

Detección de resistencia a los acaricidas en la garrapata del ganado *Boophilus microplus* mediante análisis de zimogramas (Acaricide resistance detection in the cattle tick *Boophilus microplus* by zymograms analysis).



Miranda, Miranda, Estefan: Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria (CENID-PAVET) del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Apartado postal 206 Civac, Morelos. México C.P.62550.
miranda.estefhan@inifap.gob.mx.



Osorio, Miranda Jorge: Centro Nacional de Servicios de constatación en Salud Animal Carretera Federal Cuernavaca-Cuautla Km. 11.5 Colonia Progreso. Jiutepec Morelos C.P. 62550. jualu_osorio@yahoo.com | **Cossío, Bayúgar, Raquel:** CENID-PAVET. INIFAP. Apartado postal 206 Civac, Morelos. México C.P.62550. cossio.raquel@inifap.gob.mx

Nota: Ver curriculum de los autores al final del artículo

Resumen

La identificación de resistencia a los productos acaricidas en la garrapata *B. microplus*, se hace mediante un complicado bioensayo, que requiere garrapatas de referencia y de campo cultivadas sobre bovinos vivos y restringidos durante semanas. Con el fin de evaluar una posible alternativa diagnóstica, se hicieron ensayos enzimáticos en geles de poliacrilamida-SDS, usando extractos de larvas de garrapatas provenientes de cuatro cepas de referencia con diferentes niveles de resistencia y susceptibilidad a productos acaricidas. Los ensayos que se diseñaron para detectar las enzimas esterasa, fosfodiesterasa, glutatión peroxidasa y catalasa, fueron procesados como zimogramas en imágenes digitalizadas, a partir de las cuales se obtuvieron sus respectivos densitogramas, valorando las movilidades electroforéticas relativas (Rf), así como las diferentes masas moleculares (MM) en miles de Daltons (kDa) y actividades enzimáticas específicas (AEE). Se identificó una elevada actividad de esterasa en posición Rf 0.52 con una MM de 47 kDa en las cepas resistentes, con un incremento en AEE del 317 % cuando se compara con las garrapatas susceptibles a los acaricidas. También se identificó una fosfodiesterasa en Rf. 0.1 con MM de 130 kDa presente en las cepas resistentes, con un incremento de AEE del 340% con respecto al nivel basal de la cepa susceptible. Se concluyó que estos ensayos enzimáticos pueden ser utilizados como indicadores de resistencia a los acaricidas en poblaciones de garrapatas aisladas de campo, constituyendo un procedimiento rápido, eficaz y económico, como alternativa al complicado bioensayo actualmente utilizado.

Palabras Clave: Resistencia | Acaricidas | Zimogramas | Densitogramas | Electroforesis | Esterasa | Fosfodiesterasa | Glutatión-Peroxidasa | Catalasa.

Abstract

Acaricide resistance detection in the cattle tick *Boophilus microplus*, is achieved by a complex bioassay which requires reference strains of ticks as well as field isolated ticks, cultured on living cattle restrained for weeks. In order to assess an alternate diagnostics procedure, enzymatic assays were performed on SDS polyacrylamide gels, using tick extracts from four reference strains with variable levels of resistance and susceptibility to acaricide products. Enzyme assays were designed for detection of esterase, phosphodiesterase, glutathion peroxidase and catalase. Zymograms were processed as digital images obtaining their respective densitograms as well as Relative Electrophoretic Motility (Rf.), Molecular Mass(MM) in thousands of Daltons (kDa), as well as Enzyme Specific Activity (ESA). An increase in esterase activity was located at Rf. 0.52 with a MM of 47 kDa in all resistant strains with an increment of 317% when compared to the sensitive strain. A phosphodiesterase was also identified at Rf. 0.1 with a MM of 130 kDa, found only in resistant strains, with a ESA increase of 340% with respect to sensitive basal. We conclude that this enzymes assays may be use as acaricide resistance markers in field isolated ticks, as a fast, accurate and economical procedure, as alternative to the complex bioassay currently used.

Key words: Resistance | Acaricides | Zymograms | Densitograms | Electrophoresis | Esterase | Phosphodiesterase | Glutathion-Peroxidase | Catalase.

Introducción

La identificación de enzimas en geles de poliacrilamida implica la localización visual de enzimas mediante su actividad específica sobre un substrato posterior a su separación electroforética, esta metodología permite la separación de los componentes proteicos mediante carga y/o masa molecular de manera tal que es posible identificar una población heterogénea de enzimas en una gran variedad de muestras biológicas. En 1957 Hunter y Markert aplicaron por primera vez metodologías histoquímicas en geles de almidón conteniendo muestras biológicas con el fin de identificar zonas electroforéticas con actividad de esterasa, fueron ellos quienes acuñaron el término zimograma para definir el despliegue visual de una población de enzimas presentes en una muestra biológica, término válido hasta la actualidad. En 1959 Markert y Moller introdujeron el concepto de isozima para designar diferentes formas moleculares de la misma enzima en muestras de un mismo individuo o en diferentes miembros de la misma especie sentando las bases de procedimientos que en las últimas décadas se utilizan para una gran variedad de propósitos diagnósticos. Actualmente las técnicas zimográficas son valiosas para determinar las diferencias génicas en organismos de una misma especie que difieren en comportamiento y/o propiedades fenotípicas (Manchenko, 1994). El fenómeno de la resistencia a los pesticidas de los artrópodos constituye un problema en el cual es necesario identificar individuos dentro de una misma especie con sutiles variaciones genéticas que los hacen resistentes a los tratamientos químicos. Uno de los problemas ha sido la dificultad de identificar de manera rápida y eficaz aquellos artrópodos que constituyen plagas agropecuarias, capaces de tolerar las formulaciones comerciales. La garrapata del ganado

Boophilus microplus es uno de tales casos que actualmente presenta resistencia para formulaciones comerciales basadas en organofosforados, piretroides, organoclorados y amidinas (Foil *et al.*, 2004) lo que ha dificultado su control y el control de las enfermedades del ganado bovino transmitidas por esta garrapata. Con el fin de optimizar el uso de los acaricidas, ha sido necesario diseñar complicados ensayos para identificar los niveles de resistencia a los diferentes químicos, estos ensayos implican el cultivo de garrapatas aisladas de las explotaciones pecuarias, junto con cepas de referencia de garrapatas tanto susceptibles como resistentes a los diferentes productos (Stone, 1972). Esto hace que cada ensayo requiera de semanas de espera así como altos costos de operación. Algunas alternativas a este problema la constituyen las técnicas zimográficas, que han demostrado ser muy útiles en la masificación del ensayo de detección de resistencia a los pesticidas en otros artrópodos, y actualmente se aplican exitosamente en la identificación de cepas resistentes del áfido parásito de plantas *Myzus persicae*, (Field y Foster, 2002), el mosquito hematófago *Culex pipiens* (Karunaratne y Heminway, 2001) y en cierta medida en *B. microplus* (Miranda *et al.*, 1995; Rosario-Cruz *et al.*, 1997; Jamroz *et al.*, 2000). Estos ensayos se basan principalmente en el análisis de zimogramas de esterasas, enzimas que han demostrado participar activamente en el fenómeno de la resistencia en los mencionados artrópodos, no obstante en estos trabajos no se ha aprovechado la tecnología de análisis imágenes digitalizadas por medio de densitogramas y en el caso de *B. microplus* no se han trabajado con suficiencia aquellos zimogramas relacionados con enzimas tales como fosfodiesterasa, catalasa, glutatión peroxidasa, todas ellas con potencial participación en el fenómeno de resistencia y/o diferenciación zimográfica de cepas resistentes de sensibles. En este trabajo se pretende implementar un procedimiento de diferenciación de cepas resistentes y sensibles a las formulaciones de acaricidas del mercado de la garrapata del ganado *B. microplus*. El procedimiento consiste en la elaboración de zimogramas de las mencionadas enzimas en extractos de larvas de garrapatas separados electroforéticamente en gel de poliacrilamida, con un análisis adicional por medio de densitometría comparativa entre cepas sensibles y resistentes de garrapatas.

Material y Métodos

Cepas de garrapatas.

Se utilizaron cepas de referencia de la garrapata *B. microplus* cultivadas en el Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal (CENAPA) ubicadas en Jiutepec, Morelos, México. Se utilizaron cuatro cepas mexicanas de garrapatas las cuales fueron identificadas y seleccionadas por su resistencia y/o susceptibilidad a los productos acaricidas organofosforados, piretroides y amidinas de acuerdo al método reportado por Stone (1972), cuyas características se describen en la Tabla 1.

Extractos.

Se utilizaron larvas de cada cepa que fueron pesados en lotes de 100 mg y macerados en 1ml de Solución Salina Amortiguadora de Fosfatos pH 7.2 (SSAF). El extracto fue centrifugado a 14,000 g durante 5 minutos y al sobrenadante se le determinó el contenido proteico acorde al método descrito por Bradford (1976). Los extractos así obtenidos fueron almacenados en alícuotas de 50 µl a -20°C.

Tabla 1. Factores de resistencia detectados en las cepas de *Boophilus microplus* analizadas en este estudio

Factores de Resistencia ^a							
	Organofosforados				Piretroides		Amidinas
CEPAS	Chlorfenvinphos	Coumaphos	Diazinón	Clorpirifos	Cipermetrina	Deltametrina	Amitraz
Susceptible	0	0	0	0	0	0	0
Tuxpan	10	4	11	2	0	0	NSH
Mora	DAPC	5.05	8.6	2.94	118.7	104	NSH
San Alfonso	1.52	2.07	6.96	NSH	DAPC	DAPC	41.99

a Factor de resistencia equivale a LC50 (concentración letal necesaria para lograr el 50% de mortalidad en 24 h) de la cepa a probar, dividido entre la LC50 de la cepa de referencia.

NSH, no se hizo.

DAPC, demasiado alto para calcular

Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS.

Se utilizó el método descrito por Laemmli (1970) en geles de 100 X 82 X 1.5 mm con 15 pozos de muestras con 75 µg de proteína de extracto por cada pozo. La separación electroforética se condujo a 15 mA. durante 90 min. Los geles así trabajados se sumergieron en una solución de agua-tritón X100 al 2.5% con agitación durante 15 min. y 2 lavados posteriores en SSAF-tritón X100 al 0.2% para detectar esterasas, glutatión peroxidasa y catalasas y en Tris HCl 50 mM pH. 9.0 para detectar fosfodiesterasas. Los geles así preparados se sumergieron en diferentes soluciones de sustrato hasta la aparición de bandas acorde a la Tabla 2. Los zimogramas obtenidos fueron registrados digitalmente en un procesador de imágenes Epichem (UVP Life Sciences. www.uvp.com)

Densitometría.

Se procesaron las imágenes digitales de cada gel en la modalidad de densitometría del paquete de programas de computadora LabWorks 4.0 (UVP Life Sciences. www.uvp.com) y se calibró el densitómetro para cuantificar la densidad óptica de cada banda enzimática obtenida. Las densitometrías se conjuntaron para complementar las zimografías junto con el Rf y masa molecular, para lo cual se utilizaron proteínas marcadoras de masas moleculares comercial preteñidos Page ruler (Fermentas Life Sciences www.fermentas.com) con un rango de 11 a 170 kDa que fueron corridos simultáneamente con los extractos de garrapatas para formar una curva de calibración de masas moleculares, a partir de la cual el programa de computadora fue calibrado para hacer de manera automática el cálculo de la Movilidad Electroforética Relativa (Rf) y la correspondiente Masa Molecular (MM) así como la Densidad Óptica (DO) de cada banda presente en los zimogramas.

Tabla 2. Condiciones de ensayo y sustratos utilizados para la obtención de zimogramas

Enzima	Substrato	Sol. Amortiguadora	Referencia
Esterasa	a-Naftil acetato Fast Gardnet	SSAF ^{6*} 50 mM K ₂ H PO ₄ ; 150 mM NaCl. pH 7.2	Miranda <i>et al</i> .1995.
Catalasa	DAB ^{1*} /H ₂ O ₂	SSAF ^{6*} 50 mM K ₂ H PO ₄ ; 150 mM NaCl. pH 7.2	Gregory y Fridovich 1974.
Fosfodiesterasa	BCIP ^{2*} 2.5 mM; NBT ^{3*} 4mM.	Tris-HCl 50 mM pH 9	Hodes y Retz 1981.
Glutación Peroxidasa	Glutación reducido 0.5 mM., Glutación Reductasa 1.5 U/ml; EDTA ^{4*} 5.4 mM; Hidroperóxido de butilo 0.2 mM; NADPH ^{5*} 1mM	SSAF ^{6*} 50 mM K ₂ H PO ₄ ; 150 mM NaCl. pH 7.2	Wijnen <i>et al</i> .1978

1* Diaminobencidina. 2*Bromo Cloro Indolil Fosfato. 3*Nitro Blue Tetrazolium. 4* ácido etilén diamino tetracético. 5* Nicotín adenin dinucleótido fosfato. 6* Solución salina amortiguadora de fosfatos.

Resultados

Los zimogramas mostraron actividad específica para las enzimas esterasa, fosfodiesterasa, glutatión peroxidasa y catalasa al usar los sustratos enzimáticos correspondientes en los extractos de todas las cepas de garrapatas utilizadas, los registros de las imágenes digitalizadas y los datos de cada banda encontrada tales como: Rf, Masa Molecular, y número de bandas de cada cepa, fueron concentrados en las Tablas 3 a 6.

Tabla 3. Datos obtenidos del zimograma y densitogramas del ensayo de esterases

CEPA	Número de Bandas	Movilidad Electroforética Relativa (Rf)	Densidad Optica	Masa Molecular kDa
Tuxpan	3	0.01	0.57	210
		0.11	0.18	180
		0.52	0.39	47
Susceptible	2	0.11	0.14	180
		0.53	0.12	47
Mora	2	0.52	0.31	47
		0.58	0.27	43
San Alfonso	1	0.58	0.24	43

Tabla 4. Datos obtenidos del zimograma y densitogramas del ensayo de fosfodiesterasa

CEPA	Número de Bandas	Movilidad Electroforética Relativa (Rf)	Densidad Optica	Masa Molecular kDa
Tuxpan	1	0.12	0.45	145
Susceptible	1	0.1	0.15	130

Mora	1	0.1	0.51	130
San Alfonso	2	0.12	0.52	145
		0.10	0.53	130

Tabla 5. Datos obtenidos del zimograma y densitogramas del ensayo de glutatión peroxidasa

CEPA	Número de Bandas	Movilidad Electroforética Relativa (Rf)	Densidad Optica	Masa Molecular. kDa
Tuxpan	5	0.13	0.33	167
		0.18	0.27	125
		0.22	0.27	80
		0.82	0.22	12
		0.92	0.35	4
Susceptible	5	0.13	0.25	167
		0.18	0.23	125
		0.22	0.21	80
		0.82	0.15	12
		0.92	0.32	4
Mora	5	0.13	0.27	167
		0.18	0.21	125
		0.22	0.23	80

		0.82	0.23	12
		0.92	0.31	4
San Alfonso	5	0.13	0.37	167
		0.18	0.33	125
		0.22	0.22	80
		0.82	0.25	12
		0.92	0.38	4

Tabla 6. Datos obtenidos del zimograma y densitogramas del ensayo de catalasa

CEPA	Número de Bandas	Movilidad Electroforética Relativa (Rf)	Densidad Optica	Masa Molecular kDa
Tuxpan	6	0.08	0.01	205
		0.18	0.01	162
		0.30	0.01	125
		0.41	0.005	80
		0.82	0.39	12
		0.90	2.42	4
Suceptible	6	0.08	0.011	205
		0.18	0.007	162
		0.30	0.01	125
		0.41	0.004	80
		0.82	0.32	12
		0.9	2.37	4
		0.08	0.009	205
		0.18	0.010	162

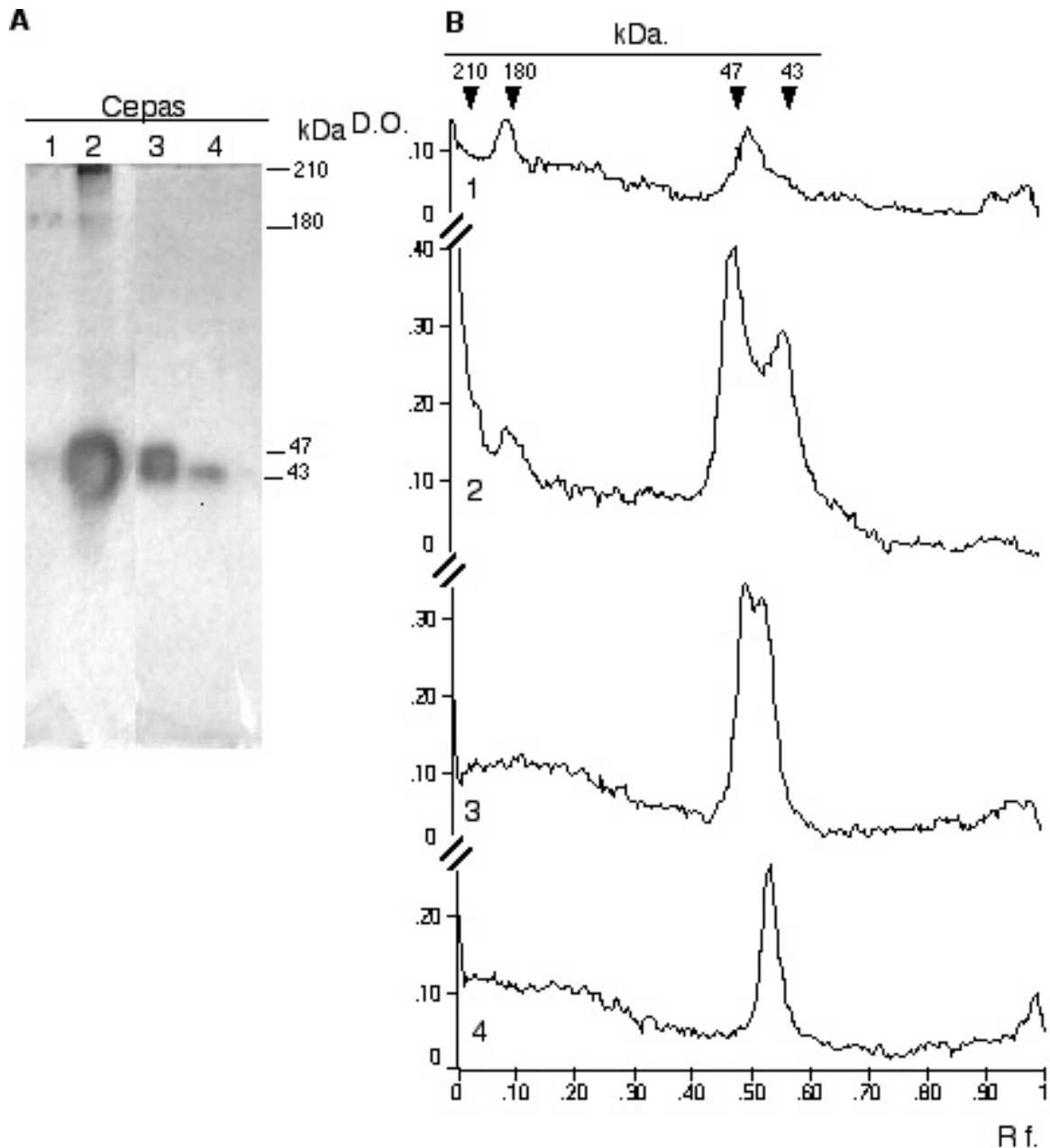
Mora	6	0.30	0.012	125
		0.41	0.006	80
		0.82	0.31	12
		0.9	2.40	4
San Alfonso	6	0.08	0.01	205
		0.18	0.008	162
		0.30	0.009	125
		0.41	0.004	80
		0.82	0.36	12
		0.9	2.37	4

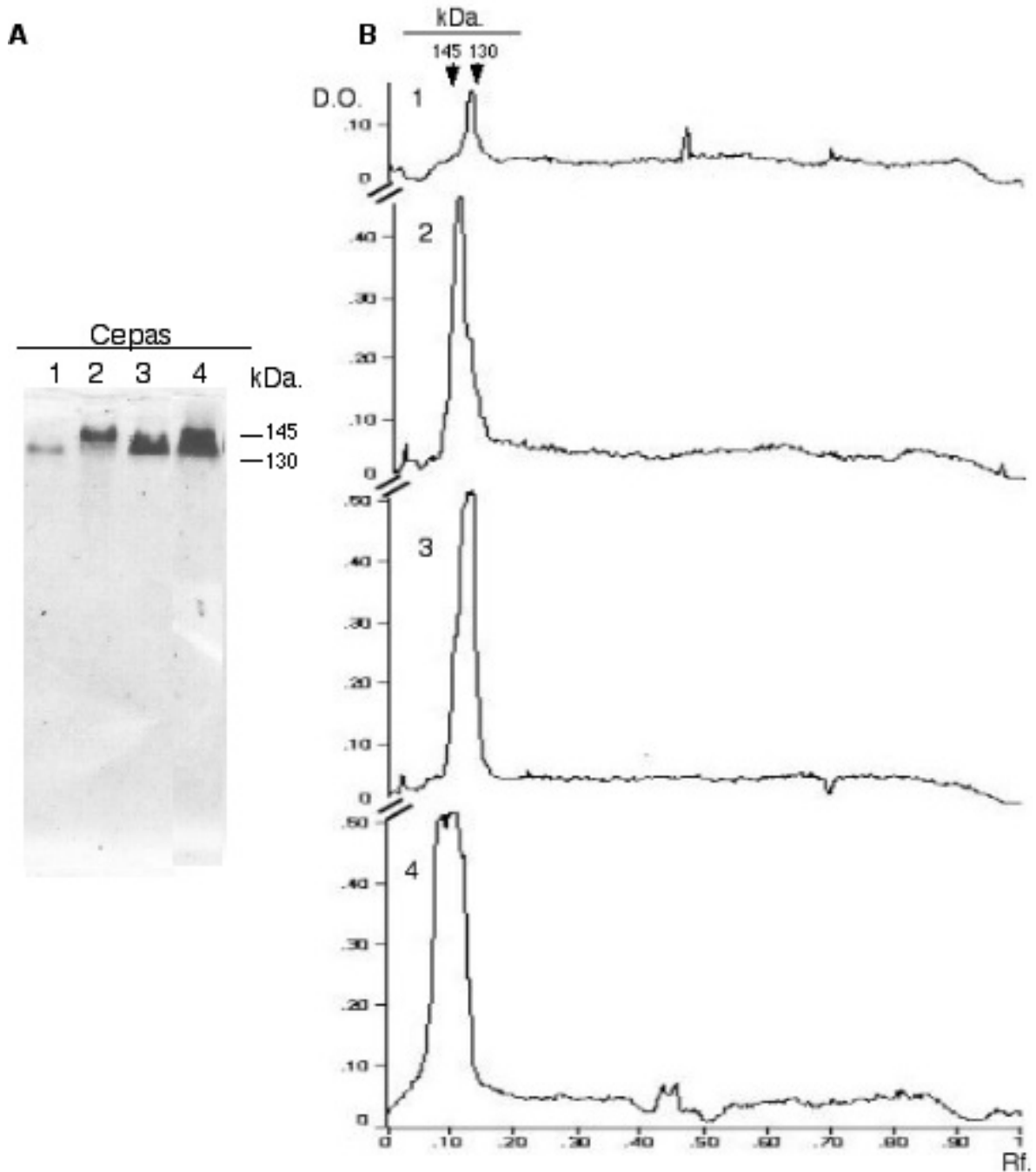
Fue posible observar variaciones de cepas tanto en los niveles de Densidad Óptica (DO), como en el Rf cuando se comparan las cepas en función de actividad de esterasas y fosfodiesterasas, dichas variaciones pueden ser apreciadas tanto en el zimograma como en el densitograma obtenido de la imagen (Figuras 1A, 1B, 2A, 2B). Se detectó un incremento del 317% en la actividad de la esterasa encontrada en la posición Rf 0.52 en la cepa resistente a acaricidas organofosforados (Tuxpan); cuando se compara con la misma banda en la cepa susceptible, dicha banda corresponde con una masa molecular 47 kDa y se encontró en todas las cepas analizadas, mostrando un 117 % de incremento para la cepa resistente a organofosforados y piretroides (Mora) así como un incremento del 100% en la cepa triple resistente a organofosforados, piretroides y amidinas (San Alfonso)(Fig. 1A,1B, Tabla 3). Analizando el densitograma se puede observar que junto con la banda en Rf 0.52 aparece una segunda banda con un Rf de 0.58 (43 kDa) solamente en las cepas doble y la triple resistente (Fig 1A,1B, Tabla 3).

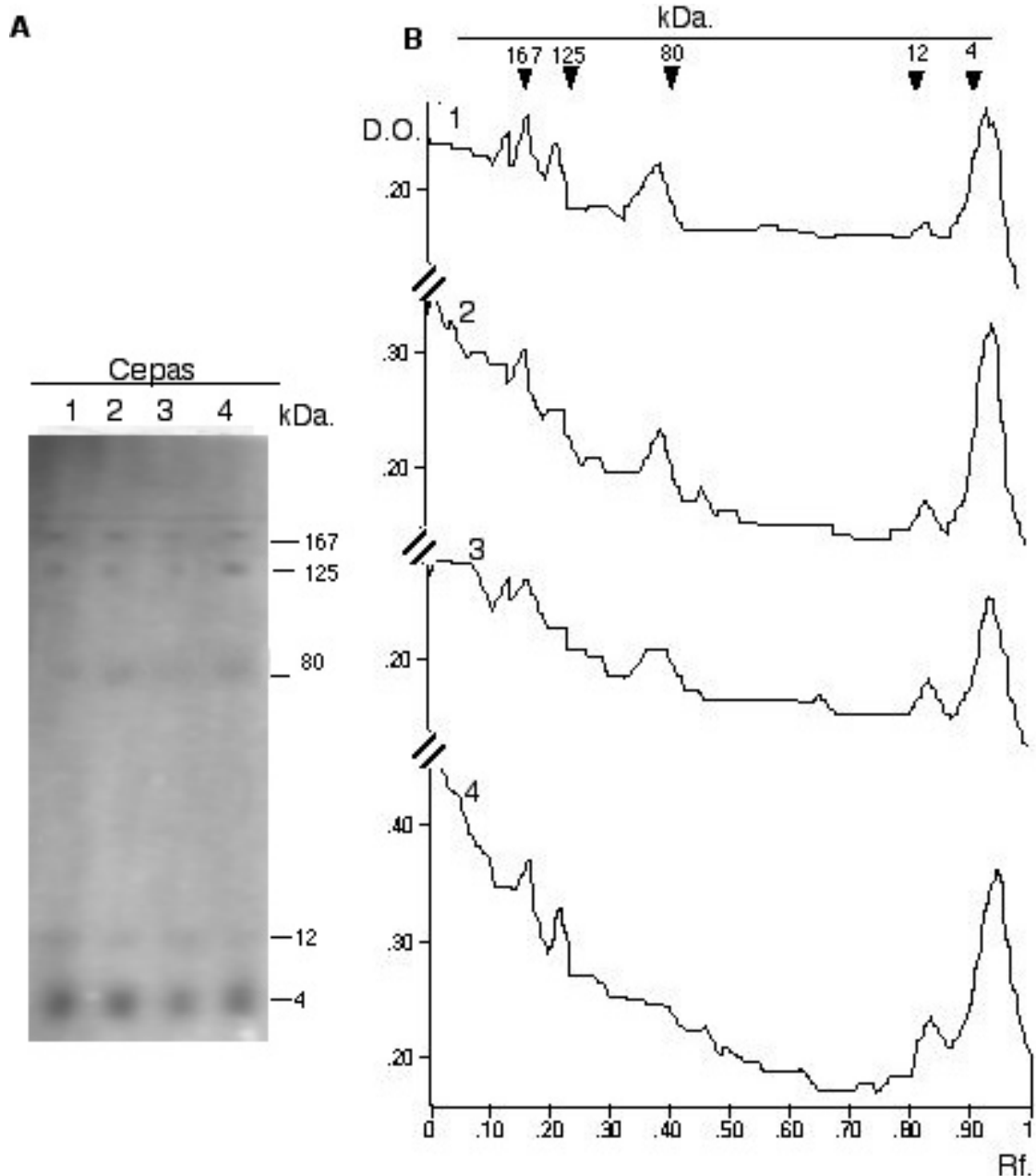
Los densitometría del los zimogramas de fosfodiesterasa muestra una banda en posición Rf 0.1 con una masa molecular estimada en 130 kDa en la cepa susceptible que tuvo correspondencia con una banda similar en la cepas Mora y San Alfonso, pero con una actividad incrementada 340%, al compararse en ambos casos con las garrapatas sensibles. Las cepas resistentes Tuxpan y San Alfonso mostraron una banda en Rf 0.12 con una masa de 145 kDa que no se identificó la cepa susceptible (Fig 2A, 2B y Tabla 4).

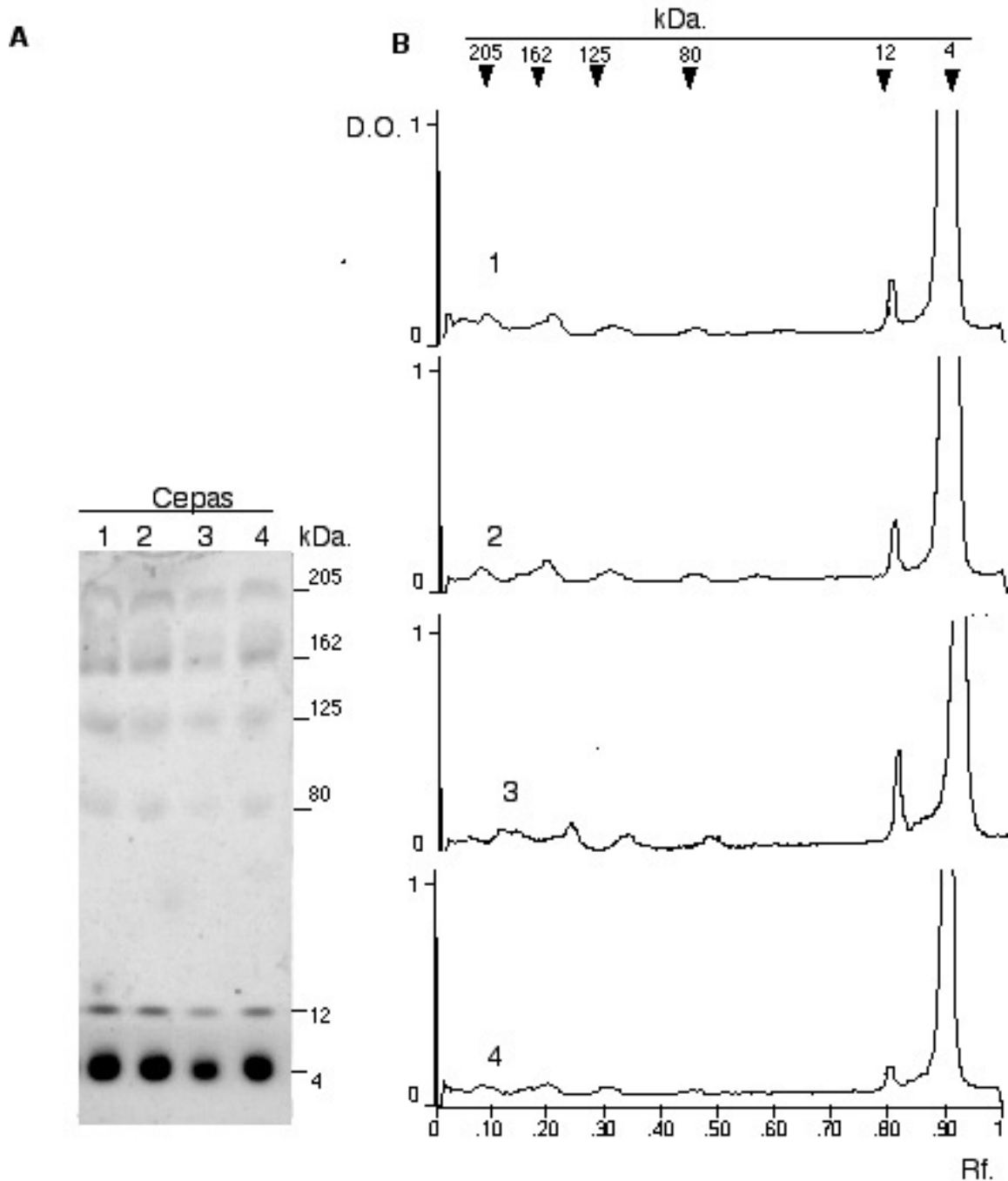
La densitometría correspondiente a glutatión peroxidasa mostró un incremento del 48% en la cepa triple resistente en la banda de Rf 0.13 y algunas variaciones en otras cepas que requieren mayores análisis (Fig. 3A, 3B, Tabla 5).

No se encontraron diferencias entre cepas en la densitometría de catalasa (Fig. 4A, 4B, tabla 6).









Discusión

El análisis de zimogramas es un procedimiento muy confiable para identificar aquellas diferencias genéticas entre individuos de una misma especie (Manchenko 1994). En este trabajo nos hemos concentrado en aquellas enzimas que pudiesen participar de manera directa e/o indirecta en la degradación de los acaricidas por la garrapata y/o en la reparación del daño ocasionado por los diferentes químicos a nivel celular y molecular (Miranda *et al.*, 1995; 1998; Jamroz *et al.*, 2000; Foil *et al.*, 2004; Cossío-Bayúgar *et al.*, 2005). Varios reportes se han hecho dando cuenta sobre el posible papel de esterasas y fosfodiesterasas en la resistencia de garrapatas a productos organofosforados y piretroides (Miranda *et al.*, 1997; 1998; Rosario-Cruz *et al.*, 1997; Jamroz *et al.*, 2000) atribuyendo parte del efecto neutralizador a la degradación hidrolítica que estas enzimas ejercen sobre la estructura química de los acaricidas. En el caso de glutatión peroxidasa y catalasa, se atribuyen un efecto de protección celular contra la acción nociva de peróxidos y radicales libres, producidos de manera indirecta por los productos acaricidas (Cossío-Bayúgar *et al.*, 2005). Los resultados obtenidos en este trabajo muestran diferencias en los zimogramas de las cepas analizadas cuando se utilizan el substrato correspondiente a esterasas, probablemente debido a que esta enzima participa activamente en la degradación de los acaricidas y por el mismo motivo solo aquellas garrapatas con resistencia muestran una elevada actividad de estas enzimas necesarias para contrarrestar los efectos tóxicos de los compuestos acaricidas. Los valores elevados en la actividad específica también se encontraron para la fosfodiesterasa, cuyo zimograma mostró valores notoriamente elevados (340% de incremento) en la banda de masa 130 kDa en las garrapatas con doble y triple resistencia sugiriendo una correlación fosfodiesterasas-resistencia que deberá ser analizada con profundidad en posteriores trabajos. Adicionalmente se encontró de una isozima en Rf 0.1 con una masa de 145 kDa, que no se encuentra en la cepa susceptible y parece ser solo encontrada en las cepas Tuxpan y San Alfonso. Estos hallazgos son de considerable importancia en el diagnóstico de la resistencia ya que tanto esterasas como fosfodiesterasas participan activamente en la degradación de xenobiotas y diferentes productos químicos, ambas enzimas son usadas como marcadores para diagnosticar la resistencia a diferentes pesticidas en el áfido parásito de plantas *Myzus persicae* y el mosquito hematófago *Culex pipiens* (Field y Foster, 2002; Karunaratne y Heminway, 2001).

Los datos relacionados con glutatión peroxidasa muestran variaciones en la actividad de las diferentes cepas, notablemente un incremento marginal de actividad enzimática en la cepa con triple resistencia, sin embargo bajo estas condiciones de ensayo, los zimogramas no se muestran lo suficientemente claros para elaborar una conclusión respecto a las diferencias de cepas que pudieran constituir un parámetro discriminatorio y será necesario afinar la metodología para poder elaborar una conclusión respecto al uso de esta enzima en un procedimiento diagnóstico de resistencia. Por el contrario, los densitogramas de catalasa fueron claros en mostrar una total ausencia en las diferencias entre cepas y todos los valores obtenidos fueron similares en todos los extractos analizados. Tanto glutatión peroxidasa como catalasa se encuentran involucradas en la reparación de daño ocasionado por la presencia de peróxidos y radicales libres oxidativos a nivel de membrana celular y el proceso ha sido documentado como parte de la toxicidad de los pesticidas en artrópodos

(Ecobichon, 1996; Cossío-Bayúgar et al., 2005) por lo que identificar sus respectivos zimogramas parecería ser una opción clara para profundizar la identificación de garrapatas resistentes, es claro que se debe de afinar la técnica y valorar una muestra más grande de garrapatas en diferentes estadios de desarrollo para poder estimar la utilidad o no de usar glutatión peroxidasa y catalasa como indicadores de la resistencia a los acaricidas de la garrapata *B. microplus*.

El procedimiento aquí descrito constituye una herramienta útil en el diagnóstico de la resistencia de la garrapata *B. microplus*, que combina los valores obtenidos conjuntamente de zimogramas y sus respectivos densitogramas analizando simultáneamente múltiples enzimas. Aunque ya había habido reportes de actividad de esterasas, fosfodiesterasas y glutatión peroxidasa en gel (Miranda et al., 1995; 1998; Rosario-Cruz et al., 1997; Jamroz et al., 2000; Cossío-Bayúgar et al., 2003) de distintas cepas de garrapatas, en este trabajo aumentamos una dimensión nueva en el análisis de los geles, ya que los estudios de densitometría, nos permite distinguir y cuantificar diferencias en bandas que se encuentran tan cercanas que en con un análisis visual de los geles es difícil si no imposible de hacerse. Estos análisis nos permiten ponerle números y valores a las bandas y así y realizar comparaciones mas precisas de las actividades enzimáticas entre las diferentes cepas. La metodología aquí descrita tiene una gran ventaja sobre el sistema tradicional de diagnóstico de resistencia. No existen reportes previos sobre la utilidad de la combinación de estos procedimientos aplicados en la identificación de resistencia a acaricidas, esta metodología puede proporcionar resultados en días en lugar de meses y por lo mismo abatiría los elevados costos del diagnóstico que actualmente se paga, se propone este ensayo como un complemento y alternativa en el estudio de la resistencia de la garrapata a los acaricidas.

Agradecimiento

Este proyecto fue financiado por el CONACYT-México (Proyecto No. I39033-B)

Bibliografía

1. Bradford M. A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.*, 1976; 72:248.
2. Cossío-Bayúgar R., Castro-Saines, E., García VZ, Estefan M. Gutathione peroxidase enzyme detection from susceptible and acaricide resistant *Boophilus microplus* ticks on SDS polyacrylamide Gels. En V International Seminar of Animal Parasitology. (Mérida, Yucatán, México), 2003: 144-147.
3. Cossío-Bayúgar R., Miranda E., Holman J.P. Molecular cloning of a phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase gene from the tick, *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 2005; In press.
4. Ecobichon D.J. Toxic effect of pesticides en Casarett & Doull's Toxicology, The basic Science of Poisons. 5 edición. New York. N.Y. EUA: McGraw-Hill, 1996: 643-689.

5. Field, L.M., Foster S.P. Amplified esterase genes and their relationship with other insecticide resistance mechanisms in English field populations of the aphid, *Myzus persicae* (Sulzer). *Pest. Manag. Sci.*, 2002; 58(9):889-94.
6. Foil L.D., Coleman P., Eisler M., Fragoso-Sanchez H., Garcia-Vazquez Z., Guerrero F.D., Jonsson N.N., Langstaff I.G., Li A.Y., Machila N., Miller R.J., Morton J., Pruett J.H., Torr S. Factors that influence the prevalence of acaricide resistance and tick-borne diseases. *Vet. Parasitol.*, 2004; 125:163-81.
7. Gregory E.M., Fridovich I. Visualization of catalase on acrylamide gels. *Anal. Biochem.*, 1974; 58:57.
8. Hodes M.E., Retz J.E. A positive zymogram for distinguishing among Rnase and phosphodiesterases I and II. *Anal. Biochem.*, 1981; 110:150.
9. Huntern R.L., Market C.L.. Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. *Science*, 1957; 125:1294.
10. Jamroz R.C., Guerrero F.D., Pruett D.D., Oehler D.D., Miller R.J. Molecular and biochemical survey of acaricide resistance mechanisms in larvae form Mexican strains of the southern cattle tick, *Boophilus microplus*. *J. Insect. Physiol.*, 2000; 46: 685-695.
11. Karunaratne S.H., Hemingway J. Malathion resistance and prevalence of the malathion carboxylesterase mechanism in populations of mosquito vectors of disease in Sri Lanka. *Bull. World Health Organ*, 2001; 9(11):1060-4.
12. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970; 227:680-685.
13. Manchenko G.P. Handbook of detection of enzymes on electrophoretic gels. Boca Raton Florida EUA; CRC press, 1994:. 1-2
14. Market C.L., Moller F. Multiple form of enzymes: tissue ontogenetic, and species specific patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1959; 45: 753.
15. Miranda E., Cossío-Bayúgar R., Téllez-Alanís M.R., García-Vázquez Z., Rosario-Cruz R., Ortiz-Estrada M. An enzymatic marker for ixodicide resistance detection in the cattle tick *Boophilus microplus*. *Adv. Agric. Res.*, 1995; 4(3): 001-008.
16. Miranda-Miranda E., Cossío-Bayúgar R., Waghela S., Wagner G.G Organophosphate degradation activity in acaricide resistant cattle tick *Boophilus microplus* Proceedings. Lost pines Conference (Smithville, Texas EUA) octubre, 1998: 78.
17. Rosario-Cruz R., Miranda-Miranda, E., Garcia-Vazquez, Z., Ortiz-Estrada, M. Detection of esterase activity in susceptible and organophosphate resistant strains of the cattle tick *Boophilus microplus*. *Bull. Entomol. Res.*, 1997; 87: 197-302.
18. Stone B.F The genetics of resistance by ticks to acaricides. *Aust. Vet. J.*, 1972; 48: 345-537.
19. Wijnen L.M:M., Monteba-Van Heuvel M., Pearson P.L., Meera Khan P. Assignment of a gene for glutathione peroxidase (GPX1) to human chromosome 3. *Cytogenet. Cell. Genet.*, 1978; 22:232-235.

Curriculum de los autores



Dr. Estefan Miranda-Miranda 47 años graduado como Químico Bacteriólogo Parasitólogo en la Universidad de Guerrero México. Maestro en Ciencias por la Universidad de Morelos México. Doctor en Filosofía por la Universidad Texas A & M. EUA. Ha trabajado durante 22 años en investigación sobre parásitos de rumiantes y durante los últimos 12 años ha sido Investigador Titular del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias; donde ha trabajado en la resistencia de la garrapata *B. microplus* a los acaricidas. Cuenta con varias publicaciones internacionales sobre el tema y ha participado como conferencista y exponente en infinidad de congresos, cursos y simposia.

Dra. Raquel Cossío-Bayúgar graduada en investigación Biomédica Básica en la Universidad de Autónoma de México. Doctor en Filosofía en la Universidad de Texas A & M en EUA. Es investigadora titular del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria / Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias Ha trabajado por 12 años en este centro en investigaciones relacionadas con la resistencia de la garrapata *B. microplus* a acaricidas y a enfermedades que transmite la garrapata. Actualmente es responsable de dos proyectos de investigación uno relacionado con cultivo de células de garrapata *Boophilus microplus* como modelo para el estudio de la resistencia a ixodícidas. y otro de establecimiento de un sistema *in vitro* como modelo de estudio de la interacción *Boophilus microplus-Babesia* spp. Cuenta con varias publicaciones internacionales en el tema y ha participado como conferencista y exponente en infinidad de congresos, cursos y simposia



Biol. Jorge Osorio Miranda. 49 años. Graduado en Biología en la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, México Trabaja en Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal. Ha participado como ponente o instructor en cursos de aprobación de médicos veterinarios en el control de la garrapata, cursos de taxonomía de ixodídeos, pláticas sobre resistencia en *B. microplus* a universidades, comités de fomento pecuario y a la industria farmacéutica en México. Impartición de cursos teórico-prácticos sobre biología, cultivo, diagnóstico de resistencia y control de la garrapata *B. microplus* a personal técnico de laboratorios particulares y de gobierno, estudiantes de postgrado nacionales y capacitación técnica de estancias de personal de otros países. Autor de reportes técnicos internos de evaluaciones biológicas de laboratorio, establo y campo de ixodícidas y mosquicidas realizados en el Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal de 1987 a la fecha. Autor y coautor de resúmenes y artículos completos en congresos nacionales e internacionales.

Trabajo recibido el 19/10/2005, nº de referencia 110513_RED VET. Enviado por sus autores. Publicado en REDVET® el 01/11/05.

Revista Electrónica de Veterinaria REDVET®, ISSN 1695-7504 - Veterinaria.org® - Comunidad Virtual Veterinaria.org® - Veterinaria Organización S.L.®

Se autoriza la difusión y reenvío de esta publicación electrónica en su totalidad o parcialmente, siempre que se cite la fuente, enlace con Veterinaria.org - www.veterinaria.org y REDVET® www.veterinaria.org/revistas/redvet y se cumplan los requisitos indicados en Copyright 1996-2005