

# Resistencia a los acaricidas en *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: situación actual y mecanismos de resistencia

## Acaricide resistance in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: Current status and mechanisms of resistance

Roger Iván Rodríguez-Vivas<sup>a</sup>, Jane E. Hodgkinson<sup>b</sup>, Alexander J. Trees<sup>b</sup>

### RESUMEN

*Rhipicephalus (Boophilus) microplus* es una plaga endémica de ganado en las regiones tropicales y subtropicales del mundo, causando grandes pérdidas económicas a los productores de ganado. Acaricidas químicos han desempeñado un papel fundamental en el control de *R. (B.) microplus*; sin embargo, como consecuencia de su uso extensivo, esta especie ha desarrollado resistencia a todas las clases principales de acaricidas en todo el mundo. Resistencia a organofosforados, piretroides sintéticos y amitraz se ha observado principalmente en Australia y Latinoamérica. La resistencia acaricida en garrapatas se confiere principalmente por dos mecanismos fisiológicos importantes: insensibilidad del sitio y desintoxicación metabólica. Solo o en combinación, estos mecanismos confieren resistencia a todas las clases disponibles de acaricidas. En la presente revisión presentamos el Estado de *R. (B.) microplus* resistente a acaricidas en todo el mundo (con énfasis en México), y los mecanismos más importantes implicados en este fenómeno.

**PALABRAS CLAVE:** Resistencia; *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*; Acaricidas, Mecanismos de resistencia.

### ABSTRACT

*Rhipicephalus (Boophilus) microplus* is an endemic cattle pest in tropical and subtropical regions of the world, causing major economic losses to cattle producers. Chemical acaricides have played a pivotal role in the control of *R. (B.) microplus*; however, as a consequence of extensive use of acaricides, this tick specie has developed resistance to all major classes of acaricides worldwide. Resistant to organophosphates, synthetic pyrethroids and amitraz has been reported mainly in Australia and Latinamerica. The acaricide resistance in ticks is conferred primarily by two major physiological mechanisms: target site insensitivity and metabolic detoxification. Alone and or in combination these mechanisms confer resistance to all of the available classes of acaricides. In the present review we present the current status of *R. (B.) microplus* resistant to acaricides worldwide (with emphasis in Mexico) and the most important mechanisms involved in this phenomenon.

**KEY WORDS:** Resistance, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, Acaricides, Mechanisms of resistance.

### INTRODUCCIÓN

Las garrapatas son artrópodos hematófagos pertenecientes a la clase de los arácnidos. Las garrapatas son ectoparásitos obligados, alimentándose de sangre de los vertebrados, especialmente mamíferos y aves. Son relativamente grandes y de estadios longevos, de alimentación periódica, teniendo grandes ingestas de sangre. Las mordeduras de garrapata pueden dañar directamente a animales, causando irritación, inflamación o hipersensibilidad, y cuando se presenta en grandes números hay anemia y pérdidas en la producción. Las secreciones salivales de algunos ácaros pueden causar toxicosis y parálisis; Sin embargo, más importante aún, cuando se adhieren y alimentan son capaces de transmitir una serie de

### INTRODUCTION

Ticks are haematophagous arthropods belonging to the class arachnids. Ticks are obligate, blood-feeding ectoparasites of vertebrates, particularly mammals and birds. They are relatively large and stages are long-lived, feeding periodically, taking large blood meals. Tick bites may be directly damaging to animals, causing irritation, inflammation or hypersensitivity, and, when present in large numbers, anaemia and production losses. The salivary secretions of some ticks may cause toxicosis and paralysis; however, more importantly, when they attach and feed they are capable of transmitting a number of pathogenic viral, bacterial, rickettsial and protozoal diseases<sup>(1)</sup>.

Approximately one billion cattle, most of which

<sup>a</sup> Departamento de Parasitología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma de Yucatán. Km 15.5 carretera Mérida-Xmatkuil. C.P. 97100 Mérida, Yucatán, México. Tel.: +52(999)942-3200; Fax: +52(999)942-3205. rvivas@tunku.uady.mx Correspondencia al primer autor.

<sup>b</sup> Department of Veterinary Pathology. Faculty of Veterinary Science. University of Liverpool. Liverpool, UK.

enfermedades virales, bacterianas, rickettsiales y protozoarios patógenos<sup>(1)</sup>.

Aproximadamente mil millones de cabezas de ganado, la mayoría de los cuales están en los trópicos, están expuestos a diversas especies de garrapatas o enfermedades que transmiten<sup>(2)</sup>, causando pérdidas de producción. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Notar cambio del nombre genérico de *Boophilus* a *Rhipicephalus*, Murrell *et al.*<sup>(3)</sup> Beati y Keirans<sup>(4)</sup>) es una plaga endémica de ganado en las regiones tropicales y subtropicales del mundo, causando grandes pérdidas económicas a los productores de ganado a través de efectos físicos directos en los animales parasitados e indirectamente a través de la transmisión de la enfermedad de agentes infecciosos como *Babesia bovis*, *B. bigemina* y *Anaplasma marginale*<sup>(5,6,7)</sup>. Además de los costos de los productos químicos, mano de obra, equipamiento y pérdidas de producción asociadas con el tratamiento, es muy caro el costo de mantener las garrapatas bajo control<sup>(8)</sup>.

Se ha demostrado que cada garrapata adulta ingurgitada es capaz de reducir la ganancia de peso en 0.6 g en ganado bovino<sup>(9)</sup> de la cual el 65 % fue atribuido a la infestación por las garrapatas (estrés y anorexia de la irritación que causan) y 35 % por la pérdida de sangre<sup>(10)</sup>. En Australia, las pérdidas causadas por *R. (B.) microplus* se estima en 100 millones de dólares australianos por año, aunado a que la ganancia de masa corporal o rendimiento lechero también se sabe que disminuyen<sup>(11)</sup>. En el último estudio en México el costo estimado de las pérdidas de producción, mortalidad, daños indirectos y por control de *R. (B.) microplus* y las enfermedades que transmite fue estimado en 48 millones de dólares americanos por año<sup>(12)</sup>.

Los métodos actuales para el control de la garrapata implican el uso de métodos químicos y no químicos, y la aplicación sistemática de dos o más métodos (manejo integrado de plagas). Aunque el control de las garrapatas se basa principalmente en el uso de productos químicos, el desarrollo de resistencia a estos compuestos es una grave amenaza para la sostenibilidad de este enfoque. El desarrollo de resistencia en artrópodos depende de la frecuencia de aplicación de los insecticidas, así como ciclos de vida de los insectos. La resistencia de *R. (B.) microplus* a

are in the tropics, are at risk from various tick species or tick-borne diseases<sup>(2)</sup>, causing significant production losses. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (change of the generic name *Boophilus* to *Rhipicephalus*, Murrell *et al.*<sup>(3)</sup>, Beati and Keirans<sup>(4)</sup>) is an endemic pest of cattle in tropical and subtropical regions of the world, causing major economic losses to cattle producers through direct physical effects on the parasitized animal and indirectly through disease transmission of infectious agents such as *Babesia bovis*, *B. bigemina* and *Anaplasma marginale*<sup>(5,6,7)</sup>. In addition to the costs of chemicals, labor, equipment and production losses associated with treatment, the cost of maintaining tick boundaries is highly expensive<sup>(8)</sup>. Each engorged female tick has been shown to reduce weight gain by 0.6 g in beef cattle<sup>(9)</sup> of which 65 % was attributed to tick infestation (stress and anorexia from the irritation cause by the ticks) and 35 % by loss of blood taken by the ticks<sup>(10)</sup>. In Australia, losses caused by *R. (B.) microplus* are estimated to be 100 million Australian dollars per annum, live-mass gains and milk yield have also been known to drop<sup>(11)</sup>. In the last study reported in Mexico, the estimated cost of production losses, mortality, hide damage and control of *R. (B.) microplus* and its transmitted diseases was estimated to be \$48 million American dollars per annum<sup>(12)</sup>.

Current tick-control methods involve use of non-chemical and chemical methods, and the systematic application of two or more methods (integrated pest management). Although the control of ticks relies heavily on the use of chemicals, the development of resistance to these compounds is a serious threat to the sustainability of this approach. The development of resistance in arthropods is dependent on the frequency of application of the insecticides, as well as the insects' life cycles. *R. (B.) microplus* resistance to organophosphates (OPs), synthetic pyrethroids (SPs) and amitraz has been reported worldwide, mainly in Australia, and Latinoamerica<sup>(13-16)</sup>. This acaricide resistance in ticks is conferred primarily by two major physiological mechanisms: insensitivity target and enhanced activity of metabolic enzymes, such as esterases, mixed function oxidases and glutathion-S-transferases<sup>(13)</sup>.

organofosforados (OPs), piretroides sintéticos (SPs) y amitraz se ha descrito alrededor del mundo, principalmente en Australia y Latinoamérica<sup>(13-16)</sup>. Esta resistencia de las garrapatas a los acaricidas es conferida principalmente por dos importantes mecanismos fisiológicos: Insensibilidad del sitio y el incremento en la actividad de enzimas metabólicas, tales como esterasas, oxidasas mixtas y glutation-S-transferasas<sup>(13)</sup>. El objetivo de este trabajo es presentar una revisión del estado actual de *R. (B.) microplus* resistente a los acaricidas en todo el mundo (con énfasis en México) y los mecanismos más importantes implicados en este fenómeno.

### **Estado actual de la resistencia a acaricidas** **Resistencia de la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus)* a los acaricidas alrededor del mundo**

Desde el primer informe del desarrollo de resistencia de *R. (B.) microplus* a arsenicales en Australia en 1937<sup>(17)</sup>, la evolución progresiva de la resistencia de las garrapatas a casi todos los acaricidas disponibles que afectan el ganado, ha frustrado los esfuerzos de los productores de ganado para manipularla y controlar la enfermedades que transmite y que afectan a sus animales. La historia de la resistencia de garrapatas a acaricidas corre en paralelo, con un retraso relativo en algunos años, con la introducción de nuevos productos acaricidas que representan diferentes clases de sustancias químicas<sup>(18)</sup>. En el Cuadro 1 se presentan registros seleccionados de la distribución geográfica y el año de la documentación del primer informe de resistencia acaricida en *R. (B.) microplus* en todo el mundo.

En los últimos años, la resistencia al amitraz<sup>®</sup> también se ha encontrado en poblaciones de *R. (B.) microplus* de Colombia<sup>(19)</sup>, Brasil<sup>(20,21)</sup> y México<sup>(15,16)</sup>. Resistencia de *R. (B.) microplus* a Lactonas Macrocíclicas (MLs) en Brasil contra doramectina y moxidectina fue descrita en las garrapatas de un predio. Recientemente, Pérez-Cogollo *et al*<sup>(22)</sup> informaron por primera vez de la resistencia a la Ivermectina en poblaciones de *R. (N.) microplus* de México. El uso generalizado de la MLs para control de parásitos (endo y ectoparásitos) y una opción limitada de acaricidas

The purpose of this paper is to present the current status of *R. (B.) microplus* resistant to acaricides worldwide (with emphasis in Mexico) and the most important mechanisms involved in this phenomenon.

### **Current status of acaricide resistance** **Worldwide acaricide resistance in *Rhipicephalus (Boophilus) ticks***

Since the first report of the development of resistance of *R. (B.) microplus* to arsenicals in Australia in 1937<sup>(17)</sup>, the progressive evolution of resistance in ticks affecting cattle to almost all of the available acaricide has frustrated the efforts of cattle producers to manage ticks and tick-borne diseases affecting their animals. The history of the resistance of ticks to acaricides parallels, with a relative few years of delay, the introduction of new acaricide products representing several different classes of chemicals<sup>(18)</sup>. Selected records of the geographic distribution and year of documentation of first report of acaricide resistance in *R. (B.) microplus* worldwide are presented in Table 1.

In recent years, resistance to amitraz<sup>®</sup> was also found in *R. (B.) microplus* populations from Colombia<sup>(19)</sup>, Brazil<sup>(20,21)</sup> and Mexico<sup>(15,16)</sup>. Macrocylic lactones (MLs) resistance of *R. (B.) microplus* in Brazil to doramectin and moxidectin was reported in ticks from one farm. Recently, Pérez-Cogollo *et al*<sup>(22)</sup> reported for the first time in Mexico populations of *R. (B.) microplus* resistant to ivermectin. The widespread use of MLs for parasite control (endo and ectoparasite) and limited choice of alternative acaricides has caused concern that ML resistance will become a major problem.

The emerging of resistance in *R. (B.) microplus* to OPs, SPs, amitraz and MLs in Australia and Latino America does not mean that none of the products containing these kinds of active ingredients have any further value. Tick populations susceptible to a variety of acaricides exist and can be controlled, but it is more critical than ever to use existing and improved diagnostic tools to determine where products are still useful and to employ tick control strategies that minimize the rate of selection for resistance<sup>(18)</sup>.

alternativos es motivo de preocupación de que la resistencia de MLs se convierta en un problema grave. Como en el caso de la resistencia emergente en *R. (B.) microplus* a los productos OPs, SPs, amitraz y MLs en Australia y América Latina no significa que algunos de los productos que contengan este tipo de ingredientes activos, no tengan más validez. Existen poblaciones de garrapatas que son susceptibles a una gran variedad de acaricidas y que pueden ser controladas, pero ahora es más importante que nunca utilizar las herramientas de diagnóstico existentes y mejoradas para determinar en qué sitio, esos productos son útiles todavía y emplear estrategias de control de garrapatas que minimicen la tasa de selección de resistencia<sup>(18)</sup>.

### Resistencia a los Acaricidas en *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en México

Los acaricidas organofosforados fueron profusamente utilizados en la Campaña Nacional de erradicación de la garrapata entre 1974 y 1984 en México<sup>(23)</sup>. Los OPs empleados durante ese período incluyen coumaphos, chlorpyrifos, chlorfenvinphos, diazinón y Etión. El primer caso de resistencia a OPs se detectó en garrapatas *R. (B.) microplus* de un rancho en el sur de México (Tuxpan, Veracruz) en 1983. La cepa de garrapatas establecida a partir de esa ubicación demostró 10 a 14 veces (esto es, necesita de 10 a 14 veces más concentración del acaricida en comparación con la cepa susceptible de referencia) la resistencia a coumaphos, chlorpyrifos y Etión<sup>(24)</sup>. La resistencia a los OPs pronto se generalizó en las regiones central, oriental y meridional de México. A continuación, se introdujeron en México en 1986 los acaricidas Piretroides sintéticos, para aliviar los problemas de resistencia a OPs. La resistencia a SPs fue detectada por primera vez en 1993 y pronto se difundió de manera extensiva<sup>(25)</sup>. Los niveles de resistencia a SPs fueron generalmente en la escala de 10 - a 350 veces, con la excepción de dos poblaciones de garrapatas en las se detectó un incremento de la resistencia en más de 1,000 veces<sup>(26)</sup>. Como resultado de la intensa presión de selección por el uso de OPs y SPs. se encontró que *R. (B.) microplus* ha desarrollado resistencia a ambas clases de acaricidas en por lo menos 15 Estados de la república mexicana<sup>(27)</sup>.

Cuadro 1. Informes de casos de resistencia de la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* a los acaricidas

Table 1. An overview of occurrences of acaricide resistance in the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Chemical compound (~ date introduced)	Location
Arsenic (1893)	Australia, 1936; Argentina, 1936; Brazil, 1948; Colombia, 1948; Uruguay, 1953; Venezuela, 1966
DDT (1946)	Argentina, 1953; Brazil, 1953; Australia, 1953; Venezuela, 1966
Organophosphate and Carbamates (1944)	Australia, 1963; Argentina, 1964; Brazil, 1963; Colombia, 1967; Venezuela, 1967; 1979; Uruguay, 1983; México, 1986
Formamidines (1975)	Australia, 1978; Brazil, 1989; México, 1994; Venezuela, 1995; Colombia, 1997; Argentina, 2000
Pyrethroids (1977)	Australia, 1981; Brazil, 1995; Colombia, 2000
Macrocyclic lactones (1981)	Brazil, 2001; Mexico, 2010

Adapted from George *et al.*<sup>(18)</sup>

### Acaricide resistance in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in Mexico

Organophosphate acaricides were heavily used in the national tick eradication program between 1974 and 1984 in Mexico<sup>(23)</sup>. The OPs used during that period include coumaphos, chlorpyrifos, chlorfenvinphos, diazinon and ethion. The first case of OP resistance was detected in *R. (B.) microplus* ticks from a farm in the southern part of Mexico (Tuxpan, Veracruz) in 1983. The tick strain established from this location demonstrated 10- to 14-fold (shows 10-14 fold resistance when compared with a susceptible reference strain) resistance to coumaphos, chlorpyrifos and ethion<sup>(24)</sup>. Resistance to OPs soon became widespread in central, eastern and southern Mexico. Pyrethroid acaricides were then introduced into Mexico in 1986 in order to alleviate OPs resistance problems. Resistance to SPs was first detected in 1993 and soon became extensive<sup>(25)</sup>. The levels of resistance to SPs were generally in the range of 10- to 350-fold, with the exception of two tick populations in which more than 1000-fold

Junto con los SPs también se introdujo en 1986, el amitraz, pero su uso fue inicialmente limitado debido a un costo mayor. El uso de amitraz se volvió más frecuente después de 1993, cuando empezaron los problemas de resistencia a SP y obstaculizaron los esfuerzos para controlar la garrapata en el país. El primer caso de resistencia de amitraz en México se informó en 2002<sup>(28)</sup>. Más recientemente, Rodríguez Vivas *et al*<sup>(16)</sup> estudiaron 217 poblaciones de campo de *R. (B.) microplus* y determinaron la prevalencia (medida por bioensayos) de los ranchos con resistencia a SPs, OPs y amitraz en el sur de México y encontraron que la resistencia a SP como la cipermetrina, deltametrina y flumethrin fue uno de los problemas más graves en el trópico mexicano (de 66 a 96 % granjas mostraron resistencia a SPs). Además, Rodríguez Vivas *et al.*<sup>(14)</sup> estudiaron otras 98 poblaciones de campo de *R. (B.) microplus* en Yucatán, México y encontraron que el 63, 61 y 59 % de las poblaciones de garrapatas eran resistentes a flumethrina, deltametrina y cipermetrina, respectivamente. La resultante de *R. (B.) microplus* resistente a las tres clases de acaricidas en México, pone de relieve la gravedad de la condición de resistencia y la importancia de tener una estrategia de manejo en México<sup>(16)</sup>.

### **Mecanismos de resistencia a los acaricidas en *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***

La resistencia se define como la capacidad de soportar dosis mayores de un tóxico, que normalmente serían letales para la mayoría de los individuos en una población típica de la misma especie<sup>(29)</sup>. Los mecanismos de la resistencia en la mayoría de las garrapatas puede dividirse en dos grupos, insensibilidad del sitio de destino y metabólicas<sup>(30,31)</sup>. Solos o en combinación, estos mecanismos confieren resistencia a todas las clases disponibles de acaricidas.

#### ***Insensibilidad del sitio de destino***

**Canal de sodio:** Resistencia a SPs se observó en una cepa resistente al DDT de la mosca común, *Musca domestica* y se denominó resistencia de derribe o *kdr*<sup>(32)</sup>. Análisis posteriores identificaron también un tipo de resistencia a SP-mayor llamado *super-kdr*<sup>(33)</sup>. Vinculada genéticamente con el locus de gen del canal de sodio, las bases

resistencia was detected<sup>(26)</sup>. As a result of intense selection pressure from the use of OPs and SPs. *R. (B.) microplus* were found to have developed resistance to both classes of the acaricides in at least 15 States of Mexico<sup>(27)</sup>.

In addition to the SPs, amitraz was also introduced in 1986, but its use was initially limited due to a higher cost. The use of amitraz became more frequent after 1993 when SPs resistance problems started to hinder the tick control efforts in Mexico. The first case of amitraz resistance in Mexico was reported in 2002<sup>(28)</sup>. Recently, Rodríguez-Vivas *et al*<sup>(16)</sup> studied 217 field populations of *R. (B.) microplus* and determined the prevalence (measured by bioassays) of farms with resistance to SPs, OPs and amitraz in the southern Mexico, and they found that SP resistance such as deltamethrin, cypermethrin and flumethrin was one of the most serious problems in the Mexican tropics (from 66 to 96 % farms showed resistance to SPs). Furthermore, Rodríguez-Vivas *et al*<sup>(14)</sup> studied 98 field populations of *R. (B.) microplus* in Yucatan, Mexico and found that 63 , 61 and 59 % of those tick populations were resistant to flumethrin, deltamethrin and cypermethrin, respectively. The findings of *R. (B.) microplus* resistant to all three major classes of acaricides in Mexico underscores the seriousness of the resistance situation and the importance of having a resistance management strategy in Mexico<sup>(16)</sup>.

### **Mechanisms of acaricide resistance in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***

Resistance is defined as having the ability to withstand doses of toxicant which would normally be lethal to most individuals in a typical population of the same species<sup>(29)</sup>. Most resistance mechanisms in ticks can be divided into two groups, target site insensitivity and metabolic<sup>(30,31)</sup>. Alone and or in combination these mechanisms confer resistance to all of the available classes of acaricides.

#### ***Target Site Insensitivity***

**Sodium Channel:** Resistance to SPs was first observed in a DDT-resistant strain of the housefly, *Musca domestica*, and termed knockdown resistance or *kdr*<sup>(32)</sup>. Subsequent analysis also identified a greatly enhanced type of

moleculares de la resistencia *kdr* han sido investigadas en muchos insectos incluyendo las garrapatas<sup>(34)</sup>.

Mutaciones de resistencia *Knock-down* confieren una reducida sensibilidad neuronal a SPs y DDT en insectos<sup>(35)</sup>. *Kdr* mutaciones están vinculadas a los *para*-genes homólogos, descubiertos en varias especies de insectos<sup>(36)</sup>. Primero fue adoptado el término *para* referirse a la resistencia por parálisis en *Drosophila melanogaster*. Hay múltiples mutaciones puntuales en los *para*-genes homólogos asociados con la resistencia *kdr* y tipo-*kdr* a SPs en muchos insectos<sup>(37)</sup>. Ambas mutaciones, las comunes y las únicas en los genes del canal de sodio, se consideran como las responsables de la resistencia de SP en diferentes plagas, sean especies de insectos o arácnidos. Hasta la fecha, se han confirmado diez mutaciones de canal de sodio responsables de la resistencia *kdr* y tipo-*kdr* en muchos artrópodos<sup>(38,39)</sup>:

1. valina → metionina (V → M) en el gusano cogollero, *Heliothis virescens*.
2. metionina → isoleucina (M → I) en el piojo, *Pediculus capitis*.
3. leucina → fenilalanina (L → F) en el piojo *Pediculus capitis*.
4. leucina → fenilalanina/histidina/serina (L → F/H/S) en muchos insectos.
5. fenilalanina → isoleucina (F → I) en la garrapata *R. (B.) microplus*.
6. leucina → isoleucina (L → I), en la garrapata *R. (B.) microplus*
7. leucina → prolina (L → P) en el ácaro de las abejas, *Varroa destructor*.
8. treonina → isoleucina/cisteína/valina (T → I/C/V) en la polilla diamante *Plutella xylostella*; en piojos *Pediculus capitis*; el piojo de la flora occidental, *Frankliniella occidentalis* y la pulga del gato, *Ctenocephalides felis*.
9. metionina → treonina (M → T) en la mosca común, *Musca domestica* y la mosca del cuerno, *Haematobia irritans*.
10. cisteína → arginina (C → A) en la cucaracha alemana, *Blatella germanica*.
11. ácido aspártico → glicina, ácido glutámico → lisina, cisteína → arginina y prolina → leucina (E → K) en la cucaracha alemana *Blatella germanica*.

SP-resistencia called *super-kdr*<sup>(33)</sup>. Linked genetically to the sodium channel gene locus, the molecular basis for *kdr* resistance has been investigated in many insects including ticks<sup>(34)</sup>.

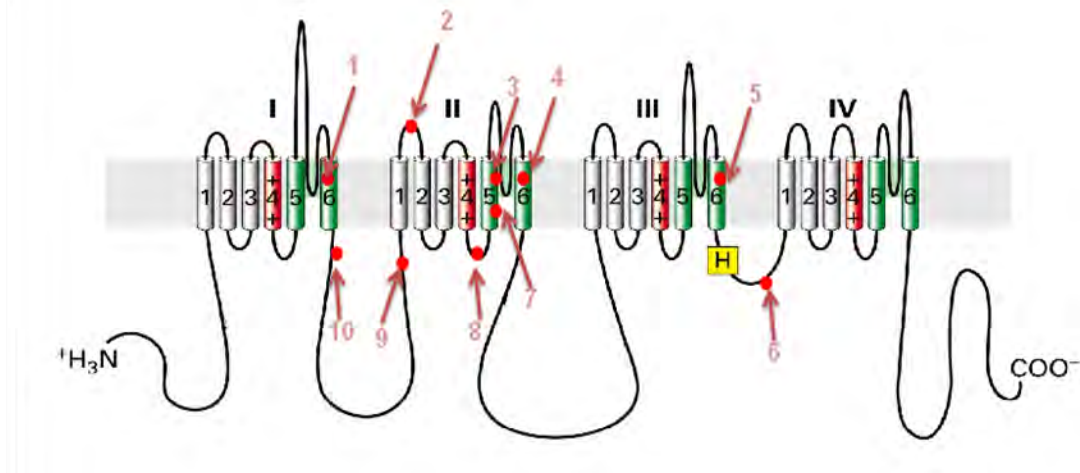
Knock down resistance mutations confer reduced neuronal sensitivity to SPs and DDT in insects<sup>(35)</sup>. *Kdr* mutations are linked to the *para*-homologous genes in several insect species<sup>(36)</sup>. The term *para* was first adopted to refer the paralytic resistance in *Drosophila melanogaster*. There are multiple point mutations in the *para*-homologous genes that are associated with *kdr* and *kdr*-type resistance to SPs in many insects<sup>(37)</sup>. Both common and unique mutations in sodium channel genes are found to be responsible for SP resistance in different insect and arachnid pest species. Up to date, ten sodium channel mutations have been confirmed to be responsible for *kdr* and *kdr*-type resistance in many arthropods<sup>(38,39)</sup>:

1. valine → methionine (V → M) in the tobacco budworm, *Heliothis virescens*.
2. methionine → isoleucine (M → I) in the head louse, *Pediculus capitis*.
3. leucine → phenylalanine (L → F) in the head louse, *Pediculus capitis*.
4. leucine → phenylalanine/histidine/serine (L → F/H/S) in many insects.
5. phenylalanine → isoleucine (F → I) in the cattle tick *R. (B.) microplus*.
6. leucine → isoleucine (L → I), in the cattle tick *R. (B.) microplus*
7. leucine → proline (L → P) in the honey bee mite, *Varroa destructor*.
8. threonine → isoleucine/cysteine/valine (T → I/C/V) in the diamondback moth, *Plutella xylostella*; head louse, *Pediculus capitis*; western flower thrip, *Frankliniella occidentalis* and cat flea, *Ctenocephalides felis*.
9. methionine → threonine (M → T) in the house fly, *Musca domestica* and horn fly, *Haematobia irritans*.
10. cysteine → arginine (C → A) in the German cockroach, *Blattella germanica*.
11. aspartic acid → glycine, glutamic acid → lysine, cysteine → arginine, and proline → leucine (E → K) in the German cockroach, *Blattella germanica*.

La Figura 1 muestra la localización de mutaciones *kdr* que han sido confirmadas por reducir la sensibilidad a SPs del canal de sodio en artrópodos. Información más completa sobre *kdr* mutaciones que confieren sensibilidad neuronal reducida a SPs se encuentra publicada<sup>(36,38,39)</sup>. Dong<sup>(38)</sup> indicó que nuevas mutaciones *kdr* probablemente serán identificadas en otras importantes plagas de artrópodos agrícolas o de animales, según se sigan utilizando SPs como la principal estrategia de control de plagas.

Figure 1 shows the localization of *kdr* mutations that have been confirmed to reduce the sodium channel sensitivity to SPs in arthropods. More comprehensive information on *kdr* mutations that confer reduced neuronal sensitivity to SPs is found in other works<sup>(36,38,39)</sup>. Dong<sup>(38)</sup> mentioned that new *kdr* mutations will likely be identified in other agricultural and medically important arthropod pests as SPs continue to be used as a major pest control strategy.

Figura 1. Mutaciones de la resistencia de derribe (*kdr*) en canales de sodio de diversos artrópodos.  
 Figure 1. Knock down resistance (*kdr*) mutations in insect sodium channels.



Solamente se muestran (como puntos rojos) aquellas mutaciones *kdr* en las que se ha confirmado la reducción de la sensibilidad a Piretroides sintéticos (SP). / Only those *kdr* mutations that have been confirmed to reduce the sodium channel sensitivity to SPs are indicated (solid red dots).

1 (V → M, *H. virescens*), 2 (M → I, *P. capitis*), 3 (L → F, *P. capitis*), 4 (L → F/HS, many insects), 5 (F → I, *R. (B.) microplus*), 6 (L → P, *V. destructor*), 7 (T → I/C/V, *P. xylostella*, *P. capitis*, *F. occidentalis*, *C. felis*), 8 (M → T, *M. domestica*, *H. irritans*; L → I, *R. (B.) microplus*), 9 (C → A, *B. germanica*), 10 (E → K, *B. germanica*).

Adapted from Lodish *et al.*<sup>(40)</sup>, Dong<sup>(38)</sup> and Morgan *et al.*<sup>(41)</sup>.

He *et al.*<sup>(42)</sup> investigaron el mecanismo molecular de la resistencia a los SPs en *R. (B.) microplus*, obtuvieron y secuenciaron parcialmente el cDNA del gene *para*- homólogo del canal de sodio de cepas de garrapatas susceptibles y resistentes a SP. La secuencia parcial del gene del canal de sodio se compone de 3599 bp (ADNc) (número de acceso del GenBank: AF134216). Una mutación puntual que da como resultado el cambio de un aminoácido F → I, que fue identificada en un dominio III segmento 6 (IIIS6) altamente conservada del canal de sodio homóloga de garrapatas, que fueron altamente

He *et al.*<sup>(42)</sup> investigated the molecular mechanism of resistance to SPs in *R. (B.) microplus* and obtained and sequenced a partial *para*-homologous sodium channel cDNA from susceptible and SP-resistance ticks strains. This partial sodium channel gene sequence is composed of 3599 bp (cDNA) (GenBank access number: AF134216). A point mutation that results in an amino acid change F → I was identified in a highly conserved domain III segment 6 (IIIS6) of the homologous sodium channel from ticks that were highly resistant to SPs (Figure 1, No. 5). As this amino acid

resistente a SPs (Figura 1, No. 5). Como la sustitución este aminoácido es causada por un cambio en un nucleótido de T → A<sup>(42)</sup> es conocido como un polimorfismo de nucleótido único (SNP). El nucleótido que es sustituido, es el primero del codón (TTC → ATC)<sup>(42)</sup>. Los autores concluyeron que IIS6 del canal de sodio de *R. (B.) microplus* son sitios de destino de los SPs. Aunque existen otras mutaciones, esta mutación puntual parece ser la más importante asociada a la resistencia a SPs en México<sup>(43)</sup>. En otro estudio llevado al cabo en el trópico mexicano Rosario Cruz *et al*<sup>(44)</sup> consideraron que la presencia de la sustitución F → I en el canal de sodio de *R. (B.) microplus* se puede asociar a la resistencia a flumethrina, deltametrina y cipermetrina. Recientemente, Morgan *et al*<sup>(41)</sup> identificaron otra mutación en el vinculador de S4 II-5 dominio del canal de sodio de *R. (B.) microplus* de Australia (L→I), que se asocia también con resistencia a SPs.

*Acetilcolinesterasa (AChE)*: esta enzima tiene un papel clave en el sistema nervioso, para la terminación de impulsos nerviosos al catalizar la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina. Los OPs son inhibidores irreversibles de AChE, provocando la falla del sistema nervioso central y la muerte del insecto<sup>(45)</sup>. Se ha informado que un importante mecanismo de resistencia a OPs en insectos<sup>(46,47,48)</sup>, son las mutaciones puntuales en el gen estructural que codifica la AChE que dan por resultado la producción de una enzima alterada. En estos últimos años se ha evidenciado que algunos artrópodos poseen varios genes que codifican por la AChE o productos como-AChE<sup>(49)</sup>. Estos genes -como parecen caber en grupos con cierta homología<sup>(50)</sup>. El papel de estos genes múltiples aún no está claro; sin embargo, generalmente se ha asociado solo un gen con la resistencia de OPs en cada organismo, sugiriendo que es el sitio clave para la inhibición de OPs y los trastornos funcionales del sistema nervioso. El gen asociado con este papel neuronal en diferentes organismos puede clasificarse en grupos de variada homología, así que no es posible predecir con certeza, que AChE desempeña el papel funcional crítico en la función neuronal<sup>(50)</sup>. Baxter y Barker<sup>(51)</sup> aislaron el primer gene

substitution is caused by a change in one nucleotide from T → A<sup>(42)</sup> it is known as a single nucleotide polymorphism (SNP). The nucleotide that is substituted is the first nucleotide of the amino acid codon (TTC → ATC)<sup>(42)</sup>. The authors concluded that IIS6 of the sodium channel of *R. (B.) microplus* are target sites of SPs. Although other mutations exist, this point mutation seems to be the most important one associated with resistance to SPs in Mexico<sup>(43)</sup>. In a study carried out in the Mexican tropics Rosario-Cruz *et al*<sup>(44)</sup> found that the presence of the F → I substitution in the sodium channel of *R. (B.) microplus* can be associated with resistance to flumethrin, deltamethrin and cypermethrin. Recently, Morgan *et al*<sup>(41)</sup> identified another mutation in the domain II S4-5 linker of the sodium channel of *R. (B.) microplus* from Australia (L→I) that is associated with resistance to SPs.

*Acetylcholinesterase (AChE)*: This enzyme has a key role in the nervous system, terminating nerve impulses by catalyzing the hydrolysis of the neurotransmitter acetylcholine. OPs are irreversible inhibitors of AChE, causing failure of the central nervous system and death of the insect<sup>(45)</sup>. Point mutations in the structural gene encoding AChE that result in production of an altered enzyme has been reported to be a major mechanism of OPs resistance in insects<sup>(46,47,48)</sup>. It has become apparent in recent years that some arthropods possess multiple genes encoding AChE or AChE-like products<sup>(49)</sup>. These AChE-like genes appear to fall into several homology groups<sup>(50)</sup>. The role of these multiple genes remains unclear; however, a single gene has usually been associated with OP resistance in each organism, suggesting that it is the key target for OPs inhibition and functional disruption of the nervous system. The gene associated with this neural role in different organisms may fall into different homology groups, so it is not possible to predict with certainty, which AChE plays the critical functional role in neural function<sup>(50)</sup>. Baxter and Barker<sup>(51)</sup> isolated the first putative AChE gene (AChE1) in *R. (B.) microplus* larvae from Australia. This was the first report of alternative splicing at the 5' end of the protein-coding region of an AChE gene and the first report of any type of alternative splicing in an



putativo de AChE (AChE1) en larvas *R. (B.) microplus* de Australia. Este fue el primer informe del corte alternativo al extremo 5' de la región de codificación de proteínas de un gen de AChE y el primer informe de cualquier tipo de corte alternativo en un gen de AChE de *R. (B.) microplus*. Otros dos supuestos genes putativos de AChE (AChE2 y AChE3) de *R. (B.) microplus* se han descubierto desde entonces<sup>(47,52)</sup>. Análisis de la secuencia de estos tres genes putativos de AChE de *R. (B.) microplus* no mostraron ninguna homología importante, sugiriendo que sólo estaban lejanamente relacionados entre sí<sup>(47)</sup>. Lamentablemente, no se ha encontrado ninguna mutación que podría haber explicado la base genética del mecanismo de resistencia del sitio de destino<sup>(53)</sup>.

**Ácido  $\Gamma$ -aminobutírico (GABA):** en artrópodos, GABA es un neurotransmisor inhibitorio en uniones neuromusculares y sinapsis del sistema nervioso central. Uno de los principales agentes actuales en el control de la garrapata es fipronil, un antagonista de los canales de cloruro GABA-gated<sup>(54)</sup>. Ya se ha informado de la presencia de mutaciones del gen GABA de *Drosophila melanogaster*<sup>(46)</sup>, sin embargo al presente, ningún gen GABA ha sido aislado de *R. (B.) microplus*.

**Receptor de Octopamina:** existe una fuerte evidencia de que el sitio de destino de las formamidinas (esto es, amitraz) es el receptor octopamina. El receptor putativo octopamina fue secuenciado de Australia a partir de dos cepas *R. (B.) microplus*: una cepa amitraz susceptible y -resistente. Ambas secuencias fueron idénticas<sup>(51)</sup>. Dos explicaciones posibles para este hallazgo son que puede haber más de un gen del receptor de octopamina en *R. (B.) microplus*, o que la resistencia al amitraz puede ser debido a un proceso metabólico<sup>(51,55)</sup>. Recientemente, Chen *et al*<sup>(31)</sup> fueron los primeros en describir las mutaciones de un gen putativo del receptor octopamina en *R. (B.) microplus* resistente al amitraz. El descubrimiento de estas mutaciones sólo en garrapatas resistentes al amitraz proporciona la primera evidencia de la posibilidad de un sitio de destino del plaguicida alterado, como un mecanismo de resistencia al amitraz en *R. (B.) microplus*.

AChE gene from *R. (B.) microplus*. Two other putative *R. (B.) microplus* AChE genes (AChE2 and AChE3) have since been discovered<sup>(47,52)</sup>. Sequence analysis of these three putative *R. (B.) microplus* AChE genes failed to show any significant homology to one another suggesting that they were only distantly related<sup>(47)</sup>. Unfortunately, no mutation that could have explained the genetic basis of the target site resistance mechanism has been found<sup>(53)</sup>.

**$\gamma$ -aminobutyric acid (GABA):** In arthropods, GABA is an inhibitory neurotransmitter at neuromuscular junctions and synapses in the central nervous system. One of the main current agents in tick control is fipronil, an antagonist of GABA-gated chloride channels<sup>(54)</sup>. To date mutations of the GABA gene of *Drosophila melanogaster* have been reported<sup>(46)</sup>; however, no GABA gene has been isolated in *R. (B.) microplus*.

**Octopamine receptor:** There is strong evidence that the octopamine receptor is the target site of formamidines (i.e. amitraz). The putative octopamine receptor was sequenced from two Australian *R. (B.) microplus* strains: an amitraz-susceptible and -resistant strain. Both of these sequences were identical<sup>(51)</sup>. Two possible explanations for this finding are that there may be more than one octopamine receptor gene in *R. (B.) microplus* or resistance to amitraz may be due to a metabolic process<sup>(51,55)</sup>. Recently, Chen *et al*<sup>(31)</sup> reported for the first time mutations in a putative octopamine receptor gene in amitraz-resistant *R. (B.) microplus*. Discovery of these mutations only in amitraz-resistant ticks provides the first evidence for the possibility of an altered pesticide target site as a mechanism of amitraz resistance in *R. (B.) microplus*.

### **Metabolic Resistance Mechanism**

**Carboxylesterases:** These enzymes structurally belong to a superfamily of  $\alpha/\beta$ -fold proteins, which consist of alternated  $\alpha$ -helix and  $\beta$ -sheets connected by loops with a varying length<sup>(56)</sup>. These enzymes hydrolyze chemicals containing such functional groups as a carboxylic acid ester, amide, and thioester<sup>(57)</sup>. Studies on carboxylesterases largely focus on detoxification

**Mecanismo de resistencia metabólica**

**Carboxylesterasas:** estructuralmente, estas enzimas pertenecen a una superfamilia de proteínas con dobleces  $\alpha/\beta$ , que consisten en hélices  $\alpha$  y pliegues  $\beta$  alternados conectadas por rizos de una longitud variable<sup>(56)</sup>. Estas enzimas hidrolizan las sustancias químicas que contienen grupos funcionales, tales como ácido carboxílico, éster, amida y tioéster<sup>(57)</sup>. Estudios sobre carboxylesterasas en gran medida se centran en la desintoxicación de plaguicidas y el metabolismo de fármacos y otros xenobióticos<sup>(57)</sup>. Carboxylesterasas son estructuralmente similares a la acetilcolinesterasa, un sitio de destino bien establecido de los OPs y durante la exposición aguda a insecticidas a base de carbamato<sup>(58)</sup>. Por lo tanto, se considera que el enlace de carboxylesterasas a estos insecticidas es una vía de desintoxicación<sup>(59)</sup>.

Riddles *et al*<sup>(60)</sup> describieron la purificación parcial de una enzima con actividad tipo-carboxylesterasa en *R. (B.) microplus*, que podría hidrolizar la permetrina, proporcionando las primeras evidencias que enzimas metabólicas también pueden participar en la resistencia a los piretroides. Hay muchos informes de actividad incrementada de esterasa en artrópodos, incluyendo mosquitos<sup>(46)</sup>. Desintoxicación metabólica incrementada mediada por carboxylesterasa se ha descrito como indicativo de resistencia en OP y SP en garrapatas *R. (B.) microplus*<sup>(34,61)</sup>. Jamroz *et al*<sup>(34)</sup> identifican una cepa de *R. (B.) microplus* (Cz) resistente a piretroides, que mostraba tener alta actividad hidrolítica de esterasa (CzEST9), en comparación con una cepa susceptible de *R. (B.) microplus*. La misma alta actividad hidrolítica se encontró tras la purificación de CzEST9 y por lo tanto, se postuló que CzEST9 estaba asociada con la resistencia de la CEPA Cz a permetrina<sup>(62)</sup>. Una mutación puntual de un gen esterasa fue identificado en una cepa mexicana de *R. (B.) microplus* resistente a piretroides<sup>(63)</sup>; investigaciones subsecuentes encontraron que la aparición de resistencia no estaba asociada con la presencia de la mutación<sup>(64)</sup>. Recientemente, otros investigadores<sup>(65)</sup> trabajando con cepas brasileñas de *R. (B.) microplus* resistentes a OP y SP, encontraron que la desintoxicación metabólica causada por dos acetilcolinesterasas, contribuyó

of pesticide and metabolism of drugs and other xenobiotics<sup>(57)</sup>. Carboxylesterases are structurally similar to acetylcholinesterase, a well established target of OPs and carbamate insecticides during acute exposure<sup>(58)</sup>. Binding of carboxylesterases to these insecticides, therefore, is considered as a detoxification pathway<sup>(59)</sup>.

Riddles *et al*<sup>(60)</sup> described the partial purification of an *R. (B.) microplus* enzyme with carboxylesterase-like activity that could hydrolyze permethrin, providing early evidence that metabolic enzymes also can be involved in pyrethroids resistance. There are many reports of enhanced esterase activities in arthropods including mosquitoes<sup>(46)</sup>. Enhanced carboxylesterase-mediated metabolic detoxification has been indicated in both OPs and SPs resistance in *R. (B.) microplus* ticks<sup>(34,61)</sup>. Jamroz *et al*<sup>(34)</sup> identified a pyrethroid-resistant *R. (B.) microplus* strain (Cz) having high esterase-hydrolytic activity (CzEST9) compared to a susceptible strain of *R. (B.) microplus*. The same high hydrolytic activity was found following purification of CzEST9 and therefore it was hypothesized CzEST9 is associated with permethrin resistance in the Cz strain<sup>(62)</sup>. In a pyrethroid-resistant *R. (B.) microplus* strain from Mexico a point mutation in an esterase gene was identified<sup>(63)</sup>, but further research found that the occurrence of resistance was not associated with the presence of the mutation<sup>(64)</sup>. Recently, Baffi *et al*<sup>(65)</sup> working with OPs and SPs resistant Brazilian strains of *R. (B.) microplus*, found that metabolic detoxification by two acetylcholinesterases contributed toward the development of resistance of these tick populations. However, Rosario-Cruz *et al*<sup>(44)</sup> working with nine field populations of *R. (B.) microplus* in Yucatan, Mexico, did not find positive correlations between esterase activity and larval survival exposed to cypermethrin, deltamethrin and flumethrin.

Recently, six strains of *R. (B.) microplus* collected from northern Mexico were found to be resistant to fipronil. Selection with fipronil for three generations produced a resistance ratio of 8.3 and 9.4 at the LC<sub>50</sub> and LC<sub>99</sub> estimates, respectively<sup>(66)</sup>. The authors concluded that resistance to fipronil seems to be due in part to elevated esterase activity (CZEST9) that was

al desarrollo de la resistencia en estas poblaciones de garrapatas. Sin embargo, en un trabajo<sup>(44)</sup> con nueve poblaciones de campo de *R. (B.) microplus* en Yucatán, México, no encontraron alguna correlación positiva entre la actividad de la esterasa y supervivencia de larvas expuestas a cipermetrina, deltametrina y flumetrina.

Recientemente, seis cepas de *R. (B.) microplus* recolectadas al norte de México resultaron ser resistentes a fipronil. Selección con fipronil por tres generaciones indujo resistencia a un rango de entre 8.3 y 9.4 en los estimadores de LC<sub>50</sub> y LC<sub>99</sub>, respectivamente<sup>(66)</sup>. Los autores concluyeron que la resistencia a fipronil parece ser debido en parte a la actividad de la esterasa elevada (CZEST9), que fue preseleccionado por el uso generalizado de permetrina en la década de 1980 en México. Sin embargo, se deben realizar más trabajos para conocer los verdaderos mecanismos de resistencia del fipronil.

*Monoxygenases P450*: enzimas P450 (oxidasas mixtas, citocromo P450 monooxigenasa) son una familia compleja de enzimas que contiene heme, que se encuentran en la mayoría de los organismos. Las enzimas P450 enlazan oxígeno molecular y reciben electrones del NADPH (fosfato de nicotinamida adenina dinucleotide) para introducir un átomo de oxígeno dentro del sustrato. En los insectos, las diversas funciones de las enzimas P450 van desde la síntesis y degradación de los ecdisteroides y las hormonas juveniles al metabolismo de los xenobióticos<sup>(67)</sup>. Enzimas P450 desarrollan papeles importantes en la adaptación de los insectos a los compuestos tóxicos de las plantas huéspedes, y participan en el metabolismo de todos los insecticidas utilizados comúnmente. Bioactivación de OPs por P450 monooxigenasa, es un requisito para desarrollar el efecto altamente tóxico de OP sobre la acetilcolinesterasa, su sitio de destino<sup>(67,68)</sup>. Sin embargo, en general, las enzimas P450 intervienen en la desintoxicación metabólica de los insecticidas, especialmente de SPs<sup>(69)</sup>. La diversidad es conferida por la existencia de múltiples isoformas de P450, diferentes patrones de expresión y un espectro amplio de sustratos<sup>(70)</sup>. Hay muchos informes demostrando elevada actividad de P450 en mosquitos resistentes a los insectos, frecuentemente de manera conjunta con

preseleccionado en México por el uso generalizado de permetrina en la década de 1980. Sin embargo, se deben realizar más trabajos para conocer los verdaderos mecanismos de resistencia del fipronil.

*P450 monooxygenases*: P450 enzymes (mixed functional oxidases, cytochrome P450 monooxygenase) are a complex family of heme containing enzymes found in most organisms. P450 enzymes bind molecular oxygen and receive electrons from NADPH (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) to introduce an oxygen atom to the substrate. In insects, the diverse functions of P450 enzymes range from the synthesis and degradation of ecdysteroids and juvenile hormones to the metabolism of xenobiotics<sup>(67)</sup>. P450 enzymes play important roles in adaptation of insects to toxic compound in their host plants and are involved in metabolism of all commonly used insecticides. P450 monooxygenase bioactivation of OPs is a requisite to develop the highly toxic effect of OPs upon its target acetylcholinesterase<sup>(67,68)</sup>. However, in general, P450 enzymes mediate metabolic detoxification of their insecticides, particularly SPs<sup>(69)</sup>. Diversity is conferred by the existence of multiple P450 isoforms, different expression pattern and wide substrate spectra<sup>(70)</sup>. There are many reports demonstrating elevated P450 activities in insect-resistant mosquitoes, frequently in conjunction with altered activities of other enzymes<sup>(46)</sup>.

Li *et al*<sup>(71)</sup> used synergist studies with coumaphos and piperonyl butoxide (PBO), an inhibitor of cytochrome P450 mixed function oxidase activity, to study mechanisms of OPs resistance in both the Munoz (susceptible) and San Roman (resistant) strains of *R. (B.) microplus*. Those studies found that the toxicity of coumaphos in the presence of PBO was reduced 2-fold in the Munoz OPs susceptible strain yet increased 3-fold in the San Roman OPs resistant strain. In parallel studies with the OP diazinon, PBO again significantly reduced the toxicity of OP in the susceptible Munoz strain. However, in the OPs resistant San Roman strain, the toxicity of diazinon was not affected by PBO, a contrast with the coumaphos results. Li *et al*<sup>(71)</sup> hypothesized that the activity of the cytochrome P450 responsible for bioactivation of either

la alteración de otras enzimas<sup>(46)</sup>.

Li *et al*<sup>(71)</sup> llevaron al cabo estudios de sinergia con coumaphos y butóxido de piperonilo (PBO), un inhibidor de la oxidasa mixta citocromo P450; para estudiar mecanismos de resistencia a OPs en las cepas Muñoz (sensible) y San Román (resistente) de *R. (B.) microplus*. Los estudios mostraron que la toxicidad de coumaphos en presencia de PBO se redujo 2-veces en la cepa Muñoz susceptible a OP, pero se incrementó 3-veces en la cepa San Romano resistente a OP. En estudios paralelos con el diazinón OPs, PBO nuevamente se redujo significativamente la toxicidad de OPs en la cepa Muñoz susceptible. Sin embargo, en la cepa San Román resistente a OPs, la toxicidad de diazinón no fue afectada por PBO, un contraste con los resultados del coumaphos. Li *et al*<sup>(71)</sup> lanzaron la hipótesis de que la actividad del citocromo P450 responsable para bioactivación del coumaphos o el diazinón es perjudicada por el PBO en todas las cepas, y por consecuencia, en la disminución de la toxicidad de coumaphos o diazinón cuando se aplican junto con PBO. Recientemente, Miller *et al*<sup>(22)</sup> encontraron una cepa mexicana de *R. (B.) microplus* altamente resistente al diazinón pero no muy resistente a coumaphos. Cuando se expuso a coumaphos y PBO o triphenylphosphate (otro inhibidor del citocromo P450), la toxicidad se redujo entre 3.5- y 6.3-veces, respectivamente; sugiriendo que mono oxigenasas o esterases participaron en la resistencia a coumaphos. Otro estudio reciente<sup>(72)</sup> demostró la vinculación entre una mayor actividad de monooxigenasa y resistencia al acaricida piretroide en *R. (B.) microplus* de México.

**Glutathione S-transferase (GSTs):** GSTs son un grupo de enzimas que catalizan la conjugación entre glutathione (GSH) y otras moléculas. Estas enzimas tienen un papel central en la desintoxicación de compuestos xenobióticos y endógenos. En poblaciones con una larga historia de exposición a productos químicos, se asocia una alta actividad de GST con resistencia a los insecticidas<sup>(73)</sup>. Resistencia a los OCs y OPs está asociada específicamente con una mayor actividad de GST<sup>(74,75)</sup>. Estos hechos sugieren que la conjugación del insecticida al glutathione, que es catalizada por GST, puede ser un mecanismo de

coumaphos or diazinon is adversely affected by PBO in all strains, leading to the decline in toxicity when either coumaphos or diazinon are applied with PBO. Recently, Miller *et al*<sup>(22)</sup> found a Mexican *R. (B.) microplus* strain highly resistant to diazinon but not highly resistant to coumaphos. When exposed to coumaphos and PBO or triphenylphosphate (another inhibitor of cytochrome P450), the toxicity was reduced by 3.5- and 6.3-fold, respectively, suggesting that mono-oxygenases and/or esterases were involved in resistance to coumaphos. Another recent study<sup>(72)</sup> showed a linkage between increased monooxygenase activities and pyrethroid acaricide resistance in *R. (B.) microplus* from Mexico.

**Glutathione S-Transferases (GSTs):** GSTs are a group of enzymes that catalyze the conjugation between glutathione (GSH) and several molecules. These enzymes have a central role in detoxification of xenobiotic and endogenous compounds. In populations with a long history of chemical exposure, high GST activity is associated with resistance to insecticides<sup>(73)</sup>. Resistance to OCs and OPs is specifically associated with increased GST activity<sup>(74,75)</sup>. These facts suggest that insecticide conjugation to glutathione, which is catalyzed by GST, may be a detoxification mechanism in arthropods<sup>(76)</sup>. He *et al*<sup>(77)</sup> reported the purification, characterization, and molecular cloning of a larval *R. (B.) microplus* GST. Synergist bioassays on several amitraz-resistant strains from Mexico and one Brazilian strain of *R. (B.) microplus* indicated some involvement of esterase and glutathione S-transferase<sup>(79)</sup>.

## CONCLUSIONS

Current tick-control methods involve use of non-chemical and chemical methods. Although the control of ticks relies heavily on the use of chemicals, the development of *R. (B.) microplus* resistant to these compounds is a serious threat worldwide. The development of acaricide resistance in a tick population is dependent on the frequency of occurrence of resistant individuals in the population and the intensity of chemical selection pressure. *R. (B.) microplus* resistant to OPs, SPs and amitraz has been reported

desintoxicación en artrópodos<sup>(76)</sup>. He *et al.*<sup>(77)</sup> informaron de la purificación, caracterización y clonación molecular de GST de una larva *R. (B.) microplus*. Bioensayos sinérgicos con varias cepas resistentes a amitraz de México y una cepa brasileña de *R. (B.) microplus* indican alguna intervención de esterasa y glutatión S-transferasa<sup>(79)</sup>.

## CONCLUSIONES

Los métodos actuales para el control de garrapatas, implican el uso de métodos químicos y no químicos. Aunque el control de garrapatas está basado fuertemente en el uso de productos químicos, el desarrollo de *R. (B.) microplus* resistente a estos compuestos es una grave amenaza en todo el mundo. El desarrollo de resistencia a los acaricidas en una población de garrapatas depende de la frecuencia de aparición de individuos resistentes en la población, y la intensidad de la presión de selección química. La aparición de *R. (B.) microplus* resistente a OPs, SPs y el amitraz ha sido descrita alrededor del mundo, principalmente en Australia y Latinoamérica. La resistencia a las MLs fue descrita en Brasil; sin embargo, el uso generalizado de las MLs para control de parásitos puede conducir a un problema importante en el futuro. La resistencia a los acaricidas en garrapatas está soportada principalmente por dos mecanismos fisiológicos importantes: Insensibilidad en el sitio de destino (mutaciones en el canal de sodio, acetilcolinesterasa, ácido  $\gamma$  aminobutírico y genes de receptores de octopamina) y metabólicos (alteraciones en el

worldwide, mainly in Australia and Latin America. Resistance to MLs has been reported in Brazil; however, the widespread use of MLs for parasite control may produce an important problem in the future.

The acaricide resistance in ticks is conferred primarily by two major physiological mechanisms: target site insensitivity (mutations in the sodium channel, acetylcholinesterase,  $\gamma$ -aminobutyric acid and octopamine receptors genes) and metabolic (alterations in the level or activities of detoxification proteins). Alone and or in combination these mechanisms confer resistance to all of the available classes of acaricides.

## ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank the Mexican Association of Veterinary Parasitologists who generously invited us to present this paper.

*End of English version*

---

nivel o actividad de proteínas de desintoxicación). Estos mecanismos, solos o en combinación, confieren la resistencia a todas las clases conocidas de acaricidas disponibles.

## AGRADECIMIENTOS

A la Asociación Mexicana de Parasitólogos Veterinarios A.C. por su gentil invitación para presentar este trabajo.

## LITERATURA CITADA

1. Taylor MA, Coop RL, Wall RL. Vet Parasitol. Third edition. Oxford, U.K: Blackwell; 2007.
2. Pegram RG, Tatchell RJ, de Castro J. Tick control, new concepts. World Anim Rev 1993;74/75:2-11.
3. Murrell AN, Campbell JH, Barker SC. Phylogenetic analysis of the rhipicephalini ticks indicates that the genus *Rhipicephalus* is paraphyletic. Mol Phylogenetics Evolution 2000;16:1-7.
4. Beati L, Keirans JE. Analysis of the systematic relationships among ticks of the genera *Rhipicephalus* and *Boophilus* (Acari: Ixodidae) based on mitochondrial 12S ribosomal DNA gene sequences and morphological characters. J Parasitol 2001; 87:32-48.
5. Solorio-Rivera JL, Rodríguez-Vivas RI, Pérez-Gutiérrez E, Wagner G. Management factors associated with *Babesia bovis* seroprevalence in cattle from eastern Yucatán, Mexico. Prev Vet Med 1999;40:261-269.
6. Rodríguez-Vivas RI, Quiñones AF, Frago SH. Epidemiología y control de la garrapata *Boophilus* en México. En: Enfermedades de importancia económica en producción animal. Rodríguez-Vivas, R.I. editor. México D.F: McGraw-Hill-UADY; 2005: 571-592.
7. Rodríguez-Vivas RI, Mata MY, Pérez GE, Wagner G. The effect of management factors on the seroprevalence of *Anaplasma marginale* in *Bos indicus* cattle in the Mexican tropics. Trop Anim Hlth Prod 2004;36:135-143.

8. Nari A, Hansen HJ, Hedi C, Martins JR. Control de la resistencia a los antiparasitarios a la luz de los conocimientos actuales. Congreso Mundial de Buiatría. Montevideo, Uruguay. 2000:1-19.
9. Sutherst RW, Maywald GF, Kerr JD, Stegeman DA. The effect of cattle tick (*Boophilus microplus*) on the growth of *Bos indicus* x *Bos taurus* steers. Aust J Agric Res 1983;34:317-327.
10. Seebeck RM, Springell PH, O'Kelly JC. Alterations in host metabolism by the specific and anorectic effects of the cattle tick (*Boophilus microplus*), I Food intake and bodyweight growth. Aust J Biol Sci 1971;24:373-380.
11. Norval RAI, Sutherst RW, Jorgenson O, Gibson JD, Kerr JD. The effect of the brown ear-tick *Rhipicephalus appendiculatus* on the growth of Sanga and European breed protein *tipE* and toxin pharmacology. J Gen Physiol 1988;110:119-133.
12. Vega M. Current importance of cattle haemoparasite diseases. In: Seminario Internacional de Parasitología Animal. Garrapatas y enfermedades que transmiten. Morelos, México. 1991:144-150.
13. Guerrero FD, Pruetz JH. Status and future prospects for molecular diagnosis of acaricide resistance in *Boophilus microplus*. Trends Entomol 2003;3:97-103.
14. Rodríguez-Vivas RI, Alonso-Díaz MA, Rodríguez-Arevalo F, Fragoso-Sánchez H, Santamaría VM, Rosario-Cruz R. Prevalence and potential risk factors for organophosphate and pyrethroid resistance in *Boophilus microplus* ticks on cattle ranches from the State of Yucatan, Mexico. Vet Parasitol 2006;136:335-342.
15. Rodríguez-Vivas RI, Rodríguez-Arevalo F, Alonso-Díaz MA, Fragoso-Sánchez H, Santamaría VM, Rosario-Cruz R. Amitraz resistance in *Boophilus microplus* ticks in cattle farms from the state of Yucatan, Mexico, prevalence and potential risk factors. Prev Vet Med 2006;75:280-286.
16. Rodríguez-Vivas RI, Rivas AL, Chowell G, Fragoso SH, Rosario CR, García Z, Smith SD, Williams JJ, Schwager SJ. Spatial distribution of acaricide profiles (*Boophilus microplus* strains susceptible or resistant to acaricides) in south eastern Mexico. Vet Parasitol 2007;146:158-169.
17. Newton LG. Acaricide resistance and cattle tick control. Aust Vet J 1967;43:389-394.
18. George JE, Pound JM, Davey RB. Chemical control of ticks on cattle and the resistance of these parasites to acaricides. Parasitol 2004;129:S353-S366.
19. Benavides E, Rodríguez JL, Romero A. Isolation and partial characterization of the Montecinos strain of *Boophilus microplus* (Canestrini, 1877) multi-resistant to different acaricides. Ann NY Acad Sci 2000;916:668-671.
20. Furlong J. Diagnóstico de la susceptibilidad de la garrapata del ganado *Boophilus microplus* a los acaricidas en el estado de Minas Gerais, Brasil. Seminario Internacional de Parasitología Animal. Puerto Vallarta, Jalisco, México. 1999:41-46.
21. Miller RJ, Davey RB, George JE. Modification of the food and agriculture organization larval packet test to measure amitraz-susceptibility against Ixodidae. J Med Entomol 2002;39:645-651.
22. Perez-Cogollo LC, Rodríguez-Vivas RI, Ramirez-Cruz GT, Miller RJ. First report of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* resistant to ivermectin in Mexico. Vet Parasitol 2010;168:165-169.
23. Trapapa BJ. The campaign against *Boophilus microplus* in Mexico, benefit, problems and prospects. In: García-Vasquez, Z. editor. Animal production and health. Food and Agricultural Organization, Mexico City, Mexico. 1989:50-75.
24. Aguirre EJ, Santamaría VM. Purificación y caracterización toxicológica de garrapatas *B. microplus* resistentes a ixodicidas organofosforados y organoclorados. Reunión Anual de la Asociación Mexicana de Parasitología Veterinaria A.C. Ciudad Victoria, Tamaulipas, México. 1986.
25. Fragoso H, Soberanes N, Ortiz M, Santamaría M, Ortiz A. Epidemiología de la resistencia a ixodicidas piretroides en garrapatas *Boophilus microplus* en la República Mexicana. En: Rodríguez, S., Fragoso, H. editores. Seminario Internacional de Parasitología Animal-Resistencia y Control en Garrapatas y Moscas de Importancia Veterinaria. Acapulco, Guerrero, México. 1995:45-57.
26. Miller RJ, Davey RB, George JE. Characterization of pyrethroid resistance and susceptibility to coumaphos in Mexican *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). J Med Entomol 1999;36:633-638.
27. Santamaría VM, Soberanes CN, Ortiz NA, Fragoso SH, Osorio MJ, Martínez IF, Franco BL, Delabra VG, Quezada DR, Giles HI, Ortiz EM. Análisis de la situación actual mediante el monitoreo de susceptibilidad a ixodicidas en *Boophilus microplus* de 1993 a 1999 y medidas preventivas para retardar la resistencia al amitraz en México. Seminario Internacional de Parasitología Animal, Control de la Resistencia en Garrapatas y Moscas de Importancia Veterinaria y Enfermedades que transmiten. Puerto Vallarta, Jalisco, México. 1999:103-117.
28. Soberanes NC, Santamaría MV, Fragoso HS, García VZ. First case reported of amitraz resistance in the cattle tick *Boophilus microplus* in Mexico. Téc Pecu Méx 2002;40:81-92.
29. WHO (World Health Organization) Expert Committee on Insecticides. Seventh report, Geneva, World Health Organization. Technical Report Series No. 125. 1957.
30. Nolan J. Current developments in resistance to amidine and pyrethroid tickicides in Australia. In: Whitehead GB, Gibson JD editors. Tick biology and control. University Rhodes-Grahamstown, South Africa. 1985:109-114.
31. Chen AC, He H, Davey RB. Mutations in a putative octopamine receptor gene in amitraz-resistant cattle ticks. Vet Parasitol 2007;148:379-383.
32. Milani R. Comportamento medxeliano della resistenza alla azione abbattente del DDT, Correlazione abbattimento e mortalità in *Musca domestica* L. Rivista e Parasitologia 1954;15:513-542.
33. Sawicki RM. Unusual response of DDT-resistant houseflies to carbinol analogues of DDT. Nature 1978;275:443-444.

34. Jamroz RC, Guerrero FD, Pruett JH, Oehler DD, Miller RJ. Molecular and biochemical survey of acaricide resistance mechanisms in larvae from Mexican strain of the southern cattle tick, *Boophilus microplus*. *J Insect Physiol* 2000;46:685-695.
35. Soderlund DM, Bloomquist JR. Molecular mechanisms of insecticide resistance. In: Roush RT, Tabashnik BE (eds) *Pesticide resistance in arthropods*. Chapman and Hall, New York. 1990:58-96.
36. Soderlund DM, Knipple DC. The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticide. *Insect Biochem Mol Biol* 2003;33:563-577.
37. Soderlund D. Sodium channels. In: Gilbert LI, Iatrou K., Gill SS. editors. *Comprehensive insect science*. Pharmacology, vol 5. Amsterdam: Elsevier B.V; 2005:1-24.
38. Dong K. Insect sodium channels and insecticide resistance. *Invertebrate Neurosci* 2007;7:17-30.
39. Soderlund DM. Pyrethroids, knockdown resistance and sodium channels. *Pest Manage Sci* 2008;64:610-616.
40. Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Zipursky SL, Darnell J. *Molecular cell biology*. Fifth edition. Freeman and Company. New York. 2004:277-281.
41. Morgan JAT, Corley SW, Jackson LA, Lew-Tabor AL, Moolhuijzen PM, Jonsson NN. Identification of a point mutation in the *para*-sodium channel gene of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* associated with resistance to synthetic pyrethroid acaricides. *Int J Parasitol* 2009. [In press].
42. He H, Chen AC, Davey RB, Ivie GW, George JE. Identification of a point mutation in the *para*-type sodium channel gene from a pyrethroid-resistant cattle tick. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 261:558-561.
43. Foil LD, Coleman P, Eisler M, Fragoso-Sanchez H, Garcia-Vazquez Z, Guerrero FD, Jonsson NN, Langstaff IG, Li AY, Machila N, Miller RJ, Morton J, Pruett JH, Torr S. Factors that influence the prevalence of acaricide resistance and tick-borne diseases. *Vet Parasitol* 2004;125:163-181.
44. Rosario-Cruz R, Guerrero FD, Miller RJ, Rodriguez-Vivas RI, Dominguez-Garcia DI, Cornel AJ, Hernández-Ortiz R, George EJ. Roles played by esterase activity and by a sodium channel mutation involved in pyrethroid resistance in populations of *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acari: Ixodidae) collected from Yucatan, Mexico. *J Med Entomol* 2005;42(6):1020-1025.
45. Fournier D, Mutero A. Modification of acetylcholinesterase as a mechanism of resistance to insecticides. *Comparative biochemistry and physiology: Toxicol Pharmacol* 1994;108:19-31.
46. Hemingway J, Hawkes NJ, McCarroll L, Ranson H. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochem Mol Biol* 2004;34:653-666.
47. Temeyer KB, Davey RB, Chen AC. Identification of a third *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) cDNA presumptively encoding an acetylcholinesterase. *J Med Entomol* 2004; 41:259-268.
48. Temeyer KB, Li AY, Lohmeyer KH, Chen AC, Olafson PU, Sanson DW, Foil LD. Acetylcholinesterase mutation in diazinon-resistant *Haematobia irritans* (L.) (Diptera: Muscidae). *Vet Parasitol* 2007;154:300-310.
49. Ranson H, Claudianos C, Orтели F, Abgrall C, Hemingway J, Sharakhova MV, Unger MF, Collins FH, Feyereisen R. Evolution of supergene families associated with insecticide resistance. *Science* 2002;298:179-181.
50. Weill M, Fort P, Berthomieu A, Dubois MP, Pasteur N, Raymond M. A novel acetylcholinesterase gene in mosquitoes codes for the insecticide target and is non-homologous to the ace gene in *Drosophila*. *Proc Royal Soc Biol Sci* 2002:2007-2016.
51. Baxter GD, Barker S. Isolation of a cDNA for an octopamine-like, G-protein coupled receptor from the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Insect Biochem Mol Biol* 1999;29:461-467.
52. Hernandez R, He H, Chen AC, Waghela SD, Ivie GH, George JE, Wagner G. Cloning and sequencing of a putative acetylcholinesterase cDNA from *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol* 1999; 36:764-770.
53. Baxter GD, Barker SC. Acetylcholinesterase cDNA of the cattle tick *Boophilus* role in organophosphates resistance. *Insect Biochem Mol Biol* 1998; 28:581-589.
54. Taylor MA. Recent developments in ectoparasiticides. *Vet J* 2001;161:253-268.
55. Jonsson NN, Hope M. Progress in the epidemiology and diagnosis of amitraz resistance in the cattle tick *Boophilus microplus*. *Vet Parasitol* 2007;146:193-198.
56. Oakeshott C, Claudianos C, Russell RJ, Robin GC. Carboxyl/cholinesterases, a case study of the evolution of a successful multigene family. *BioEssays* 1999; 21:1031.
57. Satoh T, Hosokawa M. The mammalian carboxylesterases, from molecules to functions. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1998;38:257-288.
58. Sussman JL, Harel M, Frolow F, Oefner C, Goldman A, Toker L, Silman I. Atomic structure of acetylcholinesterase from Torpedo California, a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science* 1991;253:872-879.
59. Xie M, Yang D, Liu L, Xue B, Yan B. Human and rodent carboxylesterases, immunorelatedness, overlapping substrate specificity, differential sensitivity to serine enzyme inhibitors, and tumor-related expression. *Drug Metabolism and Disposition* 2002;30(5):541-547.
60. Riddles PW, Davey PA, Nolan J. Carboxylesterases from *Boophilus microplus* hydrolyze trans-permethrin. *Pesticide Biochem Physiol* 1983;20:133-140.
61. 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* (Acari: Ixodidae). *Bull Entomol Res* 1997;87:197-202.
62. Pruett JH, Guerrero FD, Hernandez R. Isolation and identification of an esterase from a Mexican strain of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *J Econ Entomol* 2002; 95:1001-1007.

63. Hernandez R, He H, Chen AC, Waghela SD, Ivie GW, George JE, Wagner GG. Identification of a point mutation in an esterase gene in different populations of the southern cattle tick, *Boophilus microplus*. *Insect Biochem Mol Biol* 2000;30:969-977.
64. Guerrero FD, Li AY, Hernandez R. Molecular diagnosis of pyrethroid resistance in Mexican strains of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol* 2002; 39:770-776.
65. Baffi MA, de Souza GRL, de Sousa CS, Ceron CR, Bonetti AM. Esterase enzymes involved in pyrethroid and organophosphate resistance in a Brazilian population of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Mol Biochem Parasitol* 2008;160:70-73.
66. Miller RJ, Li AY, Tijerina M, Davey RB, George JE. Differential response to diazinon and coumaphos in a strain of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) collected in Mexico. *J Med Entomol* 2008;45(5):905-911.
67. Feyereisen R. Insect P450 enzymes. *Ann Rev Entomol* 1999; 44:507-533.
68. Sams C, Mason HJ, Rawbone R. Evidence of the activation of organophosphate pesticides by cytochromes P450 3A4 and 2D6 in humans liver microsomes. *Toxicological Letter* 2000;116: 217-221.
69. He H, Chen AC, Davey RB, Ivie GW. Molecular cloning and nucleotide sequence of a new P450 gene, *CYP3I9A1*, from the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Insect Biochem Mol Biol* 2002;32:303-309.
70. Scott JG, Wen Z. Cytochromes P450 of insects: The tip of iceberg. *Pest Manage Sci* 2001;57:958-967.
71. Li AY, Chen AC, Miller RK, Davey RB, George JE. Acaricide resistance and synergism between permethrin and amitraz against susceptible and resistant strains of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Pest Manage Sci* 2003;63:882-889.
72. Cossio-Bayugar R, Miranda-Miranda E, Ortiz-Najera A, Neri-Orantes S. *Boophilus microplus* pyrethroid resistance associated to increased levels of monooxygenase enzymatic activity in field isolated Mexican ticks. *J. Biol Sci* 2008;8(2):404-409.
73. Ketterman AJ, Prommeenate P, Boonchaay C, Chanama U, Leetachewa S, Promtet N, Prapanthadara L. Single amino acid changes outside the active site significantly affect activity of glutathione S-transferases. *Insect Biochem Mol Biol* 2001;31:65-74.
74. Vontas JG, Small GJ, Hemingway J. Glutathione S-transferase as antioxidant defence agents confer pyrethroid resistance in *Nilaparvata lugens*. *Biochem J* 2001; 357:65-72.
75. Vontas JG, Small GJ, Nikou DC, Ranson H, Hemingway J. Purification, molecular cloning and heterologous expression of a glutathione S-transferase involved in insecticide resistance from the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Biochem J* 2002;362:329-337.
76. Wei SH, Clark AG, Syvanen M. Identification and cloning of a key insecticide-metabolizing glutathione S-transferase (MdGST-6A) from a hyper insecticide-resistant strain of the housefly *Musca domestica*. *Insect Biochem Mol Biol* 2001;31:1145-1153.
77. He H, Chen AC, Davey RB, Ivie GW, George JE. Characterization and molecular cloning of a glutathione S-transferase gene from the tick, *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Insect Biochem Mol Biol* 1999;29:737-743.
78. Li AY, Davey RB, Miller RJ, George JE. Detection and characterization of amitraz resistance in the southern cattle tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol* 2004;41(2):193-200