

Identificación de mutaciones en el canal de cloro dependiente de glutamato en *Rhipicephalus microplus* resistente y susceptible a las ivermectinas

Identification of mutations in the glutamate-dependent chlorine channel in *Rhipicephalus microplus* resistant and susceptible to ivermectin

GABRIELA AGUILAR-TIPACAMÚ^{1*}, JUAN MOSQUEDA-GUALITO¹, GERMINAL J. CANTÓ-ALARCÓN¹, GUILHERME M. KLAFFE⁴,
FAUSTO ARELLANO-CARVAJAL¹, MIGUEL M. ALONSO-DÍAZ² Y ROGER I. RODRÍGUEZ-VIVAS³

¹Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Autónoma de Querétaro

Avenida de las Ciencias s/n, Juriquilla, Querétaro, México, C.P. 76230, Tel. 192-12-00 exts. 5301 y 5303

²Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Ganadería Tropical (CEIET), Tlapacoyan, Veracruz (UNAM)

³Universidad Autónoma de Yucatán (CCBA). Carretera Mérida-Xmatkuil Km 15.5.

⁴Laboratório de Parasitologia da Fepagro Saúde Animal Instituto do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor

*Corre electrónico: gabriela.aguilar@uaq.mx

ENVIADO EL 11 DE AGOSTO DE 2015/ ACEPTADO EL 08 DE SEPTIEMBRE DE 2015

RESUMEN

El canal de cloro dependiente de glutamato es el sitio de acción de las lactonas macrocíclicas tales como las ivermectinas (IVM). En otros microorganismos han sido identificadas mutaciones asociadas con la resistencia a IVM, sin embargo en la garrapata *Rhipicephalus microplus* (*R. microplus*) no existe reportes de esos cambios. Por lo anteriormente citado, el objetivo del presente trabajo fue Identificar mutaciones en el canal de cloro dependiente de glutamato en *R. microplus* resistente y susceptible a las ivermectinas. Dos cepas de campo fueron seleccionadas; una fenotípicamente con un índice de resistencia de 2.9 a las IVM y otra susceptible. Oligonucleótidos específicos fueron diseñados de la secuencia del gen del canal de cloro reportada en el GenBank (GU562859.1). Para la extracción de mRNA se utilizó la técnica de fenol-cloroformo siguiendo la metodología descrita por el fabricante. Un RT-PCR fue realizado para amplificar la secuencia de 852 pb de interés. Una vez amplificada fue clonada utilizando el vector p ENTR™/D-TOPO (Invitrogen) siguiendo la metodología sugerida por el fabricante y se utilizaron las enzimas de restricción Not I y Asc I para su digestión. Los amplicones del tamaño esperado fueron purificados por el kit PureLink™ Invitrogen. Los fragmentos fueron enviados para su secuenciación en ambos sentidos al Instituto de Biotecnología de la UNAM en Cuernavaca Morelos. Los resultados fueron analizados y comparados con la secuencia reportada en el GenBank utilizando el programa BioEdit Ver 7.2.5. Al analizar las secuencias se observaron cambios a nivel de nucleótidos y de aminoácidos en el canal de cloro dependiente de glutamato.

Palabras Claves: Garrapatas, lactonas macrocíclicas, resistencia, control.

INTRODUCCIÓN

Las garrapatas son un importante vector en salud pública por las enfermedades que transmiten al humano, como son la borreliosis, encefalitis y fiebres hemorrágicas. (Brossard y Wikel, 2004; Jongejan y Uilenberg, 2004; Rodríguez-Vivas et al., 2007)

La garrapata *R. microplus* es considerada un ectoparásito tropical importante en la ga-

ABSTRACT

Glutamate-dependent chlorine channel is the site of action of the macrocyclic lactones such as ivermectin (IVM). Mutations associated with resistance to IVM have been identified in several microorganisms; however, there are no reports of such changes in *Rhipicephalus microplus* ticks (*R. microplus*). Thus, the objective of this study was to identify mutations in the Glutamate-dependent chlorine channel in two field strains of *R. microplus* ticks, one resistant (RI 2.9) and one susceptible to ivermectin. Specific oligonucleotides were designed from the chloride channel gene sequence reported in GenBank (GU562859.1). The technique of phenol-chloroform was used following the methodology described by manufacturer for the extraction of mRNA. An RT-PCR was performed to amplify the 852 bp sequence of interest. Once amplified, it was cloned using the p ENTR™ / D-TOPO vector (Invitrogen) following the methodology proposed by the manufacturer, and restriction enzymes Not I and Asc I were used for digestion. The expected-size amplicons were purified by Invitrogen PureLink™ kit. The fragments were sent for sequencing in both directions to the Institute of Biotechnology, UNAM, in Cuernavaca Morelos. The results were analyzed and compared with the sequence reported in the GenBank using the BioEdit Ver. 7.2.5 program. After analysis, changes in the sequences at the nucleotide and amino acid level were observed in the glutamate-dependent chlorine channel.

Key Words: Ticks, macrocyclic lactones, resistance, control.

nadería bovina por las pérdidas económicas que ocasiona y por transmitir enfermedades como son la Babesiosis y la Anaplasmosis bovina (Aguilar et al., 2008; Jongejan y Uilenberg, 2004). Recientemente, una de las estrategias utilizadas para controlar a *R. microplus* es la aplicación de ixodicidas (Fragoso et al., 1999) como son los organofosforados (OP), piretroides sintéticos (SP), amidinas (Am) y lactonas macrocíclicas (LM) (Aguilar-Tipacamú y

Rodríguez-Vivas, 2003; Rodríguez-Vivas et al., 2005). Las lactonas macrocíclicas (mibelmecina MLs, Ivermectina IVM, doramectina DOM y moxidectina MOX) aplicadas subcutáneamente y de la forma pour-on han sido utilizadas desde hace 10 años, para controlar a los nematodos gastrointestinales y garrapatas en México (Aguilar-Tipacamú y Rodríguez-Vivas, 2003; Rodríguez-Vivas et al., 2010). Sin embargo, el uso frecuente e indiscriminado ha ocasionado la aparición de cepas de *R. microplus* resistentes a estos productos.

Los canales de cloro dependiente de Glutamato son el sitio de acción de las LM, como la IVM y la MOX (Forrester et al., 1999). En garrapatas, el mecanismo de acción de las ivermectinas se debe a la interacción y alta afinidad de unión a receptores del glutamato o ácido gamma amino butírico presentes en células musculares y nerviosas que controlan la entrada de iones en canales de cloro (Cully et al., 1994; Rodríguez et al., 2010), dando lugar a una elevación irreversible de la conductancia de la membrana, lo que lleva a la parálisis muscular y subsecuentemente la muerte (Klafke et al., 2006). Los ixodicidas utilizados continuamente provocan una fuerte presión de selección eliminando a los individuos susceptibles, ocasionando un fenómeno de resistencia al producto utilizado, ya que este se convierte en el agente de selección más importante. La resistencia es un proceso evolutivo que aparece como resultado de la selección genética (Lee et al., 2000). La velocidad de desarrollo de la resistencia dentro de una población depende principalmente de la intensidad de selección, frecuencia inicial de genes que confieren la resistencia y el grado de dominancia del gen (Stone, 1972). La resistencia a los ixodicidas es uno de los grandes problemas en áreas tropicales en donde la producción bovina es una de las actividades de mayor importancia económica, debido a la múltiple resistencia a todas las familias de los acaricidas utilizados actualmente. (Rodríguez-Vivas et al., 2007)

La resistencia cruzada a DOM, IVM y MOX en *R. microplus* fue por primera vez notificada en Brasil por Martins y Furlong (2001); así mismo, Klafke et al. (2006) reportaron resis-

tencia a las ivermectinas en el estado de Sao Paulo. En Yucatán, México, Cogollo et al. 2010 reportaron por primera vez la resistencia a IVM en cepas de campo, pero los mecanismos de resistencia aún no se han dilucidado y caracterizado. En México no existe reportes o estudios de la garrapata *R. microplus* de esas mutaciones detectadas en los genes que codifican a las subunidades α del canal GluCl en otros microorganismos y, si pudieran ser las responsables de la resistencia a las IVM en campo. Por lo tanto, se planteó la siguiente hipótesis: la presencia de mutaciones en el gen que codifica para el canal de cloro dependiente de glutamato confiere resistencia a las IVM en la garrapata *R. microplus*.

Por lo anteriormente citado y dada la importancia de la presencia de cepas resistentes a las IVM en nuestro país, el objetivo del presente trabajo fue: Identificar mutaciones en el canal de cloro dependiente de glutamato en *R. microplus* resistentes y susceptibles a las ivermectinas.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio fue realizado en el Laboratorio de Microbiología Animal de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro, ubicado en Av. de las Ciencias s/n, Juriquilla. Delegación Santa Rosa Jáuregui, Querétaro.

Cepas de campo

Dos cepas de garrapatas de *R. microplus* fueron utilizadas para la siguiente investigación. Una cepa resistente fenotípicamente a las IVM con un IR de 2,9 obtenida en un rancho de Martínez de la Torre, Veracruz. La cepa susceptible fue la Media Joya, colectada en un rancho en el estado.

Técnica de Inmersión de Larvas (TIL)

Para determinar la resistencia o susceptibilidad en estas cepas, se realizó la prueba de TIL utilizando larvas de 14 días de edad. Once concentraciones fueron utilizadas (0, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 25, 35, 50, 70, 100 ppm) con tres repeticiones cada una, siguiendo la metodología descrita por Klafke et al. (2006)

Primero se preparó un vehículo (diluyente) compuesto de 2% de Trintón-X 100 (Sigma-Aldrich) en etanol 100% (Ethanol-TX2%). Una solución stock se preparó diluyendo la IVM técnica al 1% en 10 ml de (Ethanol-TX2%) y se conservó a 4 °C por un máximo de una semana. A la hora de realizar las pruebas, la solución stock se diluyó 1/100 en agua destilada y se obtuvo una concentración final de 0,01% (100 ppm) de IVM, 0,02% de Triton-X 100 y 1% de etanol. De esta solución se sacaron soluciones seriadas de 7 partes por 3 (30%) del vehículo a fin de obtener las concentraciones de trabajo (en ppm). Como control se usó el mismo vehículo sin IVM. De cada solución 500 µl se transfirieron a tubos de microcentrífuga (1,5 ml) y aproximadamente 100 larvas se adicionaron con un pincel. Después de 10 minutos de inmersión las larvas se retiraron del tubo con un pincel limpio, se secaron con una toalla de papel y se transfirieron en un paquete de papel filtro doblado a la mitad y sellados en los extremos con clips de metal. El paquete se cerró con un tercer clip e incubado por 24 horas en una estufa (27-28 °C y 80-90% de humedad relativa). Después de este período los paquetes fueron abiertos y larvas vivas y muertas fueron contadas. Larvas completamente inmóviles o apenas con movimientos de sus apéndices, sin deslizamiento, se consideraron como muertas. Se utilizaron tres réplicas de cada concentración más el control.

Análisis estadísticos de TIL

Se utilizó el modelo de regresión Probit según Finney (1980), a través del programa Polo Plus (LEORA SOFTWARE, 2004). Se determinaron los siguientes parámetros: Concentración letal 50% (CL50) con sus intervalos de confianza de 95% (IC95%) y una inclinación (slope) de la línea de regresión. Para la interpretación de los resultados sobre el diagnóstico de resistencia a los ixodídeos en las poblaciones de garrapatas se utilizaron las categorías establecidas por Castro-Janer et al. (2009): A). Susceptible: cuando la CL50 (IC95%) de la población de campo no es estadísticamente diferente a la cepa de referencia susceptible. B). Resistencia: Cuando la CL50 de la población

de campo es estadísticamente diferente de la cepa de resistencia susceptible ($IR \geq 2$).

Análisis molecular de *R. microplus* resistente y susceptible a las IVM

Extracción de ARN

Se extrajo de larvas resistentes y susceptibles el ARN siguiendo el protocolo de Trizol-Cloroformo (Invitrogen®) del fabricante. Se corrió un gel al 1% para revisar integridad y pureza de este ARN; posteriormente, se cuantificó y fue usado para hacer una retrotranscripción utilizando el programa que a continuación se describe: 1 hora a 42 °C, 20 minutos a 55 °C para una reacción de 20 µl. Es importante mencionar que se utilizó un control negativo y positivo en la retrotranscripción. Una vez que se obtuvo el cDNA se procedió a realizar una PCR para amplificar el segmento de interés y poder clonarlo.

Amplificación por PCR punto final del gen del canal de cloro dependiente de glutamato

Para realizar los análisis moleculares del canal de cloro dependiente de glutamato, se utilizó la secuencia reportada en el GeneBank con número de acceso GU562859.1. De la secuencia reportada se diseñaron primers específicos utilizando el programa Oligoanalyzer ver. 3.1 y se seleccionaron los primers que tuvieran un tamaño de 20 a 25 nucleótidos, una temperatura de alineamiento de 50-56 °C, un contenido de 40-60% de GC, que tuviera 100% de identidad a la secuencia de interés y que no formara horquilla, homodímeros o heterodímeros. Los primers seleccionados fueron: Forward (FGLU) 5-TGCTTCTACGAATACATCCCA-3 y Reverse (RGLU) 5-CATGAGCGGAAAGAAGATCC-3 y para la PCR punto final se siguieron las condiciones de termociclado 95 °C durante 60 segundos, 94 °C por 15 segundos, 52 °C por 30 segundos, 72 °C por 45 segundos, seguido por 10 ciclos; 94 °C por 15 segundos, 54,5 °C por 30 segundos, 72 °C por 45 segundos durante 20 ciclos y por último 72 °C por 420 segundos. Se utilizó como control positivo un gen que codifica la glutatión peroxidasa de *R. microplus*

(cDNA) FGPOX de (5-GCTAGACTGCACAAG-CAATACGGG-3) y reverse RGPOX (5-GTTT-GCAGACACCTCAGCGTGCC-3'), utilizándose las siguientes condiciones de termociclado: 94 °C por 30 segundos seguida de 10 ciclos de 94 °C por 5 segundos y 72 °C por 2 minutos; seguidos por 25 ciclos de 94 °C por 5 segundos, 70 °C por 10 segundos y 72 °C por 3 minutos (Cosío et al., 2005) y como control negativo se puso agua en lugar de DNA. Para visualizar el amplicón se corrió un gel de agarosa al 1,2% teñido con bromuro de etidio a 55 Volts.

Una vez que amplificó la PCR, se purificó el producto utilizando el KIT Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System siguiendo la metodología del fabricante.

Clonación del gen del canal de cloro dependiente de Glutamato

Utilizando la tecnología Gateway se procedió a clonar en un vector pENTR™/D-TOPO (Invitrogen), siguiendo el protocolo del fabricante. Es importante mencionar que al primer forward se le insertó una secuencia de CACC para que pudiera ensamblar con la secuencia complementaria del vector y pudiera ligarse. Una vez que se ligó al vector, se procedió a transformar por choque térmico células One Shot Top10 y estas células fueron sembradas en cajas de Petri con medio LB que contenía Kanamicina (100 µg/ml) y se dejó incubando toda la noche a 37 °C. Al día siguiente se seleccionaron las clonas que crecieron en estas cajas (clonas recombinantes) y fueron evaluadas mediante PCR de escrutinio para confirmar que tuviera el plásmido con el inserto de interés. A las colonias positivas se les extrajo el ADN plasmídico con el kit Illustra Plasmid Prep Mini Spin.

Se realizó una digestión del plásmido purificado con enzimas de restricción para corroborar la presencia del inserto. En este caso se realizó la digestión con las enzimas NotI y AscI que corta el sitio de clonado en TOPO. Se mezclaron en un tubo Eppendorf las siguientes cantidades: 5 µl ADN plasmídico purificado, 2 µl NEbuffer 4 de AscI, 1 µl enzima NotI, 0,5 µl de AscI y 11,5 µl de agua (20 µl) y se dejó incubar 1 h a 37 °C y se corrió en un gel de agarosa al 1,7% con bromuro de etidio para observar el patrón de digestión.

Los clones con inserto liberaron una banda de 852 pb (gen GLU). (Figura 2)

Secuenciación y análisis de secuencias

Los productos obtenidos de las clonas con el inserto se purificaron y se enviaron a secuenciar a la sección de servicios genómicos del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Las secuencias obtenidas se analizaron utilizando el programa Bio-EDIT Ver 7.2.5 de libre acceso en la red. Ocho secuencias de cada una de las cepas estudiadas fueron analizadas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El resultado de la amplificación del RT-PCR usando los primers Forward (FGLU) 5-T-GCTTCTACGAATACATCCCA-3 y Reverse (RGLU) 5-CATGAGCGGAAAGAAGATCC-3 de la secuencia reportada en el GenBank por Klafke et al. (2010) del canal de cloro dependiente de glutamato de *R. microplus* es presentado en la Figura 1.

Los clones con inserto liberaron una banda de 852 pb (gen GLU) y son presentados en la Figura 2.

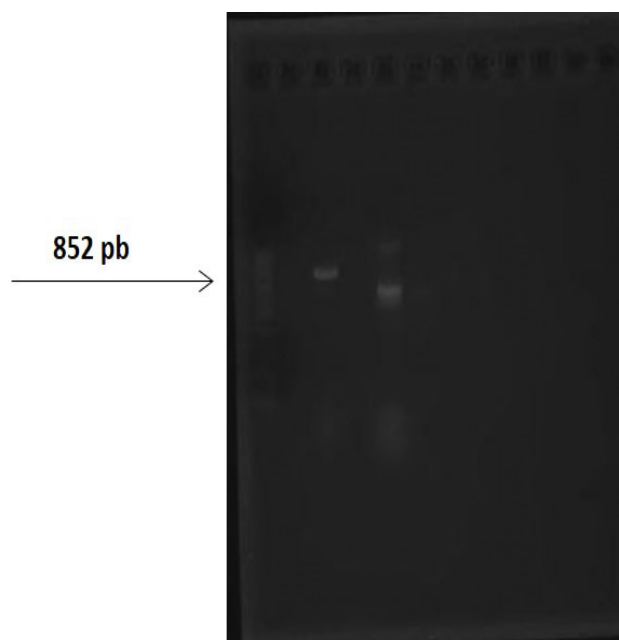


Figura 1. Amplificación del gen GluCl por PCR punto final de la cepa Susceptible. En la figura se muestra el amplicón de interés (852 pb). El control negativo al que solo se le adicionó agua se encuentra en el carril 3 y el control positivo se encuentra en el carril 4 con un fragmento esperado de 700 pb y el marcador de peso molecular se muestra en el carril 1.

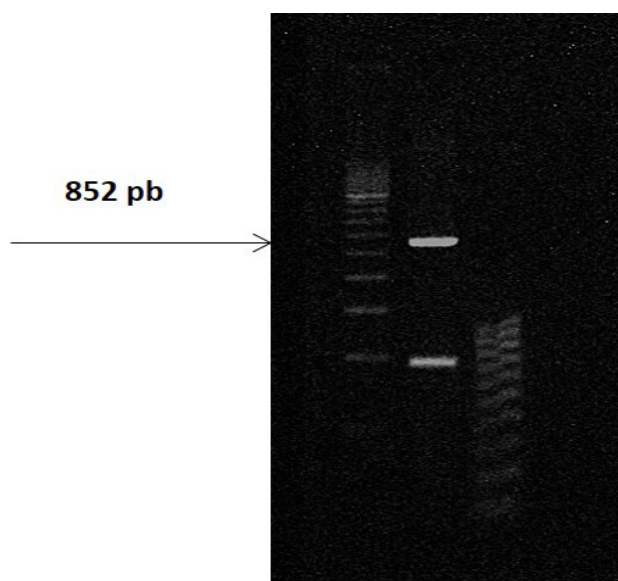


Figura 2. Digestión enzimática del DNA plasmídico purificado. En el carril 2 se muestra el ensayo de digestión enzimática con las enzimas NotI y Ascl y el fragmento de interés (852 pb).

Alineamiento múltiple de las secuencias obtenidas

Se realizó el alineamiento múltiple de las secuencias obtenidas de las dos cepas mexicanas (cepa México y cepa susceptible México) y la cepa Mozo originaria de Brasil y reportada en el Genbank. Los alineamientos de las secuencias obtenidas de ambas cepas demuestran secuencias conservadas al ser comparadas con la cepa Mozo; sin embargo, existe un cambio en la posición del nucleótido 546 que sustituye una Timina reportada en la cepa Mozo por una Citosina presente en la cepa susceptible y resistente. Así mismo, está presente otra sustitución en la posición 575 al compararlas con la cepa Mozo (Figura 3). Los resultados indican sustituciones de nucleótidos de las cepas mexicanas comparadas con la cepa brasileña, sin embargo la secuencia de nucleótidos de la cepa susceptible y resistente de México son idénticas, no observándose ningún cambio. La resistencia fenotípica hacia estos productos ha sido reportada en Brasil y en un estudio realizado por Klafke et al. 2010 reportan por primera vez la clonación y secuenciación parcial del gen del canal de cloro dependiente de glutamato, el cual, como fue mencionado anteriormente, es el blanco o sitio de acción de las IVM. En esta investigación realizada por Klafke no reporta

mutaciones en este gen que pudiera estar asociado con la resistencia hacia estos productos; sin embargo, al realizar las pruebas de inmersión de larvas utilizaron inhibidores de enzimas que demostraron que la citocromo P-450 y glutatión S-transferasa juegan un papel en la detoxificación de IVM. Existen reportes relacionados con la resistencia a las IVM en *Blattella germanica*, *Plutella xylostella* y *Leptinotarsa decemlineata* atribuyéndola al aumento del metabolismo oxidativo por 450s, conjugados por GST y esterasas (Guerrero et al., 2012). Otro mecanismo de resistencia contra las IVM reportada en *R. microplus* son las bombas de flujo del transportador ABC. (Pohl et al., 2011; Pohl et al., 2014)

La identificación de marcadores genéticos llamados SNPs para la resistencia a los ixodicidas en *R. microplus* han sido propuestos en varios estudios. A nivel molecular, mutaciones en el dominio III del segmento 6 en el canal de sodio dependiente de voltaje, está asociada con la resistencia a los piretroides (Rosario-Cruz et al., 2005). Los aspectos moleculares de resistencia metabólica no están bien definidos en *R. microplus*, pero la resistencia metabólica hacia estos productos generalmente han sido atribuidos a la citocromo P450s, esterasas y glutatión S-Transferasas (Bellgard et al., 2012). Estudios de bioensayos y sinergistas han sido realizados para proporcionar evidencia sobre los mecanismos de resistencia a los organofosforados y carbamatos, no identificándose mecanismos específicos por lo que la resistencia puede ser compleja y multigénica. Se sabe muy poco acerca de los mecanismos de resistencia que están activos en amitraz, fipronil y las ivermectinas (IVM). Las IVM cada vez son más utilizadas para el control de garrapatas; el sitio de acción es el canal de cloro dependiente de glutamato, los cuales se encuentran presentes en las células musculares y nerviosas de los invertebrados. Es importante mencionar que, una vez que la resistencia se encuentra presente en una zona, los productores se enfrentan con la problemática de ineffectividad de los ixodicidas que utilizan como métodos de control, es entonces cuando el productor decide realizar algunas

		5	15	25	35	45	55
Cepa Mozo		-----	-----	-----	ACGATC	TGGGCGGCCA	GGTGCGCTAC
Cepa México		-----	-----	-----	TTGTCAAT	ATGATTTTAT	TTTGA CTGAT
Cepas SusMex		-----	-----	-----	TTGTCAAT	ATGATTTTAT	TTTGA CTGAT
		65	75	85	95	105	115
Cepa Mozo		CTGACGCTCA	CCGAACCGGA	CAAGCTTTGG	AAGCCGGACC	TTTTCTTCTC	CAACGAGAAA
Cepa México		AGTGACCTGT	TCGTTGCAAC	AAATTGATGA	GCAATGCTTT	TTTATAATGC	CAACTTTTGA
Cepa SusMéx		AGTGACCTGT	TCGTTGCAAC	AAATTGATGA	GCAATGCTTT	TTTATAATGC	CAACTTTTGA
		125	135	145	155	165	175
Cepa Mozo		GAGGGACACT	TCCACAACAT	CATCATGCCC	AACGTGCTTC	TACGAATACA	TCCCAACGGC
Cepa México		CAAAAAAGCA	GGCTCCGCGG	CCGCCCCCTT	CACCTGCTTC	TACGAATACA	TCCCAACGGC
Cepa Sus Méx		CAAAAAAGCA	GGCTCCGCGG	CCGCCCCCTT	CACCTGCTTC	TACGAATACA	TCCCAACGGC
		185	195	205	215	225	235
Cepa Mozo		GACGTTCTCT	TCAGCATCAG	AATATCCTTG	GTGCTTTTCAT	GTCCAATGAA	CCTGAAATTT
Cepa México		GACGTTCTCT	TCAGCATCAG	AATATCCTTG	GTGCTTTTCAT	GTCCAATGAA	CCTGAAATTT
Cepa Sus Méx		GACGTTCTCT	TCAGCATCAG	AATATCCTTG	GTGCTTTTCAT	GTCCAATGAA	CCTGAAATTT
		245	255	265	275	285	295
Cepa Mozo		TATCCTTTGG	ATAAACAAAT	CTGCTCTATC	GTCATGGTGA	GCTATGGGTA	CACAACAGAG
Cepa México		TATCCTTTGG	ATAAACAAAT	CTGCTCTATC	GTCATGGTGA	GCTATGGGTA	CACAACAGAG
Cepa Sus Méx		TATCCTTTGG	ATAAACAAAT	CTGCTCTATC	GTCATGGTGA	GCTATGGGTA	CACAACAGAG
		305	315	325	335	345	355
Cepa Mozo		GACCTGGTTT	TCCTATGGAA	AGAGGGGGAT	CCTGTACAGG	TCACGAAAAA	TCTCCACTTG
Cepa México		GACCTGGTTT	TCCTATGGAA	AGAGGGGGAT	CCTGTACAGG	TCACGAAAAA	TCTCCACTTG
Cepa SusMéx		GACCTGGTTT	TCCTATGGAA	AGAGGGGGAT	CCTGTACAGG	TCACGAAAAA	TCTCCACTTG
		365	375	385	395	405	415
Cepa Mozo		CCACGTTTCA	CGCTGGAAAG	GTTCCAAACC	GACTACTGCA	CCAGTCGGAC	CAACACTGGC
Cepa México		CCACGTTTCA	CGCTGGAAAG	GTTCCAAACC	GACTACTGCA	CCAGTCGGAC	CAACACTGGC
Cepa Sus Méx		CCACGTTTCA	CGCTGGAAAG	GTTCCAAACC	GACTACTGCA	CCAGTCGGAC	CAACACTGGC
		425	435	445	455	465	475
Cepa Mozo		GAGTACAGCT	GCTTGCGCGT	GGACCTGGTG	TTCAAGCGCG	AGTTCAGCTA	CTACCTGATC
Cepa México		GAGTACAGCT	GCTTGCGCGT	GGACCTGGTG	TTCAAGCGCG	AGTTCAGCTA	CTACCTGATC
Cepa Sus Méx		GAGTACAGCT	GCTTGCGCGT	GGACCTGGTG	TTCAAGCGCG	AGTTCAGCTA	CTACCTGATC
		485	495	505	515	525	535
Cepa Mozo		CAGATCTACA	TCCCCTGCTG	CATGCTGGTC	ATCGTGTCTT	GGGTGTCGTT	CTGGCTCGAC
Cepa México		CAGATCTACA	TCCCCTGCTG	CATGCTGGTC	ATCGTGTCTT	GGGTGTCGTT	CTGGCTCGAC
Cepa Sus Méx		CAGATCTACA	TCCCCTGCTG	CATGCTGGTC	ATCGTGTCTT	GGGTGTCGTT	CTGGCTCGAC
		545	555	565	575	585	595
Cepa Mozo		CCCACCTCGA	TCCCGGCGCG	AGTGTGCTG	GGCGTCACCA	CCCTGCTCAC	CATGGCTACA
Cepa México		CCCACCTCGA	TCCCGGCGCG	AGTGTGCTG	GGCGTCACCA	CCCTGCTCAC	CATGGCTACA
Cepa Sus Méx		CCCACCTCGA	TCCCGGCGCG	AGTGTGCTG	GGCGTCACCA	CCCTGCTCAC	CATGGCTACA
		605	615	625	635	645	655
Cepa Mozo		CAGATATCGG	GCATCAACGC	CTCGCTGCCT	CCCGTTTCCT	ACACCAAGGC	CATTGACGTG
Cepa México		CAGATATCGG	GCATCAACGC	CTCGCTGCCT	CCCGTTTCCT	ACACCAAGGC	CATTGACGTG
Cepa Sus Méx		CAGATATCGG	GCATCAACGC	CTCGCTGCCT	CCCGTTTCCT	ACACCAAGGC	CATTGACGTG
		665	675	685	695	705	715
Cepa Mozo		TGGACCGGCG	TCTGTCTGAC	CTTCGTATTC	GGCGCGCTCT	TCGAGTTTCG	CCTGGTCAAC
Cepa México		TGGACCGGCG	TCTGTCTGAC	CTTCGTATTC	GGCGCGCTCT	TCGAGTTTCG	CCTGGTCAAC
Cepa Sus Méx		TGGACCGGCG	TCTGTCTGAC	CTTCGTATTC	GGCGCGCTCT	TCGAGTTTCG	CCTGGTCAAC
		725	735	745	755	765	775
Cepa Mozo		TACGCCTCGT	GGTCAGATTG	ACGCCGCGAG	AACACGCAGA	AGCAGAAGCA	GAGGAAATGG
Cepa México		TACGCCTCGT	GGTCAGATTG	ACGCCGCGAG	AACACGCAGA	AGCAGAAGCA	GAGGAAATGG
Cepa Sus Méx		TACGCCTCGT	GGTCAGATTG	ACGCCGCGAG	AACACGCAGA	AGCAGAAGCA	GAGGAAATGG
		785	795	805	815	825	835
Cepa Mozo		GAGCTCGAGC	CACCCCTGGA	CTCGGACCAC	CTGGAGGACG	GCGCCACTAC	ATTGCGCATG
Cepa México		GAGCTCGAGC	CACCCCTGGA	CTCGGACCAC	CTGGAGGACG	GCGCCACTAC	ATTGCGCATG
Cepa Méx Sus		GAGCTCGAGC	CACCCCTGGA	CTCGGACCAC	CTGGAGGACG	GCGCCACTAC	ATTGCGCATG
		845	855	865	875	885	895
Cepa Mozo		AGGCCGCTGG	TGCACCACCA	CGGCGAGTTG	CACGCCGACA	AGCTGCGGCA	GTGCGAAGTG
Cepa México		AGGCCGCTGG	TGCACCACCA	CGGCGAGTTG	CACGCCGACA	AGCTGCGGCA	GTGCGAAGTG
Cepa Sus Méx		AGGCCGCTGG	TGCACCACCA	CGGCGAGTTG	CACGCCGACA	AGCTGCGGCA	GTGCGAAGTG
		905	915	925	935	945	955
Cepa Mozo		CACATGAAGA	CCCCCAAGAC	GAACCTTTGC	AAGGCCTGGC	TTTCCAGGTT	TCCCACGCGA
Cepa México		CACATGAAGA	CCCCCAAGAC	GAACCTTTGC	AAGGCCTGGC	TTTCCAGGTT	TCCCACGCGA
Cepa Sus Méx		CACATGAAGA	CCCCCAAGAC	GAACCTTTGC	AAGGCCTGGC	TTTCCAGGTT	TCCCACGCGA
		965	975	985	995	1005	1015
Cepa Mozo		TCCAAACGCA	TCGACGTCGT	CTCGCGGATC	TTCTTTCCGC	TCATGT	
Cepa México		TCCAAACGCA	TCGACGTCGT	CTCGCGGATC	TTCTTTCCGC	TCATGT	
Cepa Sus Méx		TCCAAACGCA	TCGACGTCGT	CTCGCGGATC	TTCTTTCCGC	TCATGT	

Figura 3. Alineamiento múltiple de las secuencias del gen *GluCl* de *R. microplus*. Se muestra el alineamiento de las secuencias obtenidas de las muestras analizadas de la cepa susceptible y resistente. En los recuadros azules (T,C,C) se muestran las bases que difieren de las cepas mexicanas comparadas con la cepa Mozo; en el recuadro amarillo se muestra la secuencia CACC que fue añadida a los primers para poder insertarse a la secuencia del vector. Los recuadros de fondo blanco con letras negras son las bases conservadas en las secuencias alineadas.

acciones para seguir utilizándolos, como son: incrementar la concentración recomendada y números de tratamientos; cambiar a otro producto con un gradiente diferente. Estas acciones dan como resultado un gasto adicional en el control de las garrapatas.

En esta investigación no se realizó ningún ensayo en donde se descartara la participación de otros mecanismos que pudieran estar participando en la detoxificación de la IVM, por lo que es probable que otros se encuentren involucrados en la resistencia. Los resultados expuestos en este trabajo son parciales y actualmente se continúa investigando este gen del canal de cloro y la resistencia a las IVM.

CONCLUSIONES

Se encontraron sustituciones de nucleótidos en el RNA del gen GluCl dependiente de glutamato en la cepa Resistente y Susceptible a IVM al ser comparadas con la secuencia reportada en el GenBank.

AGRADECIMIENTOS

Fondo para el Fortalecimiento de la Investigación 2012.

REFERENCIAS

- Aguilar-Tipacamú, G. & Rodríguez-Vivas, R.I. (2003). Effect of moxidectin against natural infestation of the cattle tick *Boophilus microplus* (Acarina: Ixodidae) in the Mexican tropics. *Veterinary Parasitology*, 111: 211-216.
- Aguilar-Tipacamú, G.; Miller, R.J.; Hernández-Ortiz, R.; Rodríguez-Vivas, R.I. & Vásquez P.C. (2008). Inheritance of pyrethroid resistance and a sodium channel gene mutation in the cattle tick *Boophilus microplus*. *Parasitology Research*, 103: 633-639.
- Bellgard, M.I.; Moolhuijzen, P.M.; Guerrero, F.D.; Schibeci, D.; Rodríguez-Valle, M.; Peterson, D.G. et al. (2012). Cattle TickBase: An integrated internet-based bioinformatics resource for *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Int J parasitol*, 42(2): 161-169.
- Brossard, M. & Wikel, S.K. (2004). Tick immunobiology. *Parasitology*, 129: 161-176.
- Castro-Janer, E., L. Rifran, P. González, C. Niell, J. Piaggio, A. Gil & Schumaker. (2011). Determination of the susceptibility of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) to ivermectin and fipronil by Larval Immersion Test (LIT) in Uruguay. *Veterinary Parasitology*, 12: 148-155.
- Cossío-Bayúgar, R.; Miranda, E. & Holman P.J. (2005). Molecular cloning of a phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase gene from the tick, *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35: 1378-1387.
- Cully, D.F.; Vassilatis, D.K.; Liu, K.K.; Pares, P.S.; Van der Ploeg, L.H.T.; Schaeffer, J.M. & Arena, J.P. (1994). Cloning of an avermectin-sensitive glutamate-gated chloride channels from *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 371, 707-711.
- Forrester, S.G.; Hamdan, F.F.; Prichard, R.K. & Beech, R.N. (1999). Cloning, Sequencing, and Developmental Expression Levels of a Novel Glutamate-Gated Chloride Channel Homologue in the Parasitic Nematode *Haemonchus contortus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 254, 529-534.
- Guerrero, F.D.; Lovis, L. & Martins, J.R. (2012). Acaricide resistance mechanisms in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria*, 21:1, 1-6.
- Jongejan, F. & Uilenberg, G. (2004). The global importance of ticks. *Parasitology* 129: S3-S14.
- Klafke, G.M.; Aguilar de Albuquerque, T.; Miller, R.J. & Sato Schumaker, T.T. (2010). Selection of an ivermectin-resistant strain of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) in Brazil. *Veterinary Parasitology*, 168: 97-104.
- Klafke, G.M.; Sabatini, G.; De Albuquerque, T.; Martins, J.R.; Kemp, D.; Miller, R.J. & Schumaker, T. (2006). Larval immersion tests with ivermectin populations of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) from State of Sao Paulo, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 142 (3): 386-390.
- Lee, H.S.; Yoon, S.K.; Williamson, S.M.; Goodson, J.S.; Lee, T.M.; Edman, D.J.; Devonshire, L.A. & Clark, M.J. (2000). Molecular analysis of kdr-like resistance in permethrin-resistant strains of head lice, *Pediculus capitis*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 66: 130-143.
- Martins, J. & Furlong, J. (2001). Ivermectin resistance of the cattle tick *Boophilus microplus* in Brazil. *Veterinary Record*, 149: 64.
- Pérez-Cogollo, L.C.; Rodríguez-Vivas, R.I.; Ramírez-Cruz, G.T. & Miller R.J. (2010). First report of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* resistant to ivermectin in Mexico. *Veterinary Parasitology*, 168: 165-169.
- Pohl, C.P.; Carvalho, D.D.; Daffre, S.; Da Silva I.V. & Masuda A. (2014). In vitro establishment of ivermectin-resistant *Rhipicephalus microplus* cell line and the contribution of ABC transporters on the resistance mechanism. *Veterinary Parasitology*, 204: 316-322.
- Pohl, C.P.; Klafke, M.G.; Carvalho, D.D.; Martins, J.R.; Daffre, S.; Da Silva, I.V. & Masuda, A. (2011). ABC transporter efflux pumps: A defense mechanism against ivermectin in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *International Journal of Parasitology*, 41: 1323-1333.
- 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. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 42, 115-123.
- Rodríguez-Vivas, R.I.; Rivas, A.L.; Chowell, G.; Fragoso, S.H.; Rosario, C.R.; García, Z.; Smith, S.D.; Williams, J.J. & Schwager, S.J. (2007). Spatial distribution of acaricide profiles (*Boophilus microplus* strains susceptible or resistant to acaricides) in southeastern Mexico. *Veterinary Parasitology*, 146: 158-169.
- Rosario-Cruz, R.; Guerrero, F.D.; Miller, R.J.; Rodríguez-Vivas, R.I.; Domínguez-García, D.I.; Cornel, A.J.; Hernández-Ortiz, R. & George, E.J. (2005). Roles played by esterase activity and by a sodium channel mutation involved in pyrethroid resistance in populations of *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acari: Ixodidae) collected from Yucatan, Mexico. *Journal Medical Entomology*, 42(6): 1020-1025.
- Stone, B.F. (1972) The genetics of resistance by ticks to acaricides. *Australian Veterinary Journal* 48: 345-350.