARIA%20LACTONAS%20MACROCICLICAS.pdf> consultado el [6/11/18]

Rodríguez-Vivas, R.I., Quiñones, A.F., Fragoso, S.H. 2005. Epidemiología y control de la garrapata *Boophilus* en México. En: Enfermedades de importancia económica en producción animal. 1° ed. México: McGraw-Hill-UADY. 571-592.

Rodríguez-Vivas, R.I., Arieta, R.R. J., Pérez, C.L.C., Rosado, A.J.A., Ramírez, C.G.T. y Basto E.G. 2010. Uso de lactonas macrocíclicas para el control de la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en el ganado bovino. Arch. Med Vet., 42(3):115-123.

Rodríguez-Vivas, R.I., Rosado, A.J.A., Rosario, C.R., García, V.Z., Alonso, D.M.A. 2008. Situación actual de la resistencia a los ixodicidas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en el sureste de México: diagnóstico, epidemiología y control. Memorias VI Seminario Internacional de Parasitología Animal. Veracruz, México. 1-20.

Rodríguez-Vivas, R.I., Laerte, G., Pérez, A.A., Silva-Villela, H., Torres-Acosta, J.F.J., Fragoso-Sánchez, H., Romero-Salas, D., Rosario-Cruz, R., Saldiema, F., García-Carrasco, D. 2017. Potential economic impact assessment for cattle parasites in México. Review. Revista Mexicana de Ciencia Pecuaria, 8(1): 61-74.

Rodríguez-Vivas, R.I., Rivas, A.L., Chowell, G. Fragoso, S.H. Rosario, C.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. Vet. Parasitol., 146(1-2): 158-169.

Rodríguez-Vivas, R.I., Pérez-Cogollo, L.C., Rosado-Aguilar, J.A., Ojeda-Chi, M.M., Trinidad-Martínez, I., Miller, R.J., Li, A.Y., Pérez de Leon, A.A., Guerrero, F.D., Klafke, G.M. 2014a. *Rhipicephalus microplus* resistant to acaricides and ivermectin in cattle farms of Mexico. Braz. J. Vet. Parasitol., 23(2):113–122.

Rodríguez-Vivas, R.I., Rosado-Aguilar, J.A., Ojeda-Chi, M.M., Pérez-Cogollo, L.C., Trinidad-Martínez, I., Bolio-González, M.E. 2014b. Control integrado de garrapatas en la ganadería bovina. Ecosistemas y Recursos Agropecuarios., 1(3): 295-308.

Rosario, C.R., Hernández, O.R. 2001. Evolución química de la resistencia a acaricidas. Memorias del Curso-Taller, diagnóstico de resistencia a ixodidas en garrapatas *Boophilus microplus*. Jiutepec, Morelos, México. 23-30.

Rosario-Cruz, R., Guerrero, F.D., Miller, R.J., Rodriguez-Vivas, R.I., Dominguez-Garcia, D.I., Cornel, A.J., Hernández-Ortiz, R., George, E.J. 2005. Roles played by esterase activity and by a sodium channel mutation involved in pyrethroid resistance in populations of *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acari: Ixodidae) collected from Yucatan, Mexico. J. Med. Entomol., 42(6):1020–1025.

Salazar-Benjumea, R.S. 2015. Variación de la población de garrapatas *Rhipicephalus microplus* sobre bovinos pastoreando en sistemas silvopastoriles y monocultivos tradicionales (Tesis de Maestría). Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia. 20-22.

SENASICA. (2019). Situación actual del control de la garrapata *Boophilus spp.* México: Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Disponible en <https://www.gob.mx/senasica/documentos/situacion-actual-del-control-de-la-garrapata-boophilus-spp> consultado el [2/2/18].

Shen, X., Zhong, R., Xia, W., Wei, D., Ding, T., Liao, C., Niu, J., Dou, W; and Wang, J. 2017. Identification of responsive proteins in *Panonychus citri* exposed to abamectin by a proteomic approach. Journal of proteomics, 158: 9-19.

Soberanes, C.N., Santamaría, V.M., Fragoso, S.H., García, V.Z., 2002. Primer caso de resistencia al amitraz en la garrapata del ganado *Boophilus microplus* en México. Técnica Pecuaria en México, 40(1):81–92.

Sumano, H., Ocampo, L. 2006. Farmacología Veterinaria. 2° ed. México: McGraw-Hill Interamericana. 472 – 475.

Sutherst, R.W., Maywald, G.F., Kerr, J.D., Siegeman, D.A. 1983. The effect of the cattle tick *Boophilus microplus* on the growth of *Bos indicus* x *Bos taurus* steers. Aust. J. Agr. Res., 34(3):317-27.

- Taylor, M.A. 2001. Recent developments in ectoparasiticides. *Vet. J.* 161(3):253–268.
- Temeyer, K.B., Pruett, J.H., Olafson, P.U., Chen, A.C. 2007. R86Q, a mutation in BmAChE3 yielding a *Rhipicephalus microplus* organophosphate in sensitive acetylcholinesterase. *J. Med. Entomol.* 44(6):1013–1018.
- Tene, B.M. 2002. Efecto de *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) en el control biológico de *Boophilus microplus Canestrini* (Acari: Ixodidae) en ganado bovino estabulado (Tesis de Maestría). Universidad de Colima, Colima, México. 26-28.
- Tilman, D. 2000. Causes, consequences and ethics of biodiversity. *Nature*, 405 (6783): 208-211.
- Tirtoni, L., Reck, J., Soares, R., Martins, R., Mulenga, A., Sherman, N., Fox, Jay, Yates, J., Termignoni, C., Pinto, A., da Silva, I. 2014. Proteomic analysis of cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* saliva: a comparison between partially and fully engorged females. *PLoS ONE*, 9(4):1-20.
- Townson, S., Tagboto, S.K., Castro, J., Lujan, A., Awadzi, K., Titanji, V.P. 1994. Comparison of the sensitivity of different geographical races of *Onchocerca volvulus* microfilariae to ivermectin: studies in vitro. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 88, 101–106.
- Utech KB, Wharton RH, Kerr JD (1978) Resistance to *Boophilus microplus (Canestrini)* in different breeds of cattle. *Australian Journal of Veterinary Research*, 21: 163-81.
- Vassilatis, D.K., Arena, J.P., Plasterk, R.H., Wilkinson, H.A., Schaeffer, J.M., Cully, D.F., Van der-Ploeg, L.H. 1997. Genetic and biochemical evidence for a novel avermectin-sensitive chloride channel in *Caenorhabditis elegans* Isolation and characterization. *J. Biol. Chem.*, 272(52): 33167–33174.

Willadsen, P. 1997. Novel vaccines for ectoparasites. *Vet. Parasitol.*, 71(2-3): 209-222.

Wolstenholme, A. (2012). Glutamate-gated Chloride Channels. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(48): 40232-40238.

VI. APÉNDICE

Anexo 1. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE BRADFORD.

Preparar las siguientes soluciones:

Solución Stock: pesar 0.01 g de albúmina sérica bovina y disolver en 1 ml de H₂O destilada.

Solución reactivo Bradford relación: mezclar 2 ml de reactivo Bradford (No. Cat. 5000205. BIO-RAD, USA) en 8 ml de agua grado proteómico (No. Cat. 1632091. BIO-RAD, USA).

Preparar las siguientes diluciones de albúmina sérica bovina en un volumen final de 50 ml para curva estándar de cuantificación ($R^2 \geq 0.98$):

$$\text{Fórmula: } C_1V_1=C_2V_2$$

| Dilución | Cálculo | Vol. Sol. Stock | Vol. H ₂ O destilada | Volumen total |
|----------|---|-----------------|---------------------------------|---------------|
| 2 mg | $\frac{2 \frac{mg}{ml} \times 50 \mu l}{10 mg/ml}$ | 10 μ l | 40 μ l | 50 μ l |
| 1.75 mg | $\frac{1.75 \frac{mg}{ml} \times 50 \mu l}{10 mg/ml}$ | 8.75 μ l | 41.25 μ l | 50 μ l |
| 1.5 mg | $\frac{1.5 \frac{mg}{ml} \times 50 \mu l}{10 mg/ml}$ | 7.5 μ l | 42.5 μ l | 50 μ l |
| 1.25 mg | $\frac{1.25 \frac{mg}{ml} \times 50 \mu l}{10 mg/ml}$ | 6.25 μ l | 43.75 μ l | 50 μ l |
| 1 mg | $\frac{1 \frac{mg}{ml} \times 50 \mu l}{10 mg/ml}$ | 5 μ l | 45 μ l | 50 μ l |
| 0.75 mg | $\frac{0.75 \frac{mg}{ml} \times 50 \mu l}{10 mg/ml}$ | 3.75 μ l | 46.25 μ l | 50 μ l |

Preparar nuevas diluciones (1:10), tomar de cada dilución 10 μ l y agregar 90 μ l de H₂O destilada para obtener un volumen final de 100 μ l.

Tomar 10 µl de cada una de las diluciones finales para cada pozo en triplicado para la microplaca y añadir 240 µl de reactivo de Bradford para un volumen final de 250 µl.

Posteriormente colocar 2 µl de muestras intestinales purificadas en los pozos por triplicado y añadir reactivo de Bradford para un volumen final de 250 µl.

Leer microplaca en el espectrofotómetro a 595 nm.

Resultados de concentración de proteína por muestra mostrados en mg/ml.

Anexo 2. PREPARACIÓN DE MUESTRAS INTESTINALES A UNA CONCENTRACIÓN DE 225 µg DE PROTEÍNAS PARA GELES 2DE.

Ejemplo:

Una vez conocida la concentración de proteínas en mg/ml para una muestra por el método de Bradford, calcular la concentración en µg/µl.

[] Ensayo 1 cepa susceptible: 2.338 mg/ml

1 mg – 1000 µg

1 ml – 1000 µl

2.338 mg – 2338 µg

1000 µl – 2338 µg

1 µl – X

X = 2. 338 µg/µl

Calcular el volumen de muestra para obtener 225 µg de proteína:

2.338 µg – 1 µl

225 µg – X

X = 96.23 µl

Disolver los 225 µg de proteína en un volumen total de 130 µl con amortiguador de hidratación para electroforesis 2D para hidratar tiras IPG.

$$X \mu\text{l de muestra biológica} + X \mu\text{l amortiguador de hidratación} + 5 \mu\text{l anfolinas} + 5 \mu\text{l azul de bromofenol} = 130 \mu\text{l}$$

Despejar fórmula para conocer el volumen necesario de buffer de hidratación.

Ejemplo:

Vol. Ensayo 1 cepa susceptible: 96.23 µl

$X \mu\text{l amortiguador de hidratación} = 130 \mu\text{l} - 96.23 \mu\text{l muestra} - 5 \mu\text{l anfolinas} - 5 \mu\text{l azul de bromofenol}$

$X = 53.77 \mu\text{l amortiguador de hidratación}$