



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales

Análisis de mutaciones en la secuencia del canal de cloro dependiente de glutamato (GluCl) y su relación con diferentes grados de resistencia a ivermectina en *Rhipicephalus microplus*.

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Licenciado en Microbiología

Presenta:

Miguel Andrés Velasco Elizondo

Dirigido por:

Dra. Angelina Rodríguez Torres

Dra. Angelina Rodríguez Torres

Presidente






Dra. Gabriela Aguilar Tipacamú

Secretario

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito

Vocal



Dr. Carlos Saldaña Gutiérrez

Vocal

Dra. María C. Ávila Arcos

Vocal



Centro Universitario
Querétaro, Qro.
23 de octubre 2020
México



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales



Análisis de mutaciones en la secuencia del canal de cloro dependiente de glutamato (GluCl) y su relación con diferentes grados de resistencia a ivermectina en *Rhipicephalus microplus*.

Tesis Individual

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Licenciado en Microbiología

Presenta:

Miguel Andrés Velasco Elizondo

Dirigido por:

Dra. Angelina Rodríguez Torres

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Índice

Contenido

Índice	3
Índice de figuras	5
Índice de tablas.....	5
Apéndice con abreviaturas.....	6
Resumen	7
1. Introducción	8
1.1 <i>Rhipicephalus microplus</i>	8
1.2 Ciclo de vida de <i>R. microplus</i>	8
1.3 Importancia económica y epidemiológica de <i>R. microplus</i>	9
1.4 Tratamientos químicos como medio de control de las poblaciones de garrapatas.....	10
1.4.1 Lactonas macrocíclicas y la ivermectina	12
1.5 Canal de Cloro dependiente de glutamato.....	13
1.6 Resistencia a los acaricidas	16
1.6.1 Resistencia a ivermectina.....	18
2. Justificación	19
3. Hipótesis.....	20
4. Objetivo general.....	20
4.1 Objetivos particulares.....	20
5. Metodología	20
5.1 Consideraciones Bioéticas	20
5.1.1 Obtención de muestras biológicas	20
5.1.2 Manejo, almacenamiento y disposición final de residuos peligrosos biológicos infecciosos	20
5.2 Extracción de RNA	21
5.2.1 Gel de agarosa y electroforesis.....	21
5.3 RT-PCR.....	21
5.3.2 Retrotranscripción del ARN mensajero	22
5.3.3 Diseño de los cebadores.....	22
5.3.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	22
5.3.1 Purificación de productos de PCR.....	22
5.3.2 Secuenciación	23
5.4 Análisis Bioinformático y Estadístico	23

6 Resultados.....	23
6.1 Determinación del índice de resistencia con el bioensayo de inmersión de larvas.....	23
6.2 Extracción de ácidos nucleicos.....	24
6.2 Estandarización de la amplificación de la región del gen <i>glucl</i> que codifica para la región intramembranal de la proteína GluCl por tiempo real.....	25
6.3 Amplificación y purificación del gen GluCl	26
6.4 Revisión y análisis bioinformáticos de los productos de secuenciación	28
6.5 Traducción <i>insilico</i> y análisis bioinformático de las secuencias del fragmento de 870 pb. ...	29
7 Discusión	33
8 Conclusión.....	35
Bibliografía.....	36

Dirección General de Bibliotecas UAO

Índice de figuras

1. **Figura 1:** Ciclo de vida de un solo hospedero de la garrapata *R. microplus*.
2. **Figura 2:** Distribución de la garrapata *R. microplus* en el territorio mexicano, reportado por SENASICA en 2020.
3. **Figura 3:** Imagen de una garrapata hembra alimentándose y en cópula con el macho.
4. **Figura 4:** Estructura química de la ivermectina.
5. **Figura 5:** Sitio de unión de la ivermectina al canal GluCl e interacciones atómicas.
6. **Figura 6:** Estructura cristalográfica del canal GluCl unido a su ligando glutamato y a su modificador alostérico ivermectina.
7. **Figura 7:** Neurotransmisión inhibitoria rápida.
8. **Figura 8:** Cambio de conformación global del receptor por la unión de la ivermectina .
9. **Figura 9:** Electroforesis de ARN de garrapatas susceptibles y resistentes .
10. **Figura 10:** Representación del diseño de los cebadores.
11. **Figura 11:** Estandarización de la amplificación del fragmento de 870pb del gen *glucl- α* .
12. **Figura 12:** Amplificación del fragmento 870pb.
13. **Figura 13:** Graficas del análisis bioinformático de las secuencias de nucleótidos.
14. **Figura 14:** Graficas del análisis bioinformático de las secuencias de aminoácidos.

Índice de tablas

1. **Tabla 1:** Nombre de los acaricidas utilizados y su diana farmacológica de acción.
2. **Tabla 2:** Descripción de los bioensayos, sus características y las ecuaciones para calcular los porcentajes de resistencia
3. **Tabla 3:** Reportes de casos resistentes a ivermectina con lugar, método de evaluación y el valor del grado de resistencia en américa latina y principalmente México.
4. **Tabla 4:** Tabla de organismos donde se han encontrado sustituciones de aminoácidos en el canal GluCl y asociado estas a la resistencia a ivermectina.
5. **Tabla 5:** Muestras de ARN de garrapatas resistentes y susceptibles.
6. **Tabla 6:** Muestras de ADN del fragmento 870 purificadas
7. **Tabla 7:** Tabla de contingencia de la prueba Fisher secuencias nucleótidos
8. **Tabla 8:** Tabla de contingencia de la prueba Fisher secuencias aminoácidos

Apéndice con abreviaturas

GluCl: Canal de cloro dependiente de glutamato.

RE: Reproducción estimada

ARN: Ácido ribonucleico.

ADN: Ácido desoxirribonucleico

dNTPs: Nucleósido trifosfato

DTT : Ditioneitol

TM : temperatura de hibridación de los cebadores

ATP : Adenosín trifosfato

ABC: transportadores Atp-Binding Cassette

MT(1,2,3,4): cruces transmembranales de la proteína en membrana

IVM : Ivermectina

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Resumen

El Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) reportó en el 2020, dentro de la campaña nacional para el control de la garrapata que el 65% del territorio nacional está infestado con *Rhipicephalus microplus*. Esta garrapata es parasito de un solo huésped, preferencialmente bovinos, aunque podemos encontrarla en otros animales ungulados. Causa daño en pieles y disminuye la producción de leche y carne, lo que lo hace uno de los ectoparásitos hematófagos más importantes en la ganadería bovina. Hasta el momento, las formas más eficientes para controlar a la garrapata son la quema de pastizales y el uso de químicos que alteran el sistema nervioso del parasito. Una de estos compuestos neurotóxicos son las ivermectinas, que pertenecen al grupo de las lactonas macrocíclicas y alteran el potencial de membrana, modificando permanentemente el canal de cloro dependiente de glutamato (GluCl) causando una parálisis y la muerte. El canal GluCl solo está presente en invertebrados por lo cual la ivermectina ha sido muy exitosa comercialmente, ya que no tiene efectos secundarios indeseables en el humano o los bovinos. Después de más de 10 años de uso en Latinoamérica se han encontrado garrapatas resistentes a la ivermectina en Brasil y México. Hasta la fecha no se han confirmado las razones moleculares a nivel genético del desarrollo de esta resistencia. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo, es analizar secuencias que codifican para el GluCl en garrapatas susceptibles y con distinto grado de resistencia a ivermectina, buscando mutaciones que pudieran ser los causantes de la desensibilización del canal ante la ivermectina.

Palabras clave: ivermectina, resistencia, *Rhipicephalus microplus*, RNA, Canal de cloro, mutaciones.

1. Introducción

1.1 *Rhipicephalus microplus*

R. microplus es una garrapata de la familia Ixodidae, denominadas garrapatas duras porque poseen una lámina dorsal dura. Es un ectoparásito obligado que debe alimentarse de fluidos tisulares sanguíneos para desarrollarse durante todo sus estadios lo cual le permite entrar a la clasificación de artrópodos hemimetábolos (*Biology of Ticks Volume 1*, 2013). Sus estadios de desarrollo son: huevo, larva de seis patas, ninfa de ocho patas, adultos machos y hembras de ocho patas. *R. microplus* se encuentra en la clasificación de garrapatas con un solo hospedero durante todo su ciclo (*Biology of Ticks Volume 1*, 2013). La forma de alimentación comienza cuando la garrapata se fija en un hospedero cortando su piel con sus estructuras bucales llamadas quelíceros y se ancla a la piel con el órgano llamado hipostoma.

1.2 Ciclo de vida de *R. microplus*.

Las hembras apareadas e ingurgitadas son aquellas que descienden del hospedero y comienzan a ovopositar. Los huevos tienen un tiempo de incubación promedio de 15 días, posteriormente eclosionan y las larvas resultantes esperan en el suelo o en el pasto a un hospedador hasta 90 días. Como se observa en la Figura 1 cuando una larva logra subir a un hospedero comienza la fase parasitaria alimentándose de sangre por 8 días antes de mudar a ninfa (Boulanger et al., 2019).

La alimentación de la ninfa dura 4 días al concluir muda en adultos machos o hembras. Al terminar la copulación los machos mueren y las hembras continúan a alimentarse y 5 días después se encuentran repletas, un estadio denominado así por el gran tamaño que adquiere la garrapata, y se encuentran listas para descender del animal. El periodo de ovoposición dura entre 10 a 15 días y al finalizar este las hembras mueren (Boulanger et al., 2019).

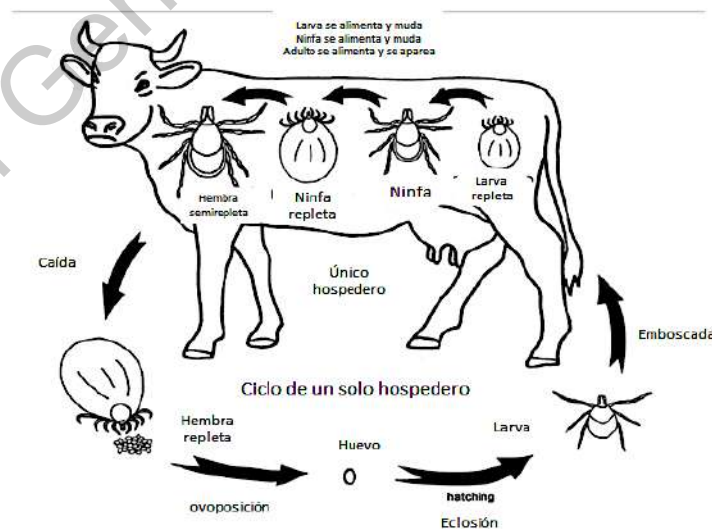


Figura 1: Ciclo de vida de un solo hospedero de la garrapata *R. microplus*. Imagen modificada de *Biology of ticks (Biology of Ticks Volume 1*, 2013). Donde se observa el ciclo completo de *R. microplus*, los estadios de larva, ninfa, adulto y hembra ovopositando.

R. microplus sólo ocupa a un hospedero para completar su ciclo de vida y se puede encontrar fijadas en ovinos, caprinos y equinos (Encinas et al., 1999). Durante su periodo de alimentación *R. microplus* puede transmitir varias bacterias patógenas como *Anaplasma marginale* (Miranpuri, 1988; Ybañez et al., 2013) y *Anaplasma centrale* (Ehounoud et al., 2016), las cuales son agentes etiológicos de la anaplasmosis bovina. Además varios protozoarios de importancia veterinaria como: *Babesia bigemina* (Büscher, 1988; Guerrero et al., 2007) y *Babesia bovis* (Guerrero et al., 2007; Mbatl et al., 2002) son transmitidos al ganado vacuno por la garrapata.

1.3 Importancia económica y epidemiológica de *R. microplus*

Se han encontrado por PCR tiempo real en ADN extraído de garrapatas *R. microplus* las siguientes bacterias: *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia theileri* los causantes de la enfermedad de Lyme (Burgess et al., 1993) y los agentes etimológicos de la erliquiosis bovina que son *Ehrlichia minasensis* y *Ehrlichia ruminantium* (Ehounoud et al., 2016; Ghafar et al., 2020). La sola presencia y fijación al ganado de *R. microplus* es un factor de riesgo para que los bovinos puedan contraer las enfermedades transmitidas por esta garrapata, al tener estas, se observa una alta prevalencia de infecciones por los patógenos anteriormente mencionados (Ghafar et al., 2020; Solorio-Rivera and Rodríguez-Vivas, 1997)

La campaña nacional para el control de la garrapata reportó en el 2020 que el 65% del territorio nacional está infestado con *R. microplus*, En la Figura 2 se observa el estatus zoosanitario reportado en el 2020 por SENASICA. Donde la superficie libre de garrapatas es de 599,367.86 km² equivalente al 30.60% del territorio nacional. La zona en erradicación consta de 67,472.76 km², el 3.44% y la zona denominada control es de 1, 292, 407,02 km² el 65% del territorio nacional. Los primeros reportes de la presencia del ectoparásito *R. microplus* datan de 1986 en el sureste del país. Los estados de Sonora, Tlaxcala, Aguascalientes, Baja California y Chihuahua se consideran libres de la garrapata. En contraparte, reportan en Yucatán, Solorio-Rivera y Rodríguez-Vivas en 1997 que cada bovino está infestado por aproximadamente 70 garrapatas adultas. Cada garrapata sustrae entre uno a tres mililitros de sangre durante todo su ciclo de vida. Por esta razón en regiones donde se encuentra la presencia de *R. microplus* se presentan disminuciones en la producción de leche, pérdida de peso del ganado, daño en las pieles y la transmisión de enfermedades. Es por ello que el impacto económico anual se estima en 573.61 millones de dólares en México (Rodríguez-Vivas et al., 2017). Por lo tanto el control de la garrapata *R. microplus* es prioridad en la ganadería bovina.

Para controlar estas enfermedades y los efectos en el ganado por la fijación de esta garrapata, se buscan técnicas que limiten la presencia de la garrapata. Las estrategias utilizadas son la rotación de potreros, uso de químicos como los piretroides y la generación de vacunas (Rodríguez-Vivas et al., 2018). Por lo tanto, gran parte de pérdidas económicas de este sector agroindustrial, son generadas por *R. microplus*, asociado al costo de las prácticas de control para reducir las infestaciones en los bovinos, basadas, principalmente, en la aplicación de compuestos químicos de alto costo monetario. (de Castro, 1997; Porto Neto et al., 2011)



Figura 2: Reporte de la distribución de la garrapata *R. microplus* en el territorio mexicano por SENASICA en 2020. Se observa el estatus zoonosanitario reportado en el 2020. Donde la superficie libre de garrapatas es de 599,367.86 km² equivalente al 30.60% del territorio nacional. La zona en erradicación consta de 67,472.76 km², el 3.44% y la zona denominada control es de 1, 292, 407,02 km² el 65% del territorio nacional.

1.4 Tratamientos químicos como medio de control de las poblaciones de garrapatas

Los químicos utilizados en el tratamiento de garrapatas actúan de dos formas, la primera es de forma sistémica cuando es consumido desde los tejidos del ganado por la garrapata. La segunda es por contacto directo del químico con el parásito usando aplicaciones externas (Róger Iván Rodríguez-Vivas et al., 2014). Los compuestos químicos más utilizados están enlistados en la Tabla 1 y son las formamidinas, los piretroides, las lactonas macrocíclicas, los organoclorados, los organofosforados y los fenilpirazoles (Taylor, 2001). A todos los anteriores se les conoce como acaricidas por su actividad en contra de las garrapatas y la mayoría de los acaricidas son considerados neurotóxicos dado que su efecto es en el sistema nervioso, cada uno con una diana farmacológica distinta. Como se muestra en la Figura 3 las garrapatas tienen como sistema nervioso central a una agrupación de nervios fusionados denominada singanglion. De esta masa de células salen los nervios periféricos y de estos emergen ganglios que inervan a los músculos, a las estructuras sensoriales, a los apéndices, al tegumento, a los órganos internos y a las glándulas salivales (Lees and Bowman, 2007).

Los acaricidas como los piretroides afectan a los nervios periféricos al impedir el estado abierto del canal de sodio dependiente de voltaje (Chrutek et al., 2018). Los organofosforados inactivan a la enzima acetilcolinesterasa, lo cual incrementa la concentración de acetilcolina en la membrana post-sináptica causando parálisis muscular (George et al., 2004). Las avermectinas potencializan los efectos del glutamato en el canal de cloruro dependiente de glutamato bloqueando la transmisión de actividad eléctrica en las neuronas y músculos en invertebrados (Wolstenholme and Rogers, 2005), paralizando a la garrapata y desprendiéndola del bovino sin que pueda terminar su ciclo de reproducción. Las vías de administración más comúnmente usadas para los tratamientos

químicos, que controlan y eliminan a las poblaciones de *R. microplus*, son baños de inmersión, aspersión, inyecciones subcutáneas y aplicación tópica.

Tabla 1: Nombre de los acaricidas utilizados y su diana farmacológica de acción

Grupo químico	Nombre del compuesto	Tejido afectado	Sitio de acción
Avermectinas	Ivermectina	Singanglion	Canal de Cl- dependiente de glutamato
Piretroides	Permetrina	Singanglion	Canal de Na+ voltaje dependiente
Formaminidas	Amitraz	Singanglion	Receptor de Octopamidas
Organofosforados	Cumafós	Singanglion	Acetilchilaesterasa
Fenilpirazoles	Fipronil	Singanglion	Receptor GABA
Benzoilfenil urea	Fluazuron	Cuticula	Formación de quitina

Tabla de los acaricidas utilizamos para el control de la garrapata con su grupo químico, nombre del compuesto comercial, el tejido afectado y su sitio de acción o diana farmacológica.

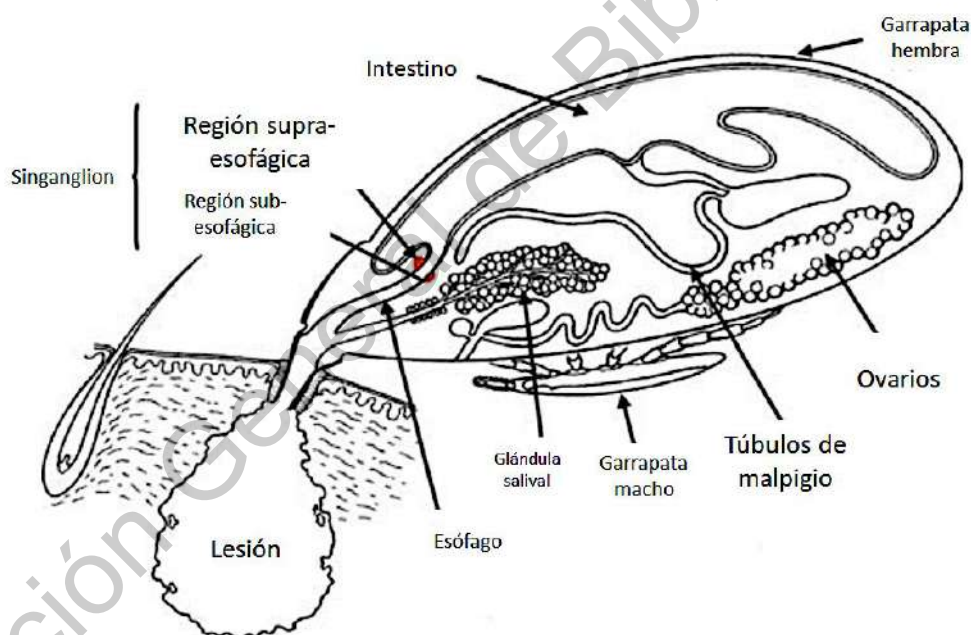


Figura 3: Imagen de una garrapata hembra alimentándose y en cópula con el macho. Se muestra la localización de los órganos internos y se resalta en color rojo el singanglion. Tomada y modificada de (Lees and Bowman, 2007).

1.4.1 Lactonas macrocíclicas y la ivermectina

En el grupo de las lactonas macrocíclicas los acaricidas más efectivos son las avermectinas, ivermectinas y milbemicinas. Son exitosas por su fácil absorción en la piel de los mamíferos, independiente de la vía de administración, gracias a su liposubilidad, almacenándose en tejidos principalmente en grasa y piel del ganado vacuno. Esto protege al ganado por más tiempo en comparación de otros acaricidas porque la Ivermectina (IVM) se encuentra por mayor tiempo viable en los animales (González Canga et al., 2008).

La ivermectina (IVM) es la lactona macrocíclica con mayor difusión en el mercado y es utilizada en muchas especies animales desde su descubrimiento en 1979. Es un fármaco proveniente de la fermentación de *Streptomyces avermitilis* y es un derivado de la avermectina B. En la Figura 4 se observa la composición química de la ivermectina, la cual está conformada en un 80% 22,23-dihydro-avermectinB1 y 20% 22,23-dihydro-avermectinB1b (Campbell, 1981). La estructura molecular consta de un grupo hexahidrobencofurano, un grupo disacárido (en C-13) y un anillo espirocetal (C-17 a C-28), lo cual le confiere una alta liposolubilidad y baja hidrosolubilidad.

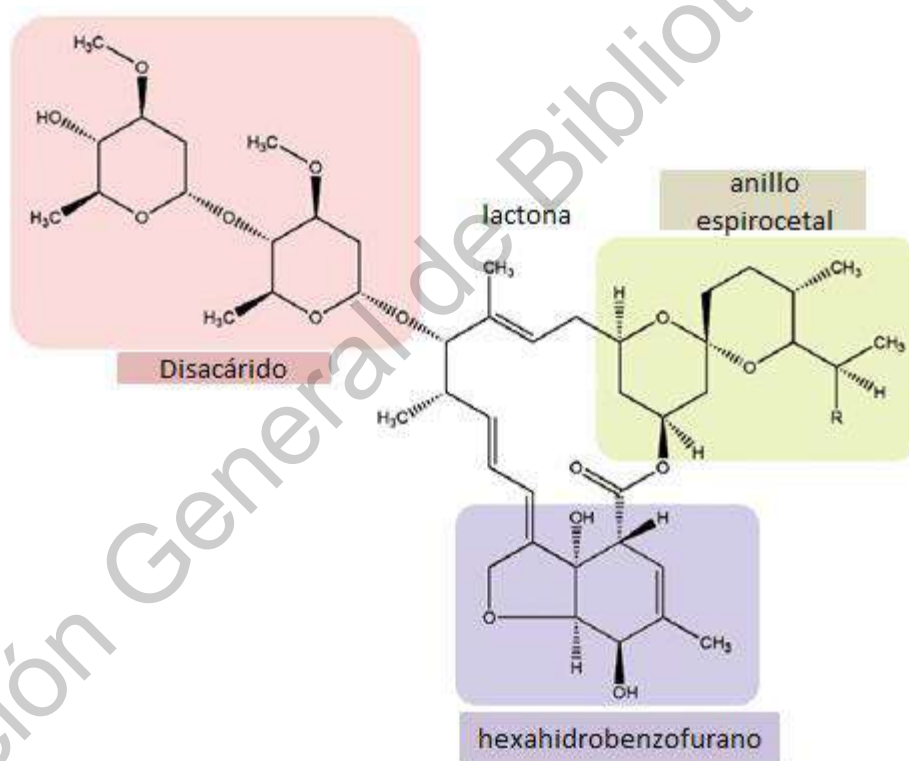


Figura 4: Estructura química de la ivermectina :Imagen modificada de (Chen and Kubo, 2018). Se observa la composición química de la ivermectina, la cual está conformada en un 80% 22,23-dihydro-avermectinB1 y 20% 22,23-dihydro-avermectinB1b (Campbell, 1981).

La diana molecular de la ivermectina se encuentra principalmente en las neuronas postsinapticas y en las sinapsis neuromusculares. Aunque se han encontrado expresión de *glucl* en células reproductivas (Li et al., 2014) El canal de cloro dependiente de glutamato tiene una alta afinidad a la ivermectina (Laing et al., 2017). En la Figura 5 tenemos la representación de solo dos subunidades adyacentes del canal GluCl. Se observan desde abajo (dominio intracelular) y la

subunidad positiva se representa en color verde y la subunidad negativa en color rojo. Los cruces transmembranales se abrevian de la siguiente manera M1, M2, M3 y M4 (Hibbs and Gouaux, 2011). El sitio de unión de la IVM está entre las dos subunidades adyacentes del canal, alrededor de los cruces transmembranales M1 y M3. Se posiciona entre la alfa hélice del cruce transmembranal 3 (M3) de la subunidad principal (+) y en la alfa hélice del cruce transmembranal 1 (M1) de la subunidad complementaria (-). La IVM se posiciona dentro de la interfaz de estas subunidades e interacciona físicamente con el cruce transmembranal 2 (M2), la cual conforma el poro del canal. La unión se logra gracias a interacciones hidrofóbicas y por la formación de enlaces de hidrógeno con los 3 pases transmembranales en los que se ancla a los residuos, tirosina 285 del M3, leucina 218 del M1 y serina 260 del M2. De igual manera, un residuo de glicina en la posición 281 del M3 es esencial para la selectividad a IVM (Althoff et al., 2014; Hibbs and Gouaux, 2011). La ivermectina puede interactuar además con un gran espectro de canales dependientes de ligando como son los receptores GABA, glicina e histamina presentes en vertebrados pero requiere altas concentraciones a diferencia de GluCl (Wolstenholme and Rogers, 2005).

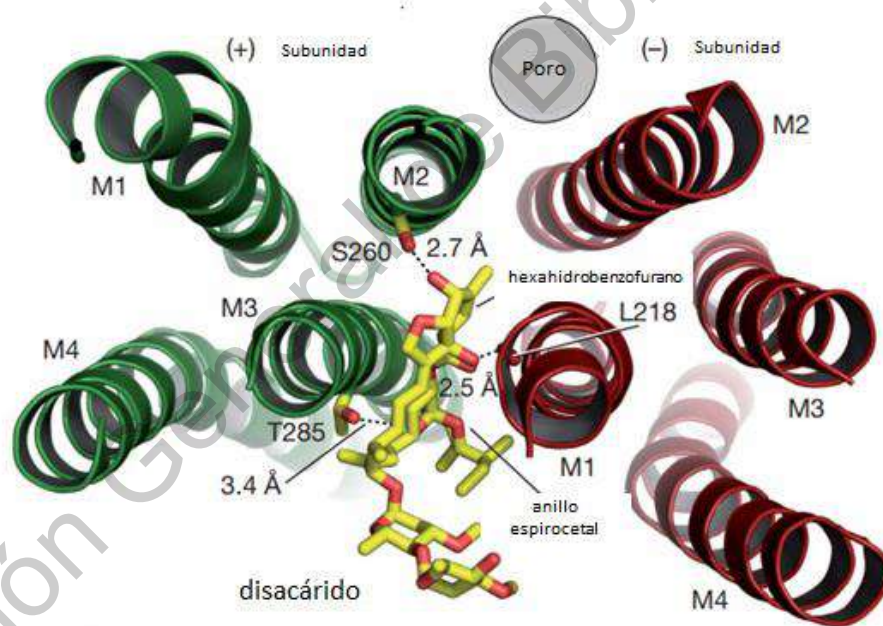


Figura 5: Sitio de unión de la ivermectina al canal GluCl e interacciones atómicas. Representación de solo dos subunidades adyacentes del canal GluCl. Se observan desde abajo (dominio intracelular) y la subunidad positiva se representa en color verde y la subunidad negativa en color rojo. Los cruces transmembranales se abrevian de la siguiente manera M1, M2, M3 y M4. Imagen y modificada de (Hibbs and Gouaux, 2011).

1.5 Canal de Cloro dependiente de glutamato

El canal iónico de cloro dependiente del neurotransmisor glutamato (GluCl) contribuye al funcionamiento del sistema nervioso de los invertebrados en la modulación de la locomoción, en la regulación de la alimentación y la mediación de los estímulos sensoriales externos (Wolstenholme,

2012). Es parte de la familia de los receptores Cys-loop, que son canales iónicos pentámericos activados por ligandos y se dividen en receptores excitatorios e inhibitorios dependiendo de su permeabilidad a cationes o aniones (Lynagh and Pless, 2014). En la Figura 6 podemos observar que el canal está conformado por 5 subunidades organizadas para formar un poro central permeable al ion cloruro. Todas las subunidades cuentan con un dominio N-terminal extracelular conformado por laminas beta, el cual se relaciona como el sitio de unión al glutamato, y tiene, en el dominio C-terminal, cuatro alfa-hélices transmembranales las cuales forman el canal (Fuse et al., 2016).

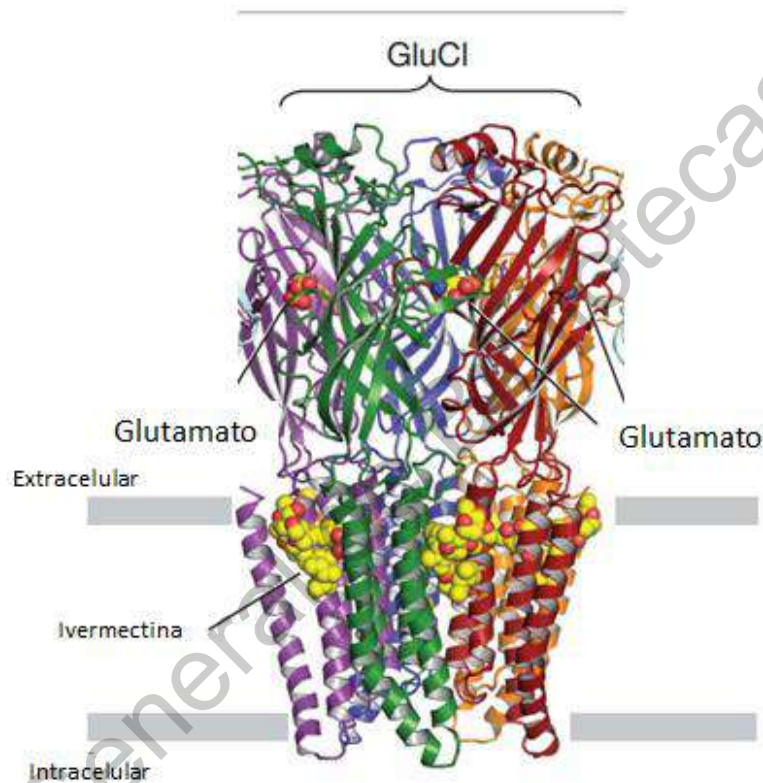


Figura 6: Estructura cristalográfica del canal GluCl unido a su ligando glutamato y a su modificador alostérico ivermectina. Imagen tomada y modificada de (Hibbs and Gouaux, 2011). El canal está conformado por 5 subunidades organizadas para formar un poro central permeable al ion cloruro. Todas las subunidades cuentan con un dominio N-terminal extracelular conformado por laminas beta, el cual se relaciona como el sitio de unión al glutamato, y tiene, en el dominio C-terminal, cuatro alfa-hélices transmembranales las cuales forman el canal (Fuse et al., 2016).

El gen que codifica para el canal GluCl se describió por primera vez en el nematodo *Caenorhabditis elegans*. El estudio de este organismo y el análisis de la secuencia del gen *glucl* permitió la identificación de una familia de genes que codifican en esta especie para diferentes subunidades del canal de cloruro dependiente de glutamato (Cully et al., 1994). Se han descrito dos formas alternas de la proteína del canal GluCl, la subunidad α y las β , las cuales pueden ensamblarse en heteropentámeros u homopentámeros. Los homoméricos de subunidades α son sensibles a la ivermectina e insensibles al glutamato cuando son expresadas en ovocitos de *Xenopus laevis*. A diferencia de los heteroméricos, conformados por unidades α y β , que son

sensibles a la ivermectina y al glutamato (Cully et al., 1994). Sin embargo, Joseph A. Dent y colaboradores en 1997 describen un nuevo gen en *C. elegans*, *avr-15* que codifica a una subunidad del canal GluCl con propiedades diferentes a las subunidades descritas anteriormente. La subunidad del gen *avr-15* es sensible al glutamato y a la ivermectina cuando es expresada en ovocitos de *Xenopus leavis* (Dent et al., 1997).

El GluCl al ser un receptor inotrópico sufre un cambio de conformación cuando su ligando, el glutamato, se une a él. El cambio de conformación abre el canal permitiendo el paso del ion cloruro al interior de la célula. Dado que el potencial de membrana en el cual el ion cloruro está en equilibrio es cercano al potencial de reposo, los canales de cloro dependientes de ligando se oponen a la excitabilidad normal de la célula y la repolarizan (Hille, 2001). Por esto el canal GluCl se considera un canal inhibitorio aunque su ligando sea el glutamato que es un neurotransmisor excitador. En la Figura 7 tenemos la hiperpolarización de la membrana de la neurona postsináptica por la unión del neurotransmisor glutamato al canal GluCl incrementando el flujo del cloruro a la célula.

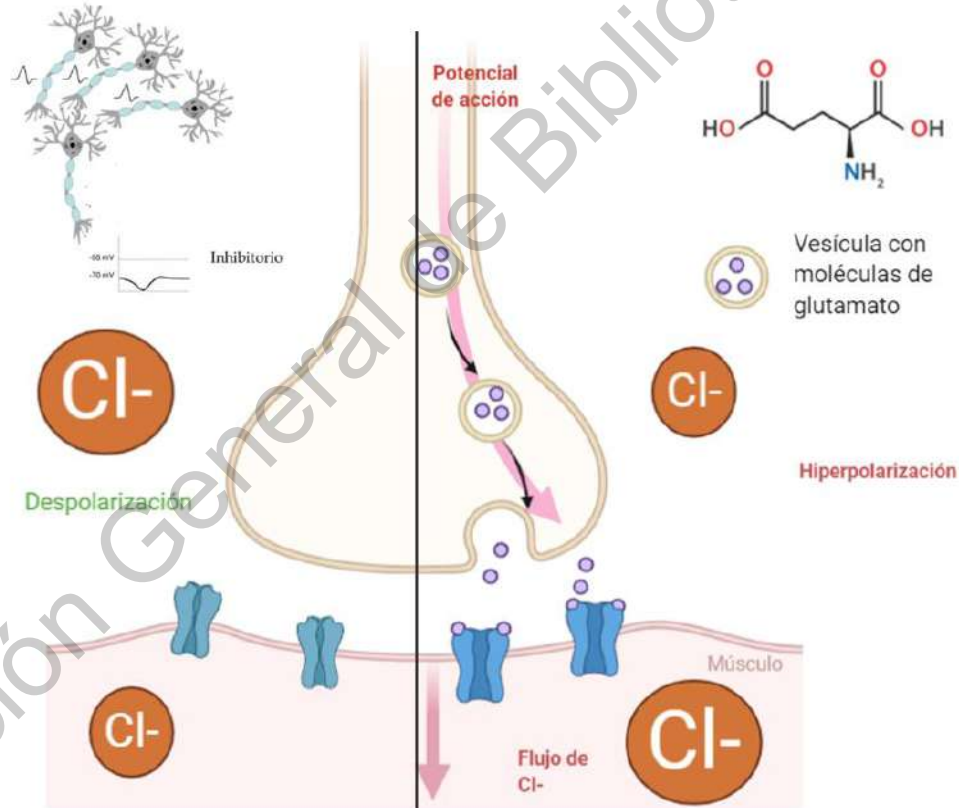


Figura 7: Neurotransmisión inhibitoria rápida. Hiperpolarización de la membrana de la neurona postsináptica por la unión del neurotransmisor glutamato al canal GluCl incrementando el flujo del cloruro a la célula. La diferencia de concentración del cloruro se representa en el tamaño del círculo.

La ivermectina activa potentemente a GluCl α y de forma simultánea hace que el canal iónico sea más susceptible a la activación por unión de glutamato (Etter et al., 1996; Hibbs and Gouaux, 2011). En GluCl α , se identifica a la ivermectina como un agonista alostérico. Cuando se une la ivermectina a GluCl suceden dos tipos de modificaciones conformacionales: la primera, una distorsión local en la región cercana al sitio de unión del ligando; y la segunda, un cambio de

conformación global del receptor que corresponde a una transición de cerrado a reposo, finalizando con un estado abierto de forma completa como se muestra en la Figura 8 (Althoff et al., 2014; Hibbs and Gouaux, 2011)

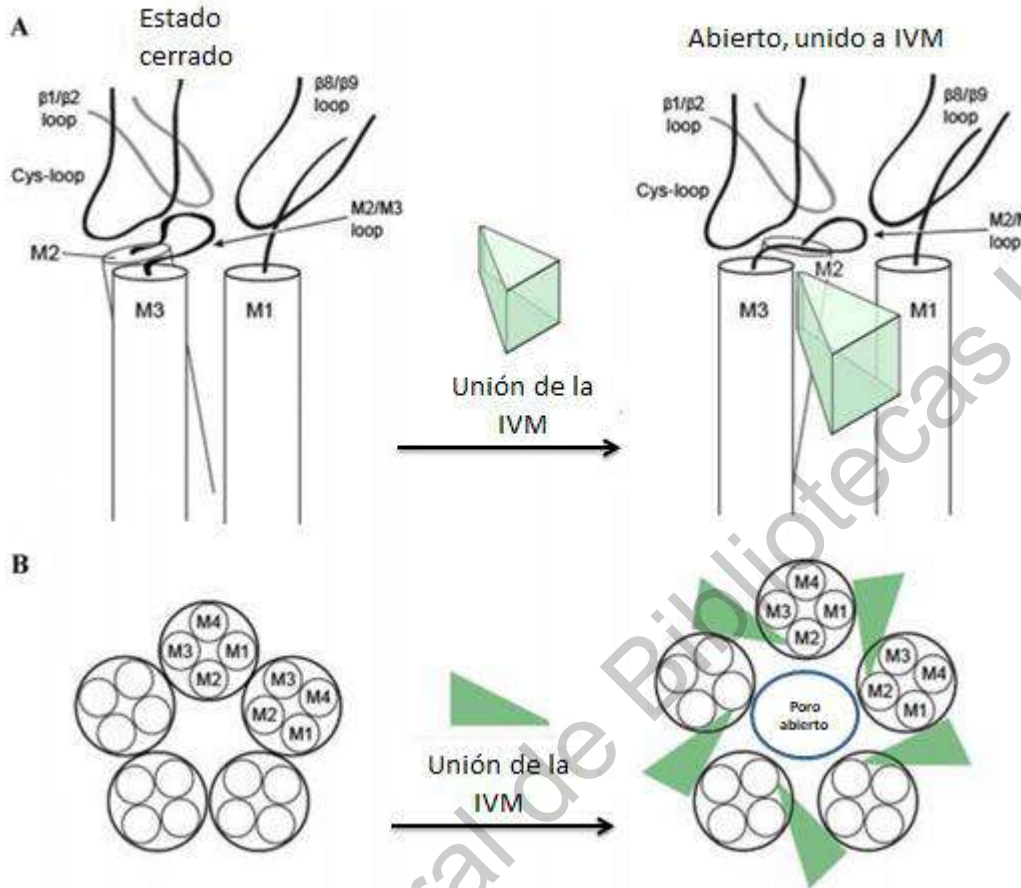


Figura 8: Cambio de conformación global del receptor por la unión de la ivermectina. Entre las subunidades del canal se une la ivermectina Interactuando con M2, que confirma el poro del canal, y con M1 y M3. La unión lleva el canal de un estado a uno abierto de forma permanente (Hibbs and Gouaux, 2011; Wolstenholme, 2012)

1.6 Resistencia a los acaricidas

Los acaricidas utilizados de forma continua inciden una fuerte presión de selección al eliminar a los individuos susceptibles. Aquellos individuos que logran sobrevivir al acaricida podrán aparearse y transmitir sus genes a la siguiente generación. Conforme pasan las generaciones y el uso del acaricida continúe, el número de individuos que sobreviven aumentará y se le considera como una población que desarrolla resistencia (Fernández-Salas et al., 2012).

La resistencia en una población de garrapatas se puede medir con pruebas diagnósticas que se dividen en bioensayos y pruebas moleculares. Los bioensayos a su vez se ramifican en:

Prueba de inmersión de adultas (PIA): Se utilizan hembras grávidas y estas son sumergidas en una solución con el acaricida a probar. Se compara la ovoposición entre las tratadas y no tratadas y la mortalidad de las hembras (Schumaker, 2012.). La concentración discriminante se basa en la concentración recomendada por el comerciante (Drummond et al., 1973). El lado negativo de esta prueba es el tiempo necesario para obtener una respuesta, entre 2 a 3 semanas y se requieren

grandes cantidades de hembras para tener un resultado confiable (Jonsson et al., 2007). La ecuación para calcular el índice de resistencia con esta prueba se muestra en la Tabla 2.

Prueba de paquete de larvas (PPL): En varios papeles filtro que son impregnados con distintas dosis del acaricida se agregan 100 larvas, 24 horas después se cuantifican las larvas capaces de moverse y caminar. Lo cual permite calcular la CL50 y la CL99 de la cepa a evaluar. Se puede utilizar la dosis discriminante la cual es dos veces la cantidad de acaricida que podría matar al 99.99 de la población de una cepa susceptible (Schumaker, 2012.). En esta prueba en comparación con la PIA es más fácil tener un mayor grupo de individuos y se mide la respuesta ante el acaricida con los porcentajes de mortalidad. La ecuación para calcular el índice de resistencia con esta prueba se muestra en la Tabla 2.

Prueba de inmersión de larvas (PIL): Es muy similar a la PPL pero difiere en el tiempo de exposición al acaricida, por diez minutos las larvas son sumergidas en una solución con la ivermectina (Klafke et al., 2006). La prueba permite evaluar diferentes concentraciones de acaricida en el mismo ensayo. Lo cual permite determinar la CL50 y CL99 de la cepa problema y la dosis discriminante (DD) (Sabatini et al., 2001). La ecuación para calcular el índice de resistencia con esta prueba se muestra en la Tabla 2. El uso de cada una de estas pruebas depende del acaricida a evaluar y si estos ya se han descrito como acaricidas o acaricidas potenciales (Klafke et al., 2006).

Tabla 2: Descripción de los bioensayos, sus características y las ecuaciones para calcular los porcentajes

Bioensayos	Características	Ecuaciones
Paquete de larvas (PPL)	Principal prueba de diagnóstico por la FAO. Se utilizan papeles impregnados con el acaricida. La mortalidad se cuantifica 24 horas después.	$\% \text{ Mortalidad} = \frac{\text{número de muertes}}{\text{número garrapatas totales}} \times 100$ $= \frac{\% \text{ Mortalidad corregida}}{100\% \text{ Mortalidad del control}}$ $= \frac{(\% \text{ Mortalidad tratamiento} - \% \text{ Mortalidad control})}{100\% \text{ Mortalidad del control}}$
Inmersión de Larvas (PIL)	Los resultados son similares a los del PPL. 100 larvas son sumergidas 10 minutos en tubos con el acaricida.	$= \frac{\% \text{ Mortalidad corregida}}{100 - \% \text{ Mortalidad del control}}$ $= \frac{(\% \text{ Mortalidad tratamiento} - \% \text{ Mortalidad control})}{100 - \% \text{ Mortalidad del control}}$
Inmersión de adultas (PIA)	Poco utilizado en el diagnóstico. Determina la eficacia de nuevos acaricidas en varias especies de garrapatas. No esta estandarizada y se requieren gran número de individuos y tiempo.	$\text{Reproducción estimada} = \frac{\text{Peso de huevos}}{\text{Peso de hembras}} \times \% \text{ eclosión}$ $\text{Porcentaje de control} = \frac{(\text{RE control} - \text{RE tratado})}{\text{RE tratado}} \times 100$

Las pruebas de paquete larvario e inmersión de larvas son recomendadas por la organización de agricultura de las naciones unidas (FAO siglas en inglés). Las larvas de 14 días se exponen al acaricida en un papel filtro impregnado por 24 horas o sumergidas en una solución con el acaricida por 10 minutos respectivamente. Se verifica la mortalidad a las 24 horas. Se realizan réplicas con 100 larvas cada una y se analizan los resultados por ANOVA. Utilizando la mortalidad de una cepa

susceptible al acaricida y comparándola con la mortalidad de una cepa problema, se obtiene el grado de resistencia dicho acaricida (Rodríguez-Vivas et al., 2012, 2010)

1.6.1 Resistencia a ivermectina

La resistencia a ivermectina se define como un atributo heredable en la población de garrapatas, la cual incrementa el porcentaje de la población que sobrevive a una exposición de cierta concentración del acaricida (Rodríguez-Vivas et al., 2018). Para el control de *R. microplus* el uso constante de la ivermectina ha generado cepas resistentes, el primer caso de garrapatas resistentes en América fue reportado en Brasil por Martins y Furlong (2001) y hasta el año 2006 Klafke logra estandarizar el método de prueba de inmersión de larvas. A continuación se muestra en la tabla 3 los reportes de resistencia a ivermectina, su método de evaluación y gradiente de resistencia.

Tabla 3: Reportes de casos resistentes a ivermectina con lugar, método de evaluación y el valor del grado de resistencia en América Latina y principalmente México.

Lugar	Método de evaluación	Gradiente de resistencia	Autores
Brasil	Ensayos en campo	Respuesta dicotómica	(Martins and Furlong, 2001)
Estado de São Paulo	Prueba de inmersión de larvas	3.78 (LC ₅₀),	(Klafke et al., 2006)
Universidad Autónoma de Yucatán	Prueba de inmersión de larvas	2.9 (LC ₅₀),	(Perez-Cogollo et al., 2010)
San Fernando (Yucatán)	Prueba de inmersión de larvas	8.59 (LC ₅₀)	(Perez-Cogollo et al., 2010)
Veracruz	Prueba de inmersión de larvas	3.03 (LC ₅₀)	(Fernández-Salas et al., 2012)A
Veracruz	Prueba de inmersión de larvas	8.21 a 1 (LC ₅₀)	(Fernández-Salas et al., 2012)B

Los mecanismos de resistencia a ivermectina que se han descrito en nematodos y artrópodos son: 1) El incremento de la actividad metabólica por enzimas, como las esterasas (Hernandez et al., 2002) y p450 (Oakeshott et al., 2003) y 2) la pérdida de la sensibilidad de la diana farmacológica ante el acaricida (He et al., 1999).

La resistencia metabólica de la ivermectina en artrópodos se ha asociado al incremento del metabolismo oxidativo. En un estudio de Bourguinat y colaboradores en el 2011, demuestran a través de estudios moleculares que la proteína más importante en la resistencia a ivermectina son los transportadores dependientes de ATP (ABC) (Bourguinat et al., 2011). Las proteínas ABC tienen como función bombear metabolitos endógenos a través de membranas intra- y extracelulares, lo cual disminuye la concentración de compuestos tóxicos dentro de la célula (Holland and A. Blight, 1999). Pohl y colaboradores al utilizar inhibidores de proteínas ABC junto con IVM observaron una disminución del índice de resistencia en los bioensayos PIL. Al analizar la expresión de tres transportadores ABC en garrapatas resistentes describen al gen *RmABCB10* como posible transportador involucrado en la resistencia a ivermectina en *R. microplus* (Pohl et al., 2011). Es importante notar que aún con los inhibidores de la proteína ABC la resistencia solo disminuyó, más no sucedió una reversión por lo cual se sospecha que están involucrados otros mecanismos de resistencia.

La insensibilidad en el canal GluCl, sucede cuando se evita o disminuye la unión de la ivermectina al sitio de acción de la proteína. Este fenómeno ocurre por cambios en la estructura terciaria de la proteína y por cambios en la secuencia de aminoácidos (McCavera et al., 2009) (Kwon et al., 2010). A diferencia de la resistencia metabólica, la insensibilidad del canal se propicia en poblaciones exogámicas por flujo genético, es decir la llegada del gen *GluCl* con mutaciones o la aparición de mutaciones en el gen *GluCl* en poblaciones endogámicas.

Las mutaciones posibles son limitadas porque es importante que el cambio disminuya la unión con el acaricida al canal sin causar pérdida de función primaria de la proteína. Si se cumplen estas características y está la presencia del acaricida las sustituciones serán favorecidas por la selección natural (Tan et al., 2005). Dichas sustituciones pueden ser encontradas en otros artrópodos o insectos presionados con ivermectina, por ejemplo en el piojo *Pediculus humanus capitis* se encontraron las mutaciones A251V en el M3, S46P en dominio N-terminal y H272R entre la M3 y M4 en el canal de (Amanzougaghene et al., 2018). La mutación con mayor frecuencia encontrada fue A251V, se sospecha que la mutación altera las propiedades funcionales del canal GluCl en vez de alterar la unión de ivermectina a este. Otras mutaciones se han descrito en distintos invertebrados resistentes a la ivermectina se muestran a continuación en la tabla 4.

Tabla 4: Organismos donde se han encontrado sustituciones de aminoácidos en el canal GluCl y asociado estas a la resistencia a ivermectina.

Organismo	Sustitución de AA	Región en el canal	Autores
<i>Drosophila melanogaster</i>	P 299 S	Entre M2 y M3	(Kane et al., 2000)
<i>Plutella xylostella</i>	A 309 V	M3	(Wang et al., 2016)
<i>Tetranychus urticae</i>	G 323 D	M3	(Dermauw et al., 2012)
<i>Tetranychus urticae</i>	G 326 E	M3	(Kwon et al., 2010)
<i>Pediculus humanus</i>	A 251 V	M3	(Amanzougaghene et al., 2018)
<i>Pediculus humanus</i>	S 46 P	N terminal	(Amanzougaghene et al., 2018)
<i>Pediculus humanus</i>	H 272 R	Entre M2 y M3	(Amanzougaghene et al., 2018)

2. Justificación

Cuando se presenta una población de garrapatas resistentes a acaricidas como a la ivermectina, se observa mermas productivas del hato y aumentan el número de casos de enfermedades como la babesiosis bovina. Por lo tanto, entender el fenómeno de la resistencia ante la ivermectina es de suma importancia. Existen distintas hipótesis sobre los mecanismos que podrían explicar la resistencia a ivermectina, la metabolización del acaricida y la presencia de mutaciones en la secuencia codificante, que desensibilizan el canal GluCl ante la lactona macrocíclica.

Estudios anteriores no han podido identificar una sola causa definitiva de esta resistencia porque utilizan garrapatas de origen silvestre para sus análisis, donde estas se encuentran en contacto con más de un tipo de acaricidas y el movimiento de ganado infestado permite el intercambio constante genético entre las poblaciones de orígenes distintos. Es por esto que el análisis de secuencias de GluCl, proveniente de garrapatas con distintos índices de resistencia y garrapatas susceptibles, ambos fenotipos provenientes de una misma cepa de laboratorio nos permitirá conocer si hay un cambio en la secuencia de aminoácidos que conforman al canal y si este cambio impide la interacción física de la ivermectina con la proteína. Conocer el tipo de resistencia nos permite buscar estrategias adecuadas para controlar y disminuir la aparición de nuevas cepas resistentes.

3. Hipótesis

Los diferentes grados de resistencia a ivermectina en *R. microplus*, se asocia a modificaciones genéticas en el gen que codifica para el canal de cloro dependiente de glutamato.

4. Objetivo general

Establecer si hay una correlación entre las modificaciones genéticas en el gen que codifica para el canal de cloro dependiente de glutamato en *R. microplus* y los diferentes grados de resistencia a ivermectina.

4.1 Objetivos particulares

- Amplificación y secuenciación del gen del canal GluCl en garrapatas resistentes y susceptibles a ivermectina.
- Análisis informático de las secuencias del canal GluCl.
- Evaluación de la significancia estadística de las variaciones en las secuencias del canal GluCl en garrapatas y su correlación con las resistentes a ivermectina.

5. Metodología

5.1 Consideraciones Bioéticas

5.1.1 Obtención de muestras biológicas

Las muestras biológicas de garrapatas fueron proporcionadas por la Dra. Gabriela Aguilar Tipacamu, investigador-docente de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro. A través de una colaboración en el proyecto aprobado por el comité de Bioética de la FCN-UAQ, con el folio 3498 y titulado “Estudio proteómico comparativo de *Rhipicephalus microplus* resistentes y susceptibles a las ivermectinas”. Las muestras de garrapatas se originaron para poder cumplir con el primer objetivo del proyecto anteriormente citado que es la de obtener una cepa resistente a IVM, donde la cepa, que es de laboratorio y susceptible al acaricida, fue presionada por 2 años en bovinos medicados con subdosis hasta llegar a la dosis comercial de ivermectina hasta obtener garrapatas resistentes, las cuales fueron evaluadas con el bioensayo PIL para determinar el grado de resistencia. Las garrapatas fueron recolectadas en dos momentos, antes y después de que cayeran del bovino, denominándoles semirepletas y repleta respectivamente. Se recolectaron separando individuos en tubos independientes, sumergiéndolas en solución TRI (fenol pH 4, tiocianato de guanidinio 4 M) y congelándolas en hielo seco. Las muestras se recibieron y mantuvieron todo el tiempo a -80 °C hasta el momento de su procesamiento.

5.1.2 Manejo, almacenamiento y disposición final de residuos peligrosos biológicos infecciosos

Los materiales sólidos tales como puntas de micropipetas, guantes y tubos fueron inactivados con una solución de hipoclorito de sodio al 10% durante 30 min. (OMS, 2005), enjuagados con agua corriente y desechados como residuos no peligrosos. Los residuos provenientes del protocolo de extracción de ácidos nucleicos como productos que contengan residuos de fenol-cloroformo, isopropanol y tiocianato de guanidinio fueron colocados en contenedores rígidos, con sellado hermético de polipropileno, color rojo, con la leyenda “Residuos Peligrosos de fenol-cloroformo,

isopropanol y tiocianato de guanidinio". Dichos materiales fueron almacenados temporalmente en el área específica destinada y señalizada del laboratorio por no más de treinta días, estando a cargo de su recolección y disposición final la empresa "Transporte y recolección integral de residuos peligrosos S.A. de C.V." misma que presta sus servicios a la Universidad Autónoma de Querétaro. La manipulación, almacenaje, transporte y disposición final se llevó a cabo bajo las consideraciones de la norma mexicana vigente NOM-087-ECOL-SSA1-2002.

5.2 Extracción de RNA

Las muestras de garrapatas congeladas con agente TRI (fenol pH 4, Tiocianato de guanidinio 4 M) fueron maceradas con nitrógeno líquido en un mortero. El producto macerado se incubó por 5 min a temperatura ambiente (RT). Posteriormente se adicionaron 0.2 mL de cloroformo (grado molecular), se agitó vigorosamente por 15 seg y se incubó por 3 min a RT. Para separar las fases con ayuda del cloroformo se centrifugó a 12000 g por 15 min a 4 °C. Se obtuvieron tres fases de las cuales la fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo. En el tubo nuevo se añadió 0.5 mL de isopropanol (grado molecular) a la fase acuosa y se incubó por 10 min a RT. Para precipitar el ARN se centrifugó a 12000 g por 10 min a 4 °C. Al concluir se retiró el sobrenadante y se lavó el pellet con etanol (grado biología molecular) al 75%. Se sometió a una centrifugación final de 7500 g por 5 min. Se dejó secar el pellet al aire y posteriormente se agregó 30 µL de agua libre de nucleasas. La pureza del ARN se verificó en el espectrofotómetro Nanodrop (2000) buscando una relación 260/280 de 2 y 260/230 de 2. La integridad de las muestras se observó con la técnica de electroforesis en gel de agarosa al 1%

5.2.1 Gel de agarosa y electroforesis.

Para preparar el gel de electroforesis se pesó 2 g de agarosa y se disolvió en 100 mL de buffer TAE (Tris, Ácido acético y EDTA), se calentó la mezcla en un horno de microondas dando pulsos de 4 seg hasta lograr una mezcla homogénea y se vertió en el molde para geles esperando a que enfrié y polimericé. Se colocó el gel polimerizado en una cámara de electroforesis sumergido en buffer TAE, se cargaron 50 µl de producto de PCR ó 3 µl de ARN con 3 o 1 µl de buffer de carga (azul de bromofenol y glicerol) y 1 µl de marcador de peso molecular. La fuente de poder se conectó a la cámara de electroforesis a 80 V por 50 min. Al terminar la electroforesis se colocó el gel en el transluminador y con una aguja de bisturí nueva se cortó y retiró el fragmento del gel de la banda esperada, para el tamaño del amplicón, se removió el exceso de agarosa y se pesó en una balanza analítica.

5.3 RT-PCR

5.3.1 Tratamiento con DNAsa

El ARN extraído fue retrotranscrito a cDNA para la amplificación del canal GluCl. Primero se trató el ARNtotal con DNasa I (Invitrogen) con la finalidad de eliminar la contaminación por ADN proveniente del proceso de extracción de ácidos nucleicos. Para esto se agregaron a un tubo estéril de centrifuga 1.5 mL, buffer 10X (200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 20 mM MgCl₂, 500 mM KCl) para una concentración final 1X, 0.5 µL de enzima DNase I invitrogen por cada 1 microgramo de ARN y se ajustó con agua DEPC hasta un volumen final de 10 microlitros. Se dejó incubar 15 min a RT y al finalizar el tiempo se inactivó la reacción y la enzima elevando la temperatura a 65 °C por 10 min y agregando ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 25mM.

5.3.2 Retrotranscripción del ARN mensajero

Al producto de la reacción con tratamiento de DNase, se le adicionaron 0.4 μL de OligodT 50 μM y 0.4 μL de hexámeros aleatorios 50 $\text{ng}/\mu\text{L}$. Se incubó a 60 $^{\circ}\text{C}$ por 10 min para que los hexámeros aleatorios y los OligodT se unieran a la cadena de ARN y al finalizar inmediatamente se incubó a 4 $^{\circ}\text{C}$ para mantener hibridados. Con la muestra a 4 $^{\circ}\text{C}$ se adicionó el amortiguador 10X para la enzima Superscript III a una concentración final de 1X, el protector de ARN RNAsaOUT 40U/ μL se adicionó a una concentración final de 0.5U/ μL , Ditiotritol (DTT) 0.1 M a 0.01M, los dNTPs 10mM a 0.5 mM final y la enzima Superscript III (Invitrogen) 200 U/ μL a 10U/ μL final. Se inició la incubación a 25 $^{\circ}\text{C}$ por 10 min con la finalidad de incentivar la unión de los hexámeros aleatorios al ARN y se elevó a 50 $^{\circ}\text{C}$ por 50 min, en donde la enzima comenzó a funcionar y se generó la cadena complementaria. Se finalizó con la inactivación de la reacción a 80 $^{\circ}\text{C}$ por 10 min para detener la actividad de la enzima. Al terminar se adicionó RNasa H (Invitrogen) 2 U/ μL a .95 U/ μL final para eliminar el ARN y dejar solamente la cadena complementaria de ADN, se incubó a 37 $^{\circ}\text{C}$ por 20 min. El producto de la reacción anterior se almacenó a -20 $^{\circ}\text{C}$ y se utilizó para la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa.

5.3.3 Diseño de los cebadores

Para lograr amplificar el cDNA del canal GluCl, se diseñaron un par de cebadores llamado Glu870, el cual flanquea la región hidrofóbica transmembranal de la proteína. El amplicón esperado es de 870 pb. Ambos cebadores se diseñaron evitando la formación de bucles, hetero- y homodímeros. Los cebadores fueron analizados con el programa BLAST de NCBI para verificar que no fueran complementarios a cualquier secuencia proveniente de bovinos, humanos y bacterias y protozoarios. Las TM fueron calculadas en el programa OligoAnalyzer de IDT con las siguientes características: concentración de cebadores 0.25 mM, concentración de Na^+ 50 mM, concentración de Mg^{++} 2mM, concentración de dNTPs .2nM. El cebador sentido es 5'-CCC AAC GTG CTT CTA CGA ATA-3' y el antisentido es 5'-TTG AAG AGG GCG AAC ATG AG-3'.

5.3.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

En un tubo cónico de 0.2 mL se agregaron 25 μL de Thermo Scientific Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix 2x, 1.25 μL de cebador sentido 10 μM , 1.25 μL de cebador antisentido 10 μM , 3 μL cDNA y 19.5 μL agua grado Biología Molecular.

El protocolo del par de cebadores de 870pb es: un inicio con 98 $^{\circ}\text{C}$ por 10 seg para desnaturalizar las hebras, 30 ciclos de 98 $^{\circ}\text{C}$ por 5 seg, 62 $^{\circ}\text{C}$ por 5 seg y 72 $^{\circ}\text{C}$ por 13 seg. Finalizamos con una extensión de 1 min a 72 $^{\circ}\text{C}$. Finalizamos con una extensión de 1 min a 72 $^{\circ}\text{C}$.

5.3.1 Purificación de productos de PCR

Por cada 100 mg de agarosa al 2% se agregó 300 μL del amortiguador QC (QIAquick gel Extraction kit). Se incubó a 50 $^{\circ}\text{C}$ por 10 min. Cuando el gel se disolvió completamente se agregó un volumen de isopropanol (grado molecular). Se colocó la solución en una columna QIAquick y se centrifugó por 1 min a 13 000 rpm. Otros 500 μL de amortiguador QC fueron agregados y como es recomendado por el fabricante (QIAGEN) para muestras que serán enviadas a secuenciar. Para lavar la columna se agregaron 750 μL de amortiguador PE (con etanol) se dejó incubando 5 min antes de centrifugar por 1 min a 13 000 rpm. Al finalizar se colocó la columna en un tubo nuevo cónico de 1.5 mL y se añadió 15 μL de agua grado Biología Molecular a 50 $^{\circ}\text{C}$. Se incubó por 5 minutos antes de centrifugar por 1 min a 13 000 rpm. Las muestras se cuantificaron con el método mencionado anteriormente en el apartado 5.2. y verificadas en gel de agarosa.

5.3.2 Secuenciación

Las muestras de ADN junto con el cebador sentido correspondiente fueron enviadas al servicio de secuenciación que ofrece el laboratorio nacional de genómica para la biodiversidad (LANGEBIO). Donde se solicitó el servicio de secuenciación capilar con el método desarrollado por Frederick Sanger modificada con los 4 dideoxinucleótidos marcados con fluorescencia diferencial y electroforesis capilar. Los requerimientos para enviar a secuenciar a los servicios genómicos del LANGEBIO fueron los siguientes: mínimo 5 μL con una concentración $>15 \text{ ng}/\mu\text{L}$, obtener 2 en la relación 260/280 y ser solo una banda en el gel de electroforesis.

5.4 Análisis Bioinformático y Estadístico

Los electroferogramas y las secuencias obtenidas en el servicio de secuenciación Sanger fueron revisadas en el programa de libre acceso GENTle. Se verificó que los picos del electroferogramas coincidieran con sus respectivas secuencias. Posteriormente se realizó un alineamiento en el programa estadístico R con el paquete Bioconductor y Biostring. Se utilizó el algoritmo MUSCLE para alinear las secuencias con 1000 repeticiones, utilizando la matriz de sustitución UMPGA, las penalizaciones por gap se ajustó a -1. El alineamiento resultante se utilizó para buscar sustituciones y se utilizó el programa de libre acceso Jalview para obtener la secuencia consenso. Se utilizó el algoritmo Neighbor Joining para generar la matriz de distancias y posteriormente se generó un árbol filogenético en el programa R con el paquete msa y ggplot.

La traducción insilico de las secuencias se realizó en GENTle usando la secuencia KF881800.1 con número de identificación del NCBI (Gassel et al., 2014) como referencia para la obtención del marco de lectura. Las secuencias de aminoácidos fueron alineadas con el algoritmo MUSCLE con 1000 repeticiones, utilizando la matriz de sustitución UMPGA, las penalizaciones por gap se ajustó a -1. El alineamiento resultante se utilizó para buscar sustituciones y se utilizó el programa de libre acceso Jalview para obtener la secuencia consenso. Se utilizó el algoritmo neighbor joining para generar la matriz de distancias y posteriormente se generó un árbol filogenético en el programa R con el paquete msa y ggplot.

Los polimorfismos encontrados fueron validados con la prueba estadística exacta de Fisher, donde se generó una tabla de contingencia para los polimorfismos de las secuencias de nucleótido y otra tabla para las secuencias de aminoácido. Los análisis se realizaron dentro del programa de libre acceso R. Las variables nominales son si la secuencia proviene de una garrapata resistente o susceptible y si tienen el polimorfismo o no. El nivel de confianza se ajustó 95% esperando un valor de P de 0.05.

6 Resultados

6.1 Determinación del índice de resistencia con el bioensayo de inmersión de larvas.

Las muestras utilizadas en nuestro estudio provinieron del proyecto “Estudio proteómico comparativo de *Rhipicephalus microplus* resistentes y susceptibles a las ivermectinas” En esta investigación se buscó generar una cepa de *R. microplus* resistente a ivermectina. Para lograrlo se infestaron bovinos con garrapatas susceptibles y se trataron con subdosis letales de ivermectina. Las hembras grávidas, que sobrevivieron, ovopositaron en una incubadora y las larvas que eclosionaron de esos huevos se utilizaron para el siguiente pase. Se continuó presionando la cepa por dos años y entre cada generación se midió el índice de resistencia con el bioensayo de

inmersión de larvas. De forma paralela la cepa de origen susceptible se preservó infestando bovinos pero sin tratamiento de acaricida.

El número que se menciona en el índice de resistencia se obtiene con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Mortalidad corregida} = \frac{(\% \text{ Mortalidad tratamiento} - \% \text{ Mortalidad control})}{100 - \% \text{ Mortalidad del control}}$$

6.2 Extracción de ácidos nucleicos

Para iniciar la estrategia experimental se extrajeron los ácidos nucleicos de garrapatas resistentes y susceptibles al fármaco ivermectina. Diecinueve muestras fueron procesadas con el método de reactivo TRIS / cloroformo, cada muestra está conformada por el ARN de un solo individuo. El ADN fue eliminado de las muestras con DNAsas permitiendo trabajar exclusivamente con ARNmensajero. En la Tabla 5 están enlistados los resultados de la cuantificación por espectrofotometría de UV visible de espectro completo (Nanodrop 2000). Las muestras tienen un código de muestra y color de acuerdo a las características propias de la muestra. El color azul representa las garrapatas cuyo índice de resistencia es 4.5, el color rojo se asignó a las garrapatas susceptibles. El código amarillo representa las garrapatas resistentes con un índice de resistencia de 5.2 y el código verde tiene un índice de resistencia de 2.1. En la Figura 9 se observa la electroforesis de ARN en agarosa, donde es visible dos bandas las cuales son las subunidades ribosomales 28 S y 18 S, para verificar su integridad previa a su utilización.

Tabla 5: Muestras de ARN de garrapatas resistentes y susceptibles.

Código color	Nombre de la muestra	Concentración ng/μl	Relación 260/280	Relación 260/230	Fenotipo
Rojo 1	RSUC2791	9787.2	2.03	2.18	Susceptible
Rojo 2	RSUC2792	4396.8	2.01	2.13	Susceptible
Rojo 4	RSUC1213	2615.8	2	2	Susceptible
Rojo 5	RSUC1211	350.5	2	0.9	Susceptible
Rojo 6	RSUC1212	8602.5	2	2	Susceptible
Rojo 7	RSUC1214	823.6	2.2	1.7	Susceptible
Azul 1	RR4.52591	586.1	1.98	2.04	Resistente
Azul 2	RR4.52592	1974.5	2.17	1.91	Resistente
Azul 4	RR4.51211	2948.5	2	1.62	Resistente
Azul 5	RR4.5327	3307.9	2	2.2	Resistente
Azul 6	RR4.5322	2246.7	1.90	1.80	Resistente
Azul 7	RR4.5326	390.8	2	1.8	Resistente
Verde 1	RSIV3091	2677.2	1.96	1.99	Resistente
Verde 2	RSIV3092	3574.6	1.89	2.01	Resistente
Verde 3	RVXZ321	236	1.9	2.2	Resistente
Verde 4	RVXZ322	1587	2	2	Resistente
Verde 5	RVXZ323	400	1.9	1.9	Resistente
Amarillo1	RR5.2461	1674.1	2.03	1.8	Resistente
Amarillo3	RR5.32RM	1457	2	2.1	Resistente

Las diecinueve muestras de garrapatas resistentes y susceptibles al fármaco ivermectina que fueron procesadas por el método de extracción TRIS / cloroformo. Se muestra el código de color de la muestra, nombre de la muestra, la concentración de ARN y el grado de pureza con base en la relación 260/280 y 260/230.

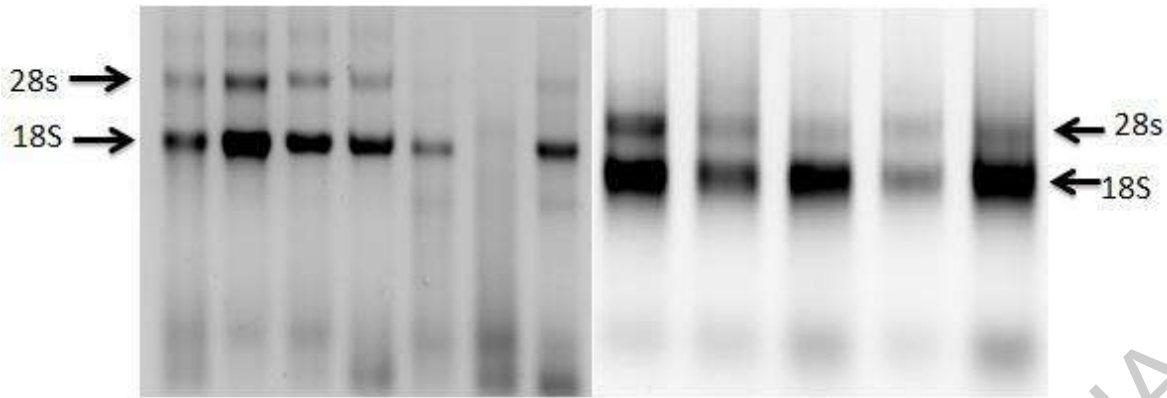


Figura 9: Electroforesis de ARN de garrapatas susceptibles y resistentes. Electroforesis en gel de agarosa de ARN extraído para verificar su integridad previa a su utilización. Se observa la presencia de las subunidades 28S y 18S para comprobar la integridad y descartar degradación del ARN.

6.2 Estandarización de la amplificación de la región del gen *glucl* que codifica para la región intramembranal de la proteína GluCl por tiempo real.

Se diseñaron un par de cebadores para amplificar la región del gen *glucl* α que codifica para la región cubre la M1 y M4 de la proteína. Los cebadores sentido y antisentido hibridan en el nucleótido 430 al 451 y 1284 al 1302 respectivamente. El tamaño del amplicón obtenido es de 870 pbs. En la Figura 10 se observan: la región de hibridación en el gen, el número de nucleótidos del producto esperado y el área de la proteína que representa el amplicón. Posteriormente los cebadores fueron analizados en el programa OligoAnalyzer para conocer las temperaturas de hibridación (t_m). Las temperaturas predichas utilizando el modelo de vecino más cercano fueron de 62 °C para ambos cebadores. La temperatura de hibridación se comprobó experimentalmente con una PCR modificando el gradiente de temperatura entre 55 a 64 °C. Se observa en la figura 11 el gel de electroforesis de ADN, en donde a partir del segundo carril hasta el séptimo carril se encuentran los amplicones, cada uno amplificado con una temperatura de hibridación distinta, de un tamaño aproximado de 870 pbs. Para está prueba se colocó el cDNA obtenido de la muestra RSUC1213 en cantidades iguales en los seis tubos.

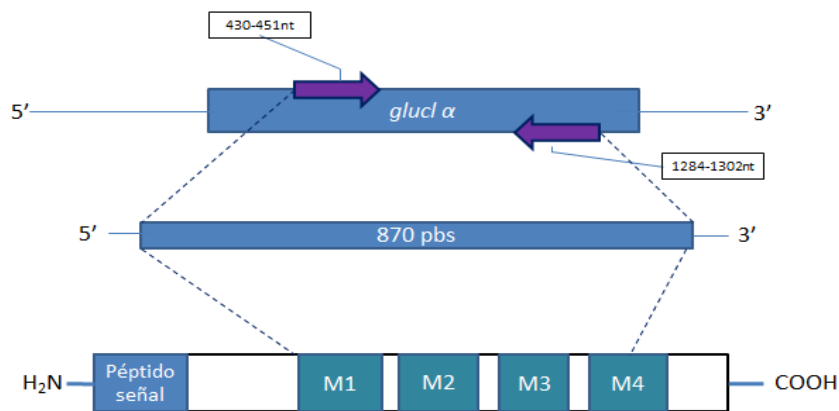


Figura 10: Representación del diseño de los cebadores: Diseño de cebadores para amplificar la región del gen *glucl-α* que codifica para la región intramembranal de la proteína. Se observan: la región de hibridación en el gen, el tamaño del amplicón obtenido y el área de la proteína que representa el amplicón.

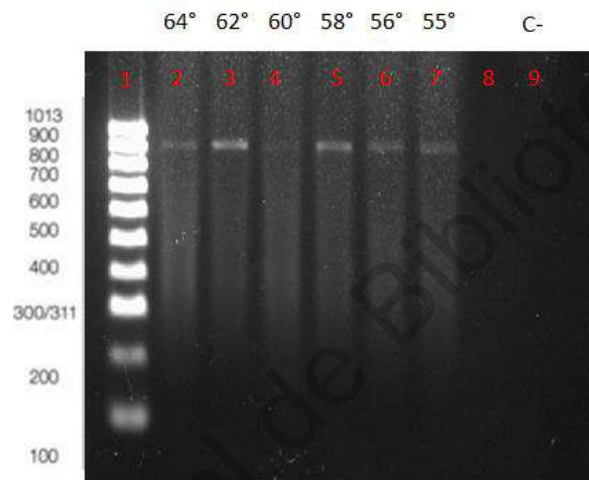


Figura 11: Estandarización de la amplificación del fragmento de 870pb del gen *glucl-a*. , gel de electroforesis de ADN en donde a partir del segundo carril hasta el séptimo carril se encuentran los amplicones, cada uno amplificado con una temperatura de hibridación distinta, de un tamaño aproximado de 870 pb. Para esta prueba se colocó el cDNA obtenido de la muestra RSUC1213 en cantidades iguales en los seis tubos.

Con base a la abundancia relativa de del amplicón generado y su tamaño esperado, se seleccionó la temperatura de 62 °C, como la temperatura óptima de amplificación, misma que utilizaremos en los siguientes experimentos.

6.3 Amplificación y purificación del gen *GluCI*

Las trece muestras de cDNA provenientes de garrapatas resistentes y las seis muestras de cDNA de garrapatas susceptibles fueron utilizadas como ADN molde en una PCR tiempo final. A cada reacción con volumen final de 8 μ l se agregaron 1.5 μ l de cDNA y se utilizó el programa del termociclador descrito en la Figura 12-A. Los productos fueron analizados en un gel de electroforesis, se observa una banda en el tamaño de 870 pb como se muestra en la figura 12-B. A continuación se realizó una reamplificación del fragmento de 870 pb utilizando como ADN molde el amplicón obtenido de la reacción anterior, aumentando el volumen final a 25 μ l.

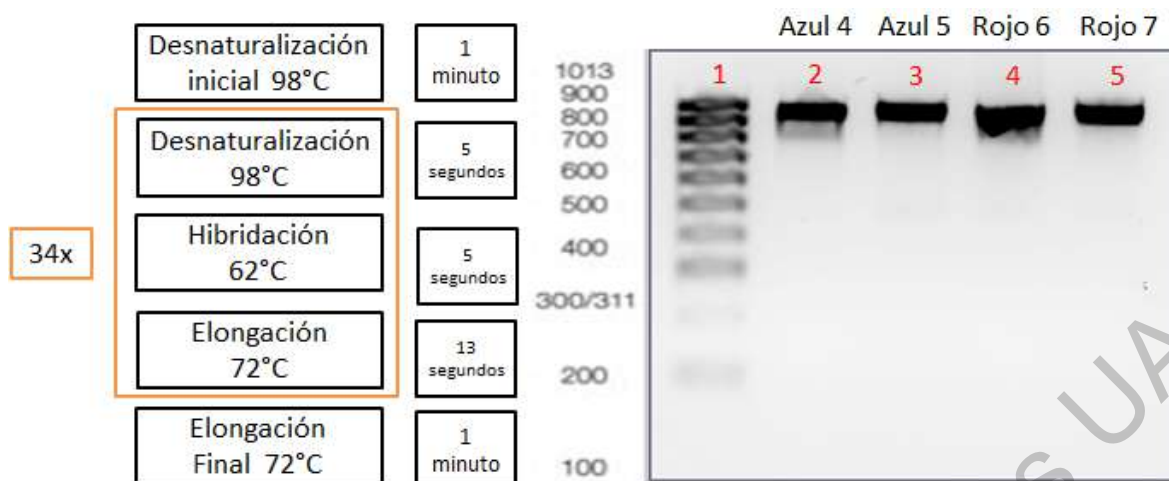


Figura 12: Amplificación del fragmento 870pb A) Programa del termociclador para la amplificación del amplicón de 870 pbs. B) Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de reacciones de PCR para amplificar el fragmento de 870 pbs con volumen final de 25µl. Las muestras Azul 4 y Azul 5 provienen de garrapatas resistentes y Rojo 6 y Rojo 7 de garrapatas susceptibles.

El gel con los productos de la PCR de 25 µl fue incidido con un bisturí estéril para cortar el amplicón obtenido de la reacción y posteriormente se sometió al kit de extracción QIAquick gel extraction de Qiagen. El ADN producto de la purificación se corrió en un gel agarosa para verificar que solo estuviera la banda en el tamaño esperado y se realizó una cuantificación por espectrometría visible a las muestras de ADN del fragmento 870pbs amplificadas y purificadas, mismas que fueron enviadas por paquetería a los servicios de secuenciación del LANGEBIO. Se muestra en la tabla 5 el código de color de la muestra, el nombre de la muestra, la concentración de ADN y el grado de pureza con base en la relación 260/280 y 260/230.

Tabla 6: Muestras de ADN del fragmento 870 purificadas

Código color	Nombre de la muestra	Concentración ng/μl	Relación 260/280	μl enviados para secuenciar
Rojo 1	<i>RS01411</i>	59.5	2	10
Rojo 2	<i>RS02411</i>	22.9	1.9	9
Rojo 5	<i>RSOV3POL</i>	25	2.4	10
Rojo 6	<i>RS06102</i>	25	2.4	10
Rojo 7	<i>RS07102</i>	25	2	10
Azul 1	<i>RR2.11411</i>	20.2	2	10
Azul 2	<i>AR4.52411</i>	14.4	2	10
Azul 4	<i>AR4.54102</i>	25	1.96	10
Azul 5	<i>AR4.55102</i>	25	1.89	10
Azul 7	<i>AR4.57102</i>	25	2	10
Verde 1	<i>VIV1411</i>	69.1	1.89	5
Verde 2	<i>VIXR2102</i>	25	2.3	10
Verde X1	<i>VIXR4102</i>	25	2	10
Verde X3	<i>VIXR3102</i>	25	2.01	10
Amarillo 1	<i>YR5.21411</i>	21.1	1.95	10
Amarillo 3	<i>YR5.23102</i>	25	1.96	10

Cuantificación por espectrometría de las muestras de ADN del fragmento 870pbs re-amplificadas y purificadas, mismas que fueron enviadas a los servicios de secuenciación del LANGEBIO. Se muestra el código de color de la muestra, el nombre de la muestra, la concentración de ADN y el grado de pureza con base en la relación 260/280 y 260/230.

6.4 Revisión y análisis bioinformáticos de los productos de secuenciación

Las secuencias reportadas por el LANGABIO fueron revisadas utilizando el software Blastn, solo aquellas que al ser alineadas con la secuencia de referencia KF881800.1 número de identificación del NCBI (Gassel et al., 2014) obtuvieron un valor de E igual a 0.0 y aquellas que en su electroferograma solo tuvieron un pico de emisión por nucleótido a lo largo de la secuencia fueron utilizadas en los siguientes análisis. Posteriormente solo cinco secuencias provenientes de garrapatas susceptibles y nueve de garrapatas resistentes cumplieron con los requisitos antes mencionados y fueron ingresadas con formato FASTA al programa de libre acceso R para ser alineadas con el algoritmo MUSCLE con las características predeterminadas. El alineamiento, producto del proceso anterior, fue visualizado en el programa Jalview donde se produjo la imagen de la Figura 13-A. Esta incluye todas las secuencias analizadas, la secuencia KF881800.1 y una secuencia consenso, generada por los algoritmos de Jalview. El análisis de las secuencias nos permitió identificar una sustitución del nucleótido 1146 de una timina a citosina en las garrapatas con índice de resistencia de 2.1 hasta las 5.4. Por lo tanto el 100% de las secuencias que provenían de una garrapata resistente tuvieron este polimorfismo.

Todas las secuencias previamente alineadas fueron ingresadas a un matriz de distancias, donde cada secuencia fue comparada contra las demás. Se generó con ella un mapa de calor para visualizar la similitud entre las secuencias de forma gráfica y posteriormente realizar un árbol filogenético para la identificación de grupos de secuencias, representado en la Figura 13 (B). Las secuencias de las muestras provenientes de garrapatas resistentes formaron un grupo filogenético,

el cual es independiente de las secuencias cuyo origen fueron las muestras de garrapatas susceptibles al fármaco ivermectina.

Posteriormente se realizó el análisis de los resultados con la prueba estadística exacta de Fisher, mismo que se presentan en la tabla 6 de datos. Las variables nominales son si la secuencia proviene de una garrapata resistente o susceptible y si tienen el polimorfismo o no. Con este análisis se buscó identificar si el número de secuencias de garrapatas resistentes o susceptibles difiere dependiendo del número de secuencias con el polimorfismo 1146C o 1146T. En el análisis obtuvimos un valor de P de 0.0019, lo cual nos dice que si existe una dependencia entre las dos variables nominales antes mencionadas. Para conocer el valor de asociación se calculó el coeficiente Phi, resultando en un valor de 0.8. Lo anterior significa que la presencia del polimorfismo 1146C se relaciona fuertemente con el fenotipo resistente a la ivermectina.

Tabla 7: Tabla de contingencia de la prueba Fisher secuencias nucleótidos

	Secuencias resistentes	Secuencias Susceptibles	Total
N 678 C	9	1	10
N 678 T	0	5	5
total	9	6	15
Valor de P obtenido	0.001998		Coeficiente phi : 0.866

Tabla de contingencias de los datos de secuencias resistentes y susceptibles y resultados de la prueba Fisher. Se anotan los valores de P y del coeficiente de phi obtenidos de la prueba Fisher.

6.5 Traducción *insilico* y análisis bioinformático de las secuencias del fragmento de 870 pb.

Las secuencias de nucleótidos provenientes de garrapatas susceptibles y resistentes fueron traducidas *insilico* con el programa GENtle usando el marco de lectura de la secuencia con el código de identificación AHE41097.1 en el NCBI (Gassel et al., 2014) como referencia. Posteriormente las secuencias proteicas fueron alineadas con el algoritmo MUSCLE con los parámetros predeterminados en el programa de libre acceso R. El alineamiento, producto del proceso anterior, fue visualizado en el programa Jalview donde se produjo la imagen de la Figura 14-A. Esta incluye todas las secuencias de aminoácidos analizadas, la secuencia AHE41097.1 y una secuencia consenso, generada por los algoritmos de Jalview. Todas las secuencias presentaron una sustitución en el aminoácido 35 de arginina a histidina, con referencia la secuencia AHE41097.1. Sólo dos muestras, provenientes de garrapatas resistentes, presentaron una sustitución en el aminoácido 103 de arginina a lisina.

Todas las secuencias previamente alineadas fueron ingresadas a un matriz de distancias, donde cada secuencia fue comparada contra las demás. Se generó con ella un mapa de calor para visualizar la similitud entre las secuencias de forma gráfica y posteriormente realizar un árbol filogenético para la identificación de grupos de secuencias, representado en la Figura 14 (B). En el árbol se observan a las secuencias resistentes y susceptibles de forma intercalada.

Al analizar el alineamiento de las secuencias de proteínas con la prueba estadística exacta de Fisher se formuló la siguiente tabla 7 de datos. Con este análisis se buscó identificar si el número de secuencias de garrapatas resistentes o susceptibles difiere dependiendo del número de

secuencias con el aminoácido 103 R y 103K. Se obtuvo en el análisis un valor de P de .1429, lo cual nos dice que no existe una dependencia entre las variables antes mencionadas.

Tabla 8: Tabla de contingencia de la prueba Fisher secuencias aminoácidos

	Secuencias resistentes	Secuencias Susceptibles	Total
103 K	0	2	2
103 R	9	4	13
total	9	6	15
Valor de P obtenido	0.1419		Coefficiente phi : 0.48

Tabla de contingencias de los datos de secuencias resistentes y susceptibles y resultados de la prueba Fisher. Se anotan los valores de P y del coeficiente de phi obtenidos de la prueba Fisher.

Dirección General de Bibliotecas UJAQ

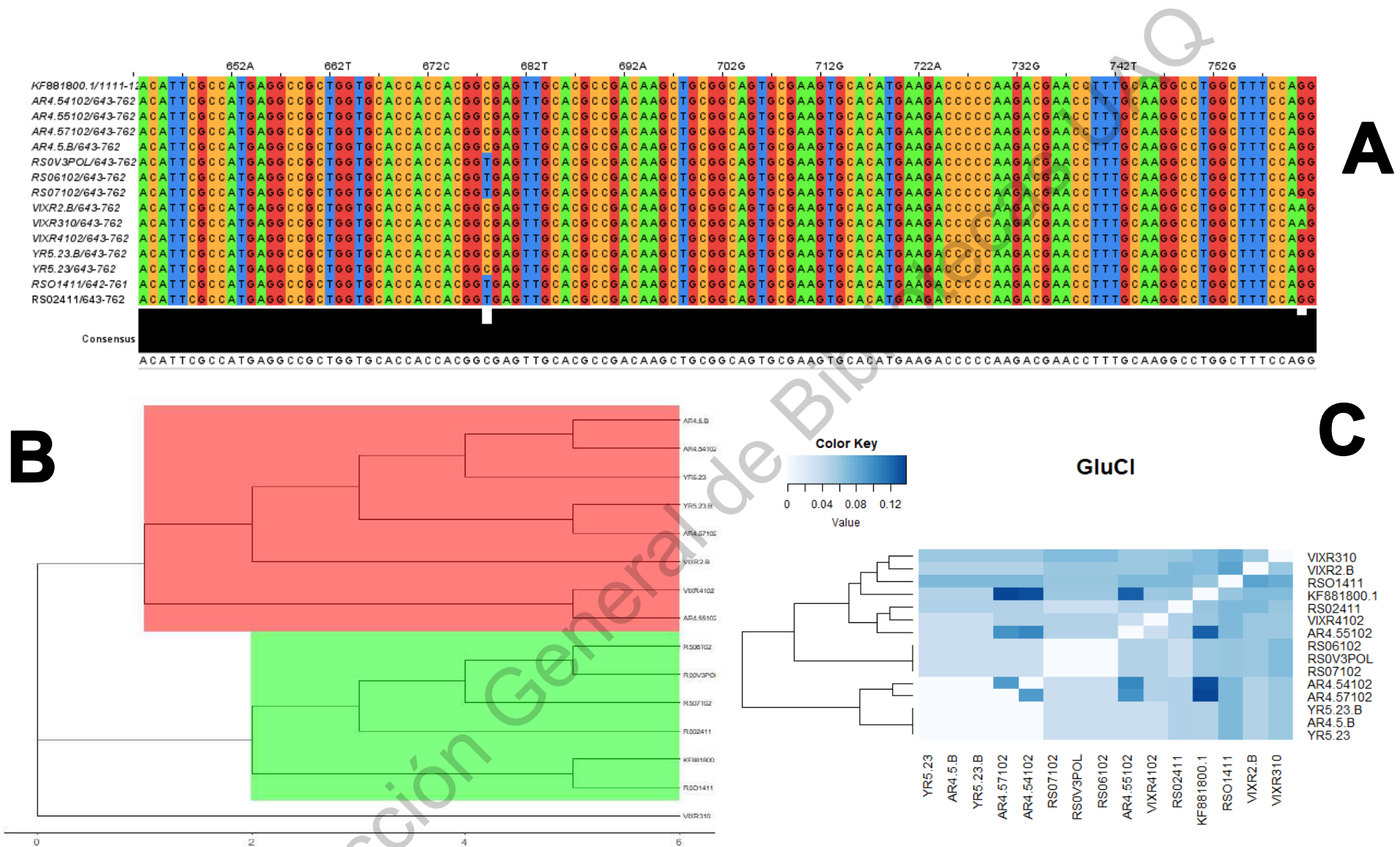


Figura 13: Graficas del análisis bioinformático de las secuencias de nucleótidos: Alineamiento parcial de las secuencias obtenidas en la amplificación por PCR con los cebadores Glu870. Se muestra la secuencia consenso generada en el programa de libre acceso Jalview(A). El árbol filogenético de las secuencias analizadas, en color rojo están el clado de secuencias provenientes de garrapatas resistentes y en verde de susceptibles a ivermectina (B) Histograma de la matriz de identidad de las secuencias analizadas(C).

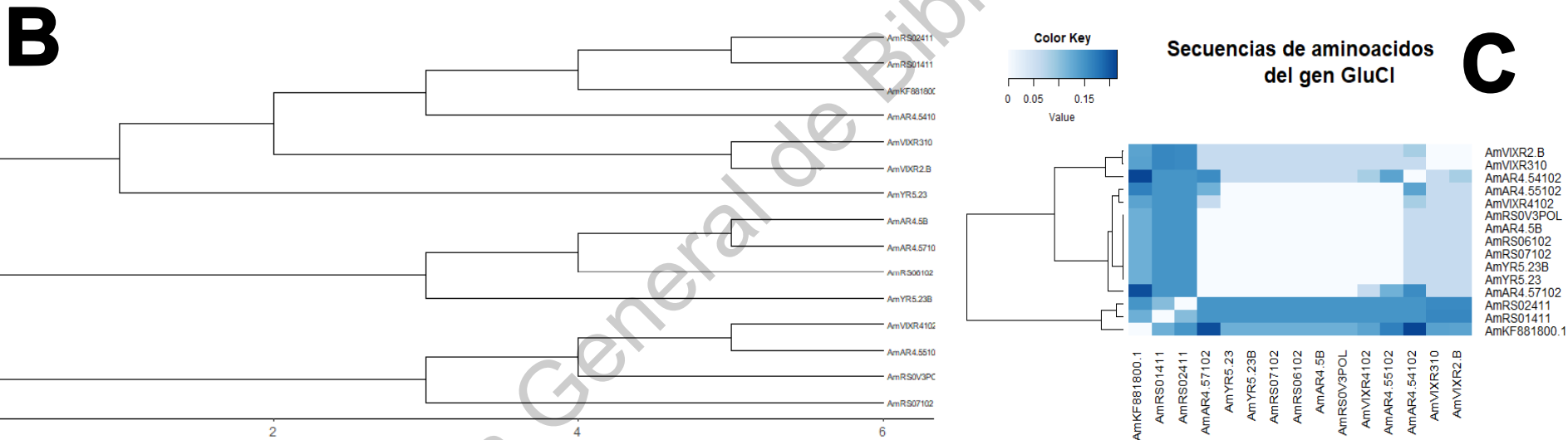
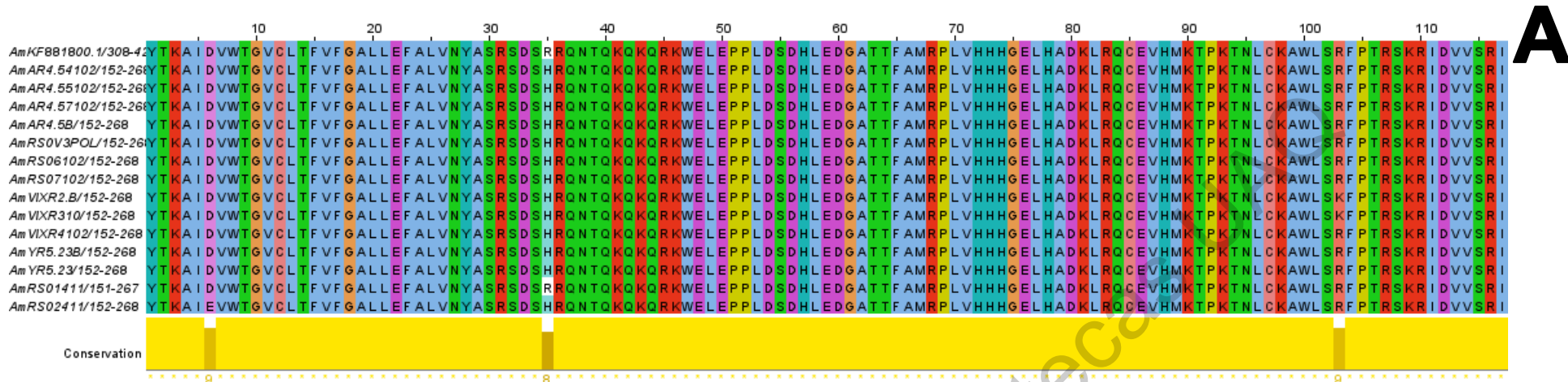


Figura 14: Graficas del análisis bioinformático de las secuencias de aminoácidos: Alineamiento parcial de las secuencias de aminoácidos traducidas *insilico* en el programa GENTle(A). El árbol filogenético de las secuencias de aminoácidos analizados (B). Histograma de la matriz de identidad de las secuencias analizadas(C).En el canal de sodio dependiente de voltaje, el cambio F1538I en el dominio III del S6 les confiere a *R. microplus* resistencia a los piretroides (Guerrero et al., 2001).

7 Discusión

R. microplus es un ectoparásito cuyo impacto, en el sector ganadero, se incrementa cuando se presentan cepas resistentes a acaricida, ya que la infestación de los hatos provoca pérdidas de peso en los animales y un incremento de casos de enfermedades como anaplasmosis y babesiosis. Además de la inversión económica, al adquirir un nuevo acaricida efectivo. En México ya se han reportado casos de cepas resistentes a la ivermectina en Yucatán, Veracruz y Chiapas. (Fernández-Salas et al., 2012; R. I. Rodríguez-Vivas et al., 2014). Las fallas en el control de la garrapata mediante el uso de acaricidas genera la necesidad de conocer el origen de la resistencia, con el propósito de poder modificar su causa y así evitarlo o si es posible revertirla.

Es por eso que en el presente trabajo nuestro objetivo fue establecer si hay una correlación entre las modificaciones genéticas en el gen *glucl* en *R. microplus* y los diferentes grados de resistencia a ivermectina para el cual, se obtuvieron 14 secuencias del gen *GlucI* de garrapatas *R. microplus* resistentes y susceptibles a la lactona macrocíclica ivermectina. Las garrapatas utilizadas en este proyecto provinieron de un estudio anterior, donde se utilizó una cepa de laboratorio de garrapatas y se presionó con subdosis letales de ivermectina hasta obtener una cepa resistente (García, 2019). Se analizaron 9 secuencias provenientes de garrapatas resistentes y 5 de garrapatas susceptibles

Se encontró un polimorfismo en el gen que codifica para el canal de cloro dependiente de glutamato de las garrapatas resistentes, en el nucleótido 1146 por la sustitución de timina a citosina. El algoritmo MUSCLE fue utilizado para alinear estas secuencias de nucleótidos. La sustitución se encontró en las muestras de garrapatas con índice de resistencia de 2 .1 en adelante. Al aplicar la prueba exacta de Fisher obtuvimos un valor de *P* de 0.001998 y un coeficiente de Phi de .866. Con las secuencias obtenidas se hizo una matriz de identidad usando el método de reconstrucción neighbour-joinig y en el árbol filogenético resultante se observa una clara divergencia entre los grupos de secuencias, separando a las resistentes de las susceptibles. Por lo tanto los diferentes grados de resistencia a ivermectina en *R. microplus*, se lograron asociar a una modificación genética en el gen que codifica para el canal de cloro dependiente de glutamato.

Existen estudios anteriores en donde han tratado de relacionar polimorfismos con la resistencia a ivermectina. Rodríguez Vivas y colaboradores en el 2016 compararon tres secuencias amplificadas a partir de la secuencia GU562859.1 (número de identificación del NCBI) del gen *glucl a*: una cepa mexicana susceptible, una cepa mexicana resistente con origen en Veracruz y una cepa brasileña resistente reportada en el trabajo de Klafke y colaboradores en el 2010. Al realizar el alineamiento no se encontró diferencia alguna entre las cepas mexicanas, pero en la brasileña se observaron dos polimorfismos, en los nucleótidos 982 y 1012 ambos de citosina a timina comparándolos con las cepas mexicanas y la secuencia del gen completo KF881800.1. Estas sustituciones de nucleótidos no se observan en nuestras muestras de garrapatas resistentes y susceptibles. Lo cual señala que puede existir más de una modificación en el gen *glucl* que confiera resistencia a la ivermectina.

La obtención de las secuencias de aminoácidos fue a través del programa de libre acceso GENTle. Se utilizó la secuencia KF881800.1 como referencia para obtener el marco de lectura. Las secuencias de aminoácidos traducidas *insilico* fueron alineadas con el algoritmo MUSCLE pero no se encontró sustitución de aminoácidos a lo largo de las secuencias. Lo cual indica que la

sustitución en el nucleótido 1146 resulto en una sustitución sinónima. Especulamos que no hay cambios en la proteína GluCl de garrapatas resistentes comparándola con la proteína GluCl de garrapatas susceptibles a ivermectina. Este resultado podría disminuir la posibilidad de una resistencia por insensibilización de la proteína diana. Lo cual abre la idea de una resistencia metabólica.

García y colaboradores en el 2019 generaron la cepa resistente de garrapatas que utilizamos en nuestro estudio. Ellos reportan una reducción en el promedio del tamaño (peso total) de forma significativa en las garrapatas resistentes en comparación de las susceptibles. De la misma manera el número de huevos viables fue menor en garrapatas resistentes aunque el valor de ovoposición no tuvo diferencias entre ambas cepas. Un signo de toxicidad de la ivermectina en hembras grávidas es la disminución en la ovoposición (Klafke et al., 2010) por lo tanto la reducción del tamaño y el número de huevos viables podría ser explicado a través de un mecanismo de desvío de recursos para la sobreexpresión de proteínas con funciones de detoxificación en las garrapatas resistentes y no directamente a causa de una intoxicación por el acaricida

Pohl y colaboradores en el 2011 utilizaron inhibidores de proteínas de transporte como la ciclosporina A y MK571 en garrapatas resistentes, describiendo un incremento en la mortalidad en garrapatas resistentes al combinar los inhibidores de transportadores ABC y la ivermectina. Con la ayuda de la técnica qPCR, ellos describen un aumento en la expresión del transportador ABCB10 en huevos de garrapatas resistentes en comparación de los huevos de garrapatas susceptibles. La función de ABCB10 es bombear moléculas de ivermectina fuera de la célula evitando altas concentraciones dentro de la célula. Cabe mencionar que la mortalidad de las garrapatas resistentes al aplicar los inhibidores de los ABC no se iguala a la de la población susceptible al acaricida. Lo cual sugiere la participación de más mecanismos en la resistencia a ivermectina.

Las cepas silvestres de garrapatas resistentes reportadas por Perez-Cogollo et al 2010 y Fernández-Salas et al 2012 eran procedentes de ranchos, donde el uso de la ivermectina para control de la plaga era de uso recurrente, cuatro o más veces al año y su aplicación comenzó cinco años antes de presentarse garrapatas resistentes. En Brasil los investigadores Martins y Furlong 2001 y Klafk et al 2006 reportan casos similares, donde el uso del acaricida comenzó cinco años antes del inicio de la resistencia. Esta información es similar con otros tipos de acaricidas, los organofosforados fueron utilizados 10 años antes del primer caso de resistencia, los piretroides estuvieron en uso por 5 años hasta que aparecieron reportes de pérdida de eficacia. La recurrencia en la resistencia a los distintos acaricidas, podría ser explicada a través de la teoría del reloj molecular. Donde se postula que cada gen tiene su propia tasa de mutación y que esta se ve modificada por las características propias del organismo en el que se evalúe la resistencia, como es el número de generaciones por año, el tipo de metabolismo y edad de apareamiento del parásito. Induciendo una frecuencia de mutaciones distinta en el tiempo.

En nuestro estudio se analizaron las muestras de garrapatas con diferentes índices de resistencia, comenzando desde el 2.1 hasta el 5.2. En ninguna se observó alguna mutación no sinónima. El tiempo que nuestra cepa fue presionada con ivermectina fue de dos años. La cepa resistente de Brasil presionada por Klafke y colaboradores en el 2010 requirió ocho generaciones para alcanzar el índice de 8.4 y se observa una mutación no sinónima en el nucleótido 982. La substitución es en el aminoácido 338 de una arginina a un triptófano. Es posible que la cepa de nuestro estudio requiera más generaciones siendo presionada con ivermectina para que presente mutaciones no sinónimas en la secuencia del gen que codifica para el canal de cloro dependiente de glutamato.

8 Conclusión

En el presente estudio se analizaron 14 muestras de garrapatas con distintos grados de resistencia a la ivermectina. En todas las muestras con un índice de resistencia entre 2.1 a 5.4 encontramos un polimorfismo en el nucleótido 1146 del gen que codifica para el canal de cloro dependiente de glutamato. La mutación fue una transversión de timina a citosina. Con un valor estadístico de P de 0.0019 logramos asociar la presencia de la modificación genética T1146C en el gen *glucl* a la resistencia a ivermectina en garrapatas *R.microplus*. Al realizar análisis *insilico* no encontramos sustituciones de aminoácidos entre las secuencias de garrapatas resistentes y las susceptibles.

Dirección General de Bibliotecas

Bibliografía

- Althoff, T., Hibbs, R.E., Banerjee, S., Gouaux, E., 2014. X-ray structures of GluCl in apo states reveal a gating mechanism of Cys-loop receptors. *Nature* 512, 333–337. <https://doi.org/10.1038/nature13669>
- Amanzougaghene, N., Fenollar, F., Diatta, G., Sokhna, C., Raoult, D., Mediannikov, O., 2018. Mutations in GluCl associated with field ivermectin-resistant head lice from Senegal. *Int. J. Antimicrob. Agents* 52, 593–598. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.07.005>
- Biology of Ticks Volume 1, Second Edition, New to this Edition: ed, 2013. . Oxford University Press, Oxford, New York.
- Boulanger, N., Boyer, P., Talagrand-Reboul, E., Hansmann, Y., 2019. Ticks and tick-borne diseases. *Med. Mal. Infect.* 49, 87–97. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2019.01.007>
- Bourguinat, C., Keller, K., Blagburn, B., Schenker, R., Geary, T.G., Prichard, R.K., 2011. Correlation between loss of efficacy of macrocyclic lactone heartworm anthelmintics and P-glycoprotein genotype. *Vet. Parasitol., Heartworm Disease: Challenges in a Changing World American Heartworm Society's Selected Papers Presented at the 13th Triennial STATE OF THE HEARTWORM Symposium 2010* 176, 374–381. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.01.024>
- Burgess, E.C., Wachal, M.D., Cleven, T.D., 1993. *Borrelia burgdorferi* infection in dairy cows, rodents, and birds from four Wisconsin dairy farms. *Vet. Microbiol.* 35, 61–77. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(93\)90116-o](https://doi.org/10.1016/0378-1135(93)90116-o)
- Büscher, G., 1988. The infection of various tick species with *Babesia bigemina*, its transmission and identification. *Parasitol. Res.* 74, 324–330. <https://doi.org/10.1007/bf00539453>
- Campbell, W.C., 1981. An Introduction to the Avermectins. *N. Z. Vet. J.* 29, 174–178. <https://doi.org/10.1080/00480169.1981.34836>
- Chen, I.-S., Kubo, Y., 2018. Ivermectin and its target molecules: shared and unique modulation mechanisms of ion channels and receptors by ivermectin. *J. Physiol.* <https://doi.org/10.1113/JP275236>
- Chrustek, A., Holyńska-Iwan, I., Dziembowska, I., Bogusiewicz, J., Wróblewski, M., Cwynar, A., Olszewska-Słonina, D., 2018. Current Research on the Safety of Pyrethroids Used as Insecticides. *Medicina (Mex.)* 54. <https://doi.org/10.3390/medicina54040061>
- 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. <https://doi.org/10.1038/371707a0>
- de Castro, J.J., 1997. Sustainable tick and tickborne disease control in livestock improvement in developing countries. *Vet. Parasitol., Plenary Papers of the 16th International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology* 71, 77–97. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(97\)00033-2](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(97)00033-2)
- Dent, J.A., Davis, M.W., Avery, L., 1997. *avr-15* encodes a chloride channel subunit that mediates inhibitory glutamatergic neurotransmission and ivermectin sensitivity in *Caenorhabditis elegans*. *EMBO J.* 16, 5867–5879. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.19.5867>
- Dermauw, W., Ilias, A., Riga, M., Tsagkarakou, A., Grbić, M., Tirry, L., Van Leeuwen, T., Vontas, J., 2012. The cys-loop ligand-gated ion channel gene family of *Tetranychus urticae*: implications for acaricide toxicology and a novel mutation associated with abamectin resistance. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 42, 455–465. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2012.03.002>
- Drummond, R.O., Ernst, S.E., Trevino, J.L., Gladney, W.J., Graham, O.H., 1973. *Boophilus annulatus* and *B. microplus*: laboratory tests of insecticides. *J. Econ. Entomol.* 66, 130–133. <https://doi.org/10.1093/jee/66.1.130>
- Ehounoud, C.B., Yao, K.P., Dahmani, M., Achi, Y.L., Amanzougaghene, N., Kacou N'Douba, A., N'Guessan, J.D., Raoult, D., Fenollar, F., Mediannikov, O., 2016. Multiple Pathogens Including Potential New Species in Tick Vectors in Côte d'Ivoire. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10, e0004367. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004367>

- Etter, A., Cully, D.F., Schaeffer, J.M., Liu, K.K., Arena, J.P., 1996. An amino acid substitution in the pore region of a glutamate-gated chloride channel enables the coupling of ligand binding to channel gating. *J. Biol. Chem.* 271, 16035–16039. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.27.16035>
- Fernández-Salas, A., Rodríguez-Vivas, R.I., Alonso-Díaz, M.A., Basurto-Camberos, H., 2012. Ivermectin resistance status and factors associated in *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) populations from Veracruz, Mexico. *Vet. Parasitol.* 190, 210–215. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.06.003>
- Fuse, T., Kita, T., Nakata, Y., Ozoe, F., Ozoe, Y., 2016. Electrophysiological characterization of ivermectin triple actions on *Musca* chloride channels gated by l-glutamic acid and γ -aminobutyric acid. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 77, 78–86. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2016.08.005>
- García, J.R.M., 2019. Determinación del grado de infección por *Babesia bigemina* en garrapatas *Rhipicephalus microplus* resistentes y susceptibles a ivermectina.
- Gassel, M., Wolf, C., Noack, S., Williams, H., Ilg, T., 2014. The novel isoxazoline ectoparasiticide fluralaner: selective inhibition of arthropod γ -aminobutyric acid- and L-glutamate-gated chloride channels and insecticidal/acaricidal activity. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 45, 111–124. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2013.11.009>
- 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 Suppl, S353-366. <https://doi.org/10.1017/s0031182003004682>
- Ghafar, A., Cabezas-Cruz, A., Galon, C., Obregon, D., Gasser, R.B., Moutailler, S., Jabbar, A., 2020. Bovine ticks harbour a diverse array of microorganisms in Pakistan. *Parasit. Vectors* 13, 1. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3862-4>
- González Canga, A., Sahagún Prieto, A.M., Díez Liébana, M.J., Fernández Martínez, N., Sierra Vega, M., García Vieitez, J.J., 2008. The Pharmacokinetics and Interactions of Ivermectin in Humans—A Mini-review. *AAPS J.* 10, 42–46. <https://doi.org/10.1208/s12248-007-9000-9>
- Guerrero, F.D., Bendele, K.G., Davey, R.B., George, J.E., 2007. Detection of *Babesia bigemina* infection in strains of *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* collected from outbreaks in south Texas. *Vet. Parasitol.* 145, 156–163. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.11.014>
- 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, 558–561. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.1076>
- Hernandez, R., Guerrero, F.D., George, J.E., Wagner, G.G., 2002. Allele frequency and gene expression of a putative carboxylesterase-encoding gene in a pyrethroid resistant strain of the tick *Boophilus microplus*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32, 1009–1016.
- Hibbs, R.E., Gouaux, E., 2011. Principles of activation and permeation in an anion-selective Cys-loop receptor. *Nature* 474, 54–60. <https://doi.org/10.1038/nature10139>
- Hille, B., 2001. Ion Channels of Excitable Membranes, *Ion Channels of Excitable Membranes*.
- Holland, I.B., A. Blight, M., 1999. ABC-ATPases, adaptable energy generators fuelling transmembrane movement of a variety of molecules in organisms from bacteria to humans. *J. Mol. Biol.* 293, 381–399. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.2993>
- Jonsson, N.N., Miller, R.J., Robertson, J.L., 2007. Critical evaluation of the modified-adult immersion test with discriminating dose bioassay for *Boophilus microplus* using American and Australian isolates. *Vet. Parasitol.* 146, 307–315. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.02.031>
- Kane, N.S., Hirschberg, B., Qian, S., Hunt, D., Thomas, B., Brochu, R., Ludmerer, S.W., Zheng, Y., Smith, M., Arena, J.P., Cohen, C.J., Schmatz, D., Warmke, J., Cully, D.F., 2000. Drug-resistant *Drosophila* indicate glutamate-gated chloride channels are targets for the antiparasitics nodulisporic acid and ivermectin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 13949–13954. <https://doi.org/10.1073/pnas.240464697>
- Klafke, G.M., de Albuquerque, T.A., Miller, R.J., Schumaker, T.T.S., 2010. Selection of an ivermectin-resistant strain of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) in Brazil. *Vet. Parasitol.* 168, 97–104. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.10.003>

- Klafke, G.M., Sabatini, G.A., de Albuquerque, T.A., Martins, J.R., Kemp, D.H., Miller, R.J., Schumaker, T.T.S., 2006. Larval immersion tests with ivermectin in populations of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) from State of Sao Paulo, Brazil. *Vet. Parasitol.* 142, 386–390. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.07.001>
- 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, 583–591. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2010.01017.x>
- Laing, R., Gillan, V., Devaney, E., 2017. Ivermectin – Old Drug, New Tricks? *Trends Parasitol.* 33, 463–472. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2017.02.004>
- Lees, K., Bowman, A.S., 2007. Tick neurobiology: recent advances and the post-genomic era. *Invertebr. Neurosci.* IN 7, 183–198. <https://doi.org/10.1007/s10158-007-0060-4>
- Li, B.W., Rush, A.C., Weil, G.J., 2014. High level expression of a glutamate-gated chloride channel gene in reproductive tissues of *Brugia malayi* may explain the sterilizing effect of ivermectin on filarial worms. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* 4, 71–76. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2014.01.002>
- Lynagh, T., Pless, S.A., 2014. Principles of agonist recognition in Cys-loop receptors. *Front. Physiol.* 5. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00160>
- Martins, J.R., Furlong, J., 2001. Avermectin resistance of the cattle tick *Boophilus microplus* in Brazil. *Vet. Rec.* 149, 64.
- Mbati, P.A., Hlatshwayo, M., Mtshali, M.S., Mogaswane, K.R., De Waal, T.D., Dipeolu, O.O., 2002. Ticks and tick-borne diseases of livestock belonging to resource-poor farmers in the eastern Free State of South Africa. *Exp. Appl. Acarol.* 28, 217–224. <https://doi.org/10.1023/a:1025306701803>
- 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, 1347–1355. <https://doi.org/10.1124/mol.108.053363>
- Miranpuri, G.S., 1988. Ticks parasitising the Indian buffalo (*Bubalus bubalis*) and their possible role in disease transmission. *Vet. Parasitol.* 27, 357–362. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(88\)90050-7](https://doi.org/10.1016/0304-4017(88)90050-7)
- Oakeshott, J.G., Home, I., Sutherland, T.D., Russell, R.J., 2003. The genomics of insecticide resistance. *Genome Biol.* 4, 202.
- Perez-Cogollo, L.C., Rodríguez-Vivas, R.I., Ramirez-Cruz, G.T., Miller, R.J., 2010. First report of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* resistant to ivermectin in Mexico. *Vet. Parasitol.* 168, 165–169. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.10.021>
- Pohl, P.C., Klafke, G.M., Carvalho, D.D., Martins, J.R., Daffre, S., da Silva Vaz, I., Masuda, A., 2011. ABC transporter efflux pumps: A defense mechanism against ivermectin in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Int. J. Parasitol.* 41, 1323–1333. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2011.08.004>
- Porto Neto, L.R., Jonsson, N.N., D’Occhio, M.J., Barendse, W., 2011. Molecular genetic approaches for identifying the basis of variation in resistance to tick infestation in cattle. *Vet. Parasitol.* 180, 165–172. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.05.048>
- Rodríguez-Vivas, R.I., Arieta-Román, R.J., Pérez-Cogollo, L.C., Rosado-Aguilar, J.A., Ramírez-Cruz, G.T., Basto-Estrella, G., 2010. Uso de lactonas macrocíclicas para el control de la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en el ganado bovino. *Arch. Med. Vet.* 42, 115–123. <https://doi.org/10.4067/S0301-732X2010000300002>
- Rodríguez-Vivas, R.I., Grisi, L., Pérez de León, A.A., Villela, H.S., Torres-Acosta, J.F. de J., Fragoso Sánchez, H., Romero Salas, D., Rosario Cruz, R., Saldierna, F., García Carrasco, D., Rodríguez-Vivas, R.I., Grisi, L., Pérez de León, A.A., Villela, H.S., Torres-Acosta, J.F. de J., Fragoso Sánchez, H., Romero Salas, D., Rosario Cruz, R., Saldierna, F., García Carrasco, D., 2017. Evaluación del impacto económico potencial de los parásitos del ganado bovino en México. *Revisión. Rev. Mex. Cienc. Pecu.* 8, 61–74. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v8i1.4305>

- Rodríguez-Vivas, R.I., Hodgkinson, J.E., Trees, A.J., 2012. Resistencia a los acaricidas en *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: situación actual y mecanismos de resistencia. *Rev. Mex. Cienc. Pecu.* 3, 9–24.
- Rodríguez-Vivas, R.I., Jonsson, N.N., Bhushan, C., 2018. Strategies for the control of *Rhipicephalus microplus* ticks in a world of conventional acaricide and macrocyclic lactone resistance. *Parasitol. Res.* 117, 3–29. <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5677-6>
- Rodríguez-Vivas, R. I., Miller, R.J., Ojeda-Chi, M.M., Rosado-Aguilar, J.A., Trinidad-Martínez, I.C., Pérez de León, A.A., 2014. Acaricide and ivermectin resistance in a field population of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) collected from red deer (*Cervus elaphus*) in the Mexican tropics. *Vet. Parasitol.* 200, 179–188. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.11.025>
- Rodríguez-Vivas, Róger Iván, Pérez-Cogollo, L.C., Rosado-Aguilar, J.A., Ojeda-Chi, M.M., Trinidad-Martínez, I., Miller, R.J., Li, A.Y., de León, A.P., Guerrero, F., Klafke, G., 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., de León, A.P., Guerrero, F., Klafke, G., 2014. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* resistant to acaricides and ivermectin in cattle farms of Mexico. *Rev. Bras. Parasitol. Veterinária* 23, 113–122. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612014044>
- Sabatini, G.A., Kemp, D.H., Hughes, S., Nari, A., Hansen, J., 2001. Tests to determine LC50 and discriminating doses for macrocyclic lactones against the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Vet. Parasitol.* 95, 53–62. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(00\)00406-4](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(00)00406-4)
- Schumaker, T.T.S., n.d. Applicability of in vitro bioassays for the diagnosis of ivermectin resistance in *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae).
- Solorio-Rivera, J.L., Rodríguez-Vivas, R.I., 1997. Epidemiología de la babesiosis bovina. II. Indicadores epidemiológicos y elementos para el diseño de estrategias de control. 8, 11.
- Tan, J., Liu, Z., Wang, R., Huang, Z.Y., Chen, A.C., Gurevitz, M., Dong, K., 2005. Identification of amino acid residues in the insect sodium channel critical for pyrethroid binding. *Mol. Pharmacol.* 67, 513–522. <https://doi.org/10.1124/mol.104.006205>
- Taylor, M.A., 2001. Recent developments in ectoparasiticides. *Vet. J. Lond. Engl.* 1997 161, 253–268. <https://doi.org/10.1053/tvjl.2000.0549>
- Wang, X., Wang, R., Yang, Y., Wu, S., O'Reilly, A.O., Wu, Y., 2016. A point mutation in the glutamate-gated chloride channel of *Plutella xylostella* is associated with resistance to abamectin. *Insect Mol. Biol.* 25, 116–125. <https://doi.org/10.1111/imb.12204>
- Wolstenholme, A.J., 2012. Glutamate-gated Chloride Channels. *J. Biol. Chem.* 287, 40232–40238. <https://doi.org/10.1074/jbc.R112.406280>
- Wolstenholme, A.J., Rogers, A.T., 2005. Glutamate-gated chloride channels and the mode of action of the avermectin/milbemycin anthelmintics. *Parasitology* 131 Suppl, S85-95. <https://doi.org/10.1017/S0031182005008218>
- Ybañez, A.P., Sivakumar, T., Ybañez, R.H.D., Ratilla, J.C., Perez, Z.O., Gabotero, S.R., Hakimi, H., Kawazu, S., Matsumoto, K., Yokoyama, N., Inokuma, H., 2013. First molecular characterization of *Anaplasma marginale* in cattle and *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks in Cebu, Philippines. *J. Vet. Med. Sci.* 75, 27–36. <https://doi.org/10.1292/jvms.12-0268>