

Nuevo polimorfismo en el gen del canal del sodio de la garrapata *Rhipicephalus microplus* (Ixodida: Ixodidae) resistente a piretroides

Edgar Diaz-Rivera¹, Gisella Holguín Cespedes² & Daniel A. Urrea Montes³

1. Laboratorio de Parasitología Veterinaria, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Grupo de Investigación en Enfermedades Neurodegenerativas, Universidad del Tolima, Barrio Santa Helena, Ibagué, Colombia; ediazr@ut.edu.co
2. Programa de Maestría en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias, Universidad del Tolima, Barrio Santa Helena, Ibagué, Colombia; gholguin@ut.edu.co
3. Laboratorio de Investigaciones en Parasitología Tropical (LIPT), Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad del Tolima, Barrio Santa Helena, Ibagué, Colombia; daurrea@ut.edu.co

Recibido 20-XI-2018. Corregido 18-III-2019. Aceptado 23-VII-2019.

Abstract: New polymorphism in the sodium channel gene of *Rhipicephalus microplus* tick (Ixodida: Ixodidae) resistant to pyrethroids. For the control of *Rhipicephalus microplus*, cattle tick, pyrethroid compounds are used among others. The study of the mechanisms of resistance to pyrethroids in this tick has shown the presence of mutations in the sodium channel gene, the target site of acaricide. The main objective of the present study was to detect the T2134A polymorphism in the sodium channel gene that has been related to pyrethroid resistance in carriers. To do so, 182 ticks *R. microplus* were collected in two farms with a history of resistance to this type of acaricide and were subjected to a dip test of females in a cypermethrin solution prepared at the recommended dose for field use, obtaining six susceptible, 92 resistant and 84 moderately resistant. DNA is extracted from all specimens using QIAamp DNA Mini Kit[®] and processed by conventional PCR using allele-specific primers to amplify a segment of domain IIIS6 of the sodium channel gene. The resulting amplicons were detected by electrophoresis in 2 % agarose gels stained with GelRed[®] and visualized with ultraviolet light. In the same way, 20 samples were sequenced of the three susceptible phenotypes, moderately resistant and resistant and the resulting sequences were aligned through the Mega 7 program and compared with the sequences stored in the GenBank[®]. The information of the population of *R. Microplus* studied did not show the expected mutation but a different mutation in the site 2134. We also observed the substitution of a thymine but by a cytosine, T2134C, which changes to a phenylalanine by a leucine, a difference from the previously identified mutation, that the change from phenylalanine to isoleucine. This shows the presence of a polymorphism that has not been reported in this species of tick and that would generate a new molecular marker of pyrethroid resistance for populations of this mite.

Key words: ticks; chemical resistance; pesticides; mutations; polymerase chain reaction.

Diaz-Rivera, E., Holguín Cespedes, G., & Urrea Montes, D. A. (2019). Nuevo polimorfismo en el gen del canal del sodio de la garrapata *Rhipicephalus microplus* (Ixodida: Ixodidae) resistente a piretroides. *Revista de Biología Tropical*, 67(4), 935-944.

La garrapata común de los bovinos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Murrell & Barker, 2003) representa uno de los principales problemas sanitarios en ganaderías de regiones tropicales y subtropicales alrededor del mundo por ser vector de agentes causales de babesiosis

y anaplasmosis, producir anemia e inyectar toxinas a sus hospedadores, generando grandes pérdidas económicas en la producción (Solario, Rodríguez-Vivas, Pérez, & Wagner, 1999; Rosario-Cruz et al., 2005). Para controlar las altas infestaciones de esta garrapata, a escala

mundial se han usado predominantemente compuestos acaricidas aplicados sobre el cuerpo del bovino en forma de baños a intervalos específicos determinados por la eficacia residual, la región ecológica y la susceptibilidad del acaro (Sangster, 2001; Rosario-Cruz et al., 2005; Nari, 2011). El uso continuo de acaricidas organofosforados, formamidas y piretroides ha seleccionado individuos resistentes a ellos, siendo la resistencia a piretroides sintéticos una de las más difundidas en las áreas donde *R. microplus* está presente (He, Chen, Davey, Ivie, & George, 1999; Miller, Davey, & George, 1999; Villarino, Wagner, & George, 2002; Rosario-Cruz et al., 2005; Jonsson, Cutulle, Corley, & Sedon, 2010; Andreotti et al., 2011; Domingues et al., 2012; Lovis et al., 2012).

El blanco de los piretroides sintéticos (PS) son los canales del sodio dependientes del voltaje al impedir que estos se cierren y permitir la entrada continua de iones sodio, manteniendo la transmisión del impulso nervioso y generando un efecto de derribo por parálisis muscular conocido como “knock down” (Soderlund & Knipple, 2003; Hemingway, Hawkes, McCarrroll & Ranson, 2004; Rinkevich, Du & Dong, 2013; Stone et al., 2014). El canal del sodio está formado por pequeñas proteínas integrales de membrana cuya estructura primaria la componen cuatro dominios (I–IV) con seis segmentos transmembranales cada uno (S1–S6), todos ellos necesarios para iniciar y propagar el potencial de acción a través de las células nerviosas (Hemingway et al., 2004; Brackenbury & Isom, 2011; Dong et al., 2014; Klafke et al., 2017). La presión de selección por el uso frecuente de PS, ha generado en *R. microplus* mecanismos de resistencia de tipo metabólico como la detoxificación enzimática y la alteración del sitio blanco del acaricida. En cuanto a la detoxificación enzimática, diversos trabajos han encontrado una mutación en una carboxilesterasa que aumenta su actividad hidrolítica hacia compuestos piretroides (Baffi et al., 2007; Chen et al., 2009; Diaz & Vallejo, 2013). La alteración del sitio blanco del acaricida se da a través de mutaciones puntuales en los dominios II y III del gen del

canal del sodio (He et al., 1999; Stone et al., 2014; Wyk, Baron, & Maritz-Olivier, 2016). Así, cuatro polimorfismos de nucleótido simple (SNP) han sido reportados, el primero, T2134A, en el dominio III S6 de garrapatas resistentes en México y Norte América, los otros tres, C190A en garrapatas resistentes de Estados Unidos, Australia, India y Suráfrica, G215T en garrapatas resistentes de Australia y T170C en garrapatas resistentes de México y Estados Unidos, ocurren en el dominio II S4-5 (Lovis et al., 2012; Kumar et al., 2013; Stone et al., 2014; Wik et al., 2016; Sungirai et al., 2018). Estudios realizados en Brasil, Suramérica, no detectaron el SNP T2134A pero en uno de ellos se encontró una alta prevalencia de la mutación C190A (Andreotti et al., 2011; Domingues et al., 2012).

En el presente trabajo se reporta un nuevo SNP en el sitio 2134 del dominio III S6 diferente al previamente reportado en el mismo sitio para garrapatas *R. microplus* de Estados Unidos y México, presente en poblaciones provenientes de fincas del centro de Colombia con historial de resistencia a piretroides y que al ser sometidas a una prueba de inmersión de hembras adultas mostraron resistencia a cipermetrina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio: El estudio se desarrolló con teleoginas (hembras ingurgitadas) de *R. microplus* recolectadas en dos fincas ganaderas de la Universidad del Tolima ubicadas en el valle del alto Magdalena (4°38'25" N - 75°05'16" W & 5°2'19" N- 74°53'31" W), 80 km al norte de la ciudad de Ibagué, Colombia. Las fincas, distantes entre sí 10 km, se encuentran en zona de vida de Bosque Seco Tropical según Holdridge, a una altura de 285 m.s.n.m., con temperatura promedio de 28 °C, humedad relativa de 71 % y precipitación media anual de 1 738 mm. En estos predios un estudio realizado previamente reportó diferentes niveles de resistencia hacia acaricidas, entre ellos PS, lo que llevaba a aplicar baños a los bovinos con intervalo menor a tres semanas

y a rotar frecuentemente el principio activo (Díaz-Rivera, 2015).

Prueba de quimioresistencia: Se recolectaron 202 teleoginas, 72 en la finca La Granja y 130 en la finca La Reforma, que fueron sometidas a una prueba *in vitro* de inmersión de hembras adultas para detección de resistencia descrita por Drummond, Ernst, Trevino, Gladney y Graham (1973) y modificada según Baffi et al. (2007). Así, del total de especímenes 182 garrapatas se sumergieron durante tres minutos en una solución de cipermetrina comercial de 150 ppm (Laboratorios Elanco), diluyendo 0.1 ml en 100 ml de agua destilada según la dosis recomendada por el fabricante para uso en campo, empleando como grupo control las restantes 20 teleoginas que fueron sumergidas en agua destilada. Luego de la inmersión, las garrapatas se colocaron en cajas de Petri y se mantuvieron en estufa de incubación a 28 °C y 80 % de humedad relativa, revisando diariamente para verificar el nivel de postura o la muerte de teleoginas. De acuerdo con Baffi et al. (2007) se establecieron grupos de garrapatas resistentes (con ovoposición completa a los 14 días), susceptibles (que murieron las primeras 24 horas post-tratamiento) y moderadamente resistentes (que sobrevivieron pero no ovopositaron o con ovoposición incompleta a los 14 días). Al terminar la prueba se realizó una incisión a lo largo del cuerpo de los 182 especímenes, lavando con agua desionizada para eliminar residuos de sangre bovina, almacenando cada cutícula en tubos Eppendorf con alcohol al 70 % y refrigerando a -20 °C.

Purificación de ADN y condiciones de PCR: A partir de las cutículas almacenadas se obtuvo ADN utilizando el protocolo para trabajo con tejidos animales de QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemania). Para lograr una alta disolución del tejido, las 182 cutículas se maceraron con morteros para Eppendorf y luego se incubaron durante 16 horas con proteinasa K. Los iniciadores empleados para amplificar mediante PCR alelo específico un fragmento de 68 pb del gen del canal del sodio

de *R. microplus* que incluye la posición 2134 donde se encuentra la mutación timina por adenina, fueron: 5'-TTA TCT TCG GCT CCT TCT-3' (derecho, específico silvestre), 5'-TTA TCT TCG GCT CCT TCA-3' (derecho, específico mutante) y 5'-TTG TTC ATT GAA ATT GTC GA-3' (izquierdo, inespecífico), descritos por Guerrero, Davey y Miller (2001).

Para realizar el PCR se preparó una mezcla con 2 µl de solución de ADN genómico, 1 µl de cada iniciador (10 pmol), 0.5 µl de mezcla de dNTPs (10 mM), 1 µl de MgCl₂ (25 mM), 2.5 µl de buffer PCR 10X, 0.125 µl de HotStar Taq DNA Polimerasa (5U/ µl) (Qiagen, Hilden, Alemania) y 16.875 µl de agua ultrapura para un volumen total de 25 µl. Las condiciones de amplificación en un termociclador T100 Bio-Rad fueron 95 °C por 15 minutos inicialmente para activar la polimerasa, 35 ciclos de 94 °C por un minuto, 60 °C por un minuto y 72 °C por un minuto, y una extensión final a 72 °C por siete minutos. Los productos del PCR fueron detectados por electroforesis en gel de agarosa (Invitrogen, Carlsbad, Estados Unidos) al 2 %, empleando como escala el marcador de peso ØX174RF DNA/Hae III Fragments (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Estados Unidos) y como control de reacción una mezcla sin ADN, visualizando los fragmentos con Gel-Red® (Biotium, Fremont, Estados Unidos) y luz ultravioleta. Las muestras que generan un amplicón de 68 pb solamente con los iniciadores inespecífico y silvestre se consideran homocigoto susceptible, las muestras que amplifican solamente con los iniciadores inespecífico y mutante se consideraron homocigoto resistente y las muestras que amplifican con ambos iniciadores se consideran heterocigotos.

Análisis de la secuencia de fragmentos amplificados: A fin de delimitar un fragmento del gen de 193 pb que contiene la mutación buscada, se utilizaron los iniciadores reportados por Chen et al. (2009) Na-F-seq 5'-CTG GTT ACA TCA TAT CTA ATT GCC AC-3' y Na-R-Seq 5'-CCA, GCC, TTC, TTC, TTT, TGT, TCA, TTG-3', para su amplificación en veinte muestras (diez de La Granja y 10 de La

Reforma): seis susceptibles (S), siete moderadamente resistentes (MR) y siete resistentes (R).

Para ello se preparó una mezcla conteniendo 2 µl de ADN genómico, 1 µl de cada iniciador (200 nM), 1,5 µl (200 µM) de mezcla de dNTPs, 1,5 µl de MgCl₂ (25 mM), 2,5 µl de buffer PCR 10X, 0,125 µl de HotStar Taq DNA Polimerasa (5U/ µl) (Qiagen, Hilden, Alemania) y 15,375 µl de agua ultrapura para un volumen total de 25 µl. El perfil térmico para la amplificación fue de 95 °C por 15 minutos, 34 ciclos de 95 °C por un minuto, 62 °C por un minuto y 72 °C por un minuto, y una extensión final a 72 °C por siete minutos. Luego de verificar la amplificación por electroforesis, 60 µl del amplicon fueron purificados con 4 µl de ExoSAP IT (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Estados Unidos) y secuenciados directamente usando el método de terminación de cadena con dideoxy en ambas hebras usando 5 pmol/ml de cada primer. La secuenciación fue llevada a cabo empleando un secuenciador Biosystems 3 730xl y ABI 3 700 (Macrogen, Seoul, Korea) con 50 ng/ml de cada producto de PCR. Las secuencias obtenidas se ensamblaron y editaron empleando el programa Staden versión 2.0 (Bonfield, Smith, & Staden, 1995) y se confirmaron por BLAST. Posteriormente, las secuencias fueron alineadas usando

el programa MEGAX (Kumar, Stecher, Li, Knyaz, & Tamura, 2018) para su genotificación de acuerdo a la presencia o ausencia de la mutación. Finalmente, dichas secuencias fueron reportadas para su almacenamiento en la base de datos de secuencias genéticas GenBank®, perteneciente al NIH (National Institute of Health) de Estados Unidos.

RESULTADOS

Niveles de resistencia: La prueba biológica de inmersión de hembras adultas permitió observar como en las dos fincas evaluadas la situación de resistencia hacia piretroides es bastante marcada en la población de *R. microplus*. De 182 teleoginas desafiadas con cipermetrina, 50,6 % fue resistente, 46,1 % fue moderadamente resistente y un muy pequeño porcentaje, 3,3 %, fue susceptible a este acaricida, denotando un alto grado de dispersión del fenotipo resistente.

PCR alelo específico: En reacciones donde se usó el iniciador específico silvestre se amplificó el fragmento de 68 pb en todas las muestras con fenotipo susceptible (S) y moderadamente resistente (MR), mientras que en las

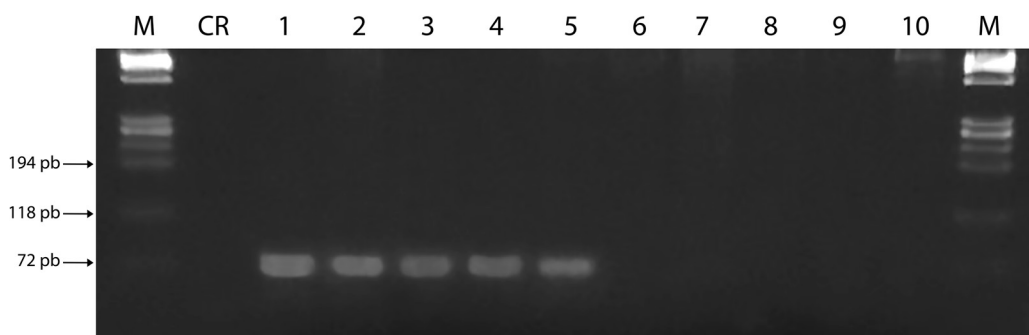


Fig. 1. Amplificación con iniciadores específicos. M: ØX174 RF DNA/*Hae* III Fragments. CR: control de reacción. Líneas uno a cinco, amplificación con iniciador específico silvestre. Línea uno: REF60 (S), línea dos: REF61 (MR), línea tres: REF98 (MR), línea cuatro: GR7 (S), línea cinco: GR2 (MR). Líneas seis a diez, amplificación con iniciador específico resistente. Línea seis: REF60 (S), línea siete: REF61 (MR), línea ocho: REF 98 (MR), línea nueve: GR7 (S), línea diez: GR2 (MR).

Fig. 1. Amplification with specific primers. M: ØX174 RF DNA/*Hae* III Fragments. CR: Reaction control. Lines one to five amplification with wild-type specific primer. Line one: REF60 (S), line two: REF61 (MR), line three: REF98 (MR), line four: GR7 (S), line five: GR2 (MR). Lines six to ten amplification with resistant specific primer. Line six: REF60 (S), line seven: REF61 (MR), line eight: REF 98 (MR), line nine: GR7 (S), línea ten: GR2 (MR).

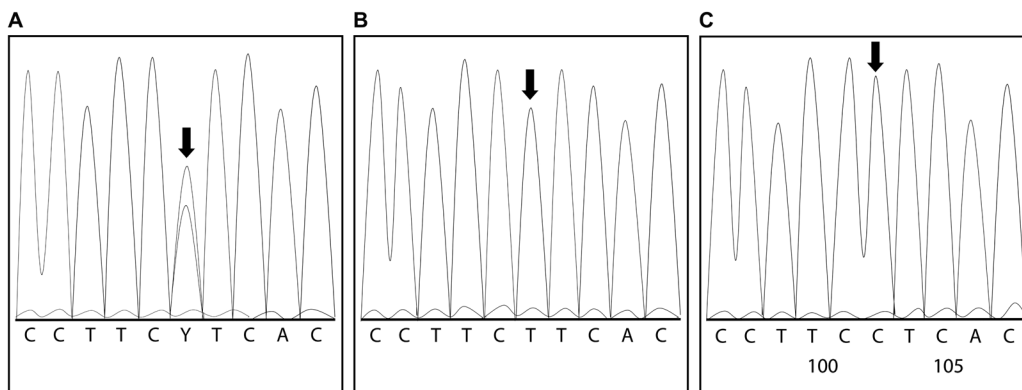


Fig. 2. Electroferogramas de la secuencia de nucleótidos del fragmento del gen del canal del sodio mostrando mutación de una timina por una citosina, señalada con una flecha, en muestras de (A) garrapatas *R. microplus* moderadamente resistente/heterocigoto (Y es T/C), (B) susceptibles/homocigoto silvestre y (C) resistentes/homocigoto mutante.

Fig. 2. Electropherograms of nucleotide sequence of sodium channel gene fragment showing mutation thymine by a cytosine, indicated by arrow, in samples of (A) moderately resistant *R. microplus* ticks/ heterozygote (Y is T/C), (B) susceptible/wild-type homozygote and (C) resistant/mutant homozygote.

reacciones donde se usó el iniciador específico mutante no se logró amplificar el fragmento de 69 pb en las muestras con los distintos fenotipos (Fig. 1).

Secuenciación de nucleótidos: El análisis de las secuencias obtenidas y su comparación con secuencias almacenadas en GenBank permitió observar como en la posición 2134 se presenta un polimorfismo diferente al reportado previamente en el mismo sitio. En el presente estudio los electroferogramas de la secuenciación registran la sustitución de una timina por una citosina en garrapatas fenotípicamente resistentes y moderadamente resistentes (Fig. 2). La muestra de un individuo susceptible presenta un claro residuo de timina, la de un individuo resistente muestra un nítido residuo de citosina en el mismo sitio y la muestra de un individuo moderadamente resistente presenta dos picos de altura similar de timina y citosina confirmando la heterocigosis en este fenotipo.

Esta sustitución de timina por citosina puede observarse en todas las muestras de garrapatas resistentes y moderadamente resistentes al alinear y comparar las secuencias (Fig. 3) que fueron depositadas en el

GenBank® bajo las accesiones MH424364-MH424366-MH424368-MH424370-MH424371-MH424373-MH424375-MH424381-MH424382-MH424383 para el genotipo mutante y las accesiones MH424365-MH424367-MH424369-MH424372-MH424374-MH424376-MH424377-MH424378-MH424379-MH424380 para el genotipo natural.

De igual manera, la traducción de estas secuencias resulta en el cambio de un aminoácido fenilalanina por una leucina (Fig. 4), a diferencia de la mutación previamente reportada que genera el cambio de una fenilalanina por una isoleucina.

DISCUSIÓN

El presente trabajo con 182 teleoginas de *R. microplus* estudiadas, no demostró la presencia del polimorfismo T2134A reportado previamente en el gen del canal del sodio de garrapatas con algún nivel de resistencia a piretroides sintéticos (PS). En cambio demostró en estos individuos la sustitución de una timina por una citosina en la misma posición, T2134C, que al traducir para aminoácidos da lugar a la sustitución de una fenilalanina por

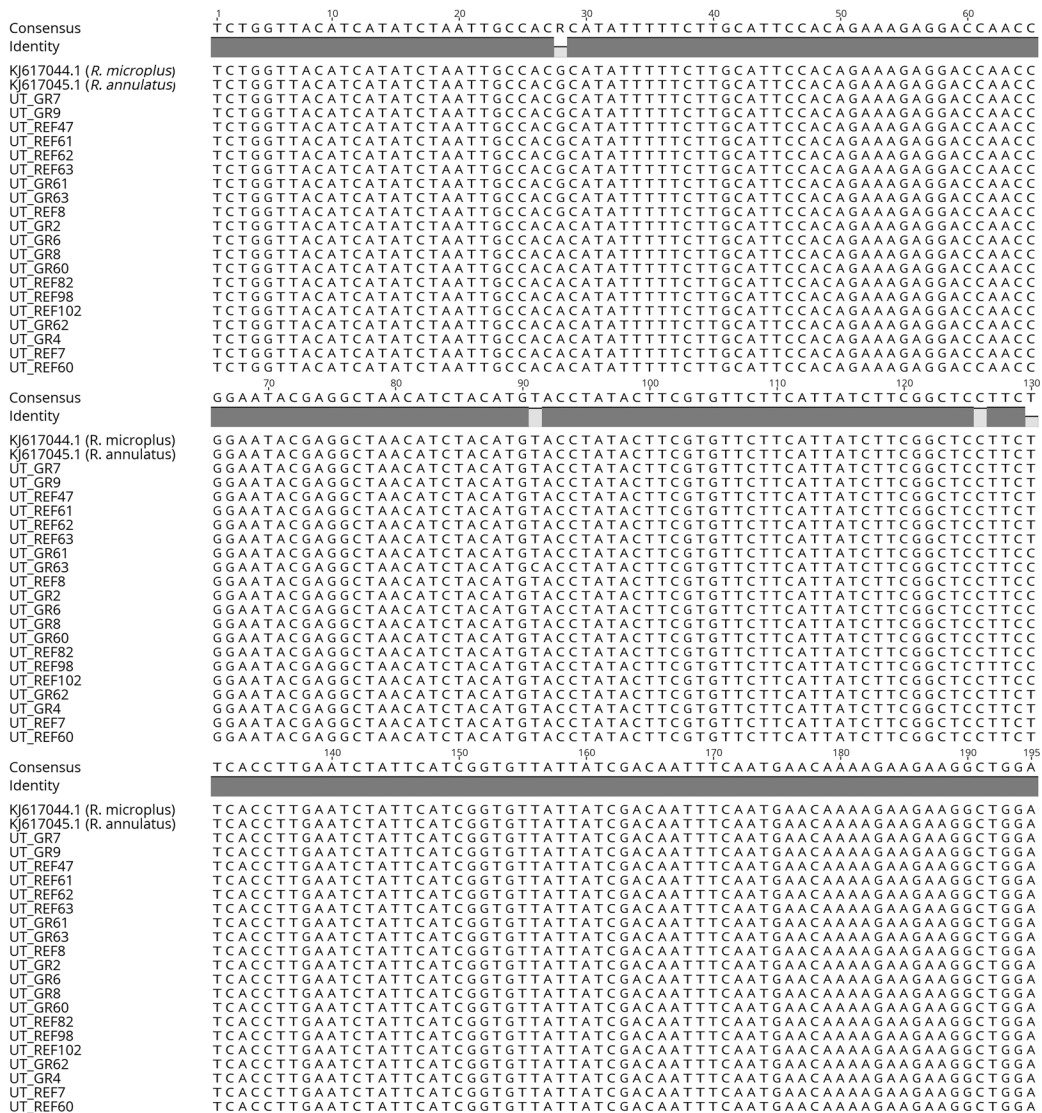


Fig. 3. Secuencia de nucleótidos alineadas para su comparación. Los nucleótidos en la columna 130 muestran la citosina que sustituye una timina en ADN del gen del canal del sodio de garrapatas *R. microplus* resistentes o moderadamente resistentes a cipermetrina. Fenotipo susceptible: GR7, REF7, REF60, REF61, REF62, REF63; moderadamente resistente: GR2, GR60, GR61, GR62, GR63, REF98, REF102; resistente: GR4, GR6, GR8, GR9, REF8, REF47, REF82.

Fig. 3. Nucleotide sequence aligned for comparison. Nucleotides in column 130 shown cytosine replacing thymine in DNA of the sodium channel gene of ticks *R. microplus* resistant or moderately resistant to cipermetrin. Susceptible phenotype: GR7, REF7, REF60, REF61, REF62, REF63; moderately resistant phenotype: GR2, GR60, GR61, GR62, GR63, REF98, REF102; resistant phenotype: GR4, GR6, GR8, GR9, REF8, REF47, REF82.

una leucina, situación que hasta el momento no ha sido reportada para esta especie de garrapata. La mutación T2134A en el dominio III del gen solo ha sido comprobada en poblaciones de *R. microplus* de México y Norte América

(He et al., 1999; Guerrero, Lovis, & Martins, 2012), mientras que en países como Brasil, India, Suráfrica y Australia se han encontrado otro tipo de mutaciones en el dominio II del gen del canal del sodio que contribuyen con la



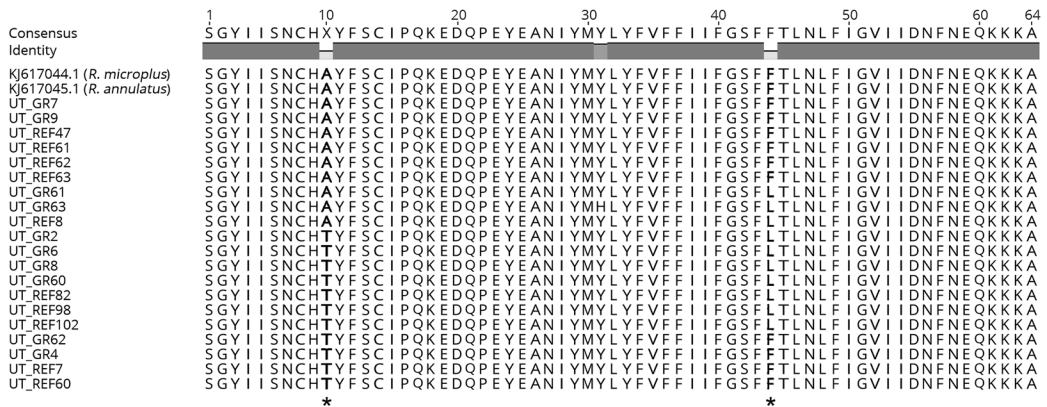


Fig. 4. Aminoácidos resultantes de las secuencias alineadas. La columna 44 señalada con un asterisco muestra el cambio de una fenilalanina (F) por una leucina (L) en muestras de *R. microplus* con diferente nivel de resistencia a cipermetrina.
Fig. 4. Amino acids resulting from aligned sequences. Column 44 marked with an asterisk shows the change of phenylalanine (F) for leucine (L) in samples of *R. microplus* with different level of resistance to cypermethrine.

resistencia a PS en este acaro (Andreotti et al., 2011; Domingues et al., 2012; Kumar et al., 2013; Wik, Baron, & Maritz-Olivier, 2016). Sin embargo, en la garrapata de los perros *Rhipicephalus sanguineus* la mutación T2134C si ha sido encontrada como lo reportan Klafke et al. (2017). Estos autores estudiaron poblaciones de *R. sanguineus* en el estado de Florida, EE. UU., resistentes a piretroides y encontraron cuatro polimorfismos en el dominio III segmento 6, de los cuales solamente la sustitución T2134C originaba un cambio de aminoácido, fenilalanina por leucina. En ambas especies, *R. microplus* y *R. sanguineus*, se ha observado alta conservación en la secuencia de nucleótidos del gen del canal del sodio y la variante en la posición T2134 se asocia con resistencia a piretroides al alterar la estructura de la proteína del sitio blanco (Klafke et al. 2017). No obstante, los otros SNP relacionados con resistencia a PS que han sido reportados en el gen del canal del sodio de este tipo de ácaros podrían estar presentes en la población de garrapatas estudiada en este trabajo o en especímenes de otras regiones, pero no fueron objeto de búsqueda.

Estudios filogenéticos desarrollados en años recientes con las diversas especies del género *Rhipicephalus* han demostrado la presencia de especies crípticas de *R. microplus* en algunas regiones del mundo (Burguer, Shao &

Barker, 2014) y también han revelado un complejo de especies a los que se les ha denominado complejo *R. microplus*, compuesto por un clado A que incluye *R. annulatus*, *R. australis* y garrapatas *R. microplus* de América, Asia y África; un clado B compuesto por garrapatas *R. microplus* de China y un clado C con garrapatas *R. microplus* de India y Malasia (Burguer, Shao, & Barker, 2014; Low et al., 2015). Esto sugiere una amplia gama de situaciones evolutivas y adaptativas que pueden haber dado lugar a mutaciones en el genoma de estas garrapatas generadoras de diferencias en su ADN como un costo de adaptación al ambiente y a las prácticas de manejo para controlar sus altas poblaciones (Sungirai et al., 2018). *R. microplus* es una especie de garrapata distribuida globalmente por lo que está expuesta a diferentes presiones de selección en cada región que dan lugar al desarrollo de múltiples mecanismos moleculares de resistencia (Wyk et al., 2016; Klafke et al., 2017). Posiblemente esta sea una de las causas por las cuales en el continente americano al estudiar el gen del canal del sodio de garrapatas *R. microplus* resistentes a PS, se han encontrado diferentes SNPs que han sido relacionados con dicha característica fenotípica. Las mutaciones C190A, T170C (Stone et al., 2014) y T2134A (He et al., 1999) en Norteamérica, EE.UU., T2134A (He et

al., 1999) en Centroamérica, México, C190A (Domingues et al., 2012) en Suramérica, Brasil, y la mutación T2134C reportada en el presente estudio en Colombia, muestran como la presión de selección generada por el uso de compuestos alelopáticos o pesticidas junto con posibles procesos de especiación alopátrica o simpátrica incipientes, están dando lugar a poblaciones de *R. microplus* con características genotípicas diferenciales como ha sucedido en otros continentes.

Como se mencionó, la mutación T2134C puede manifestar fenotípicamente resistencia a piretroides en *R. microplus* pero no necesariamente ser la única responsable de esta característica ya que pueden confluír otros mecanismos de resistencia como la detoxificación enzimática demostrada previamente en garrapatas de esta especie en Colombia (Díaz & Vallejo, 2013). Por ello es importante continuar con estudios de genómica, proteómica y metabolómica en *R. microplus* a fin de lograr una mayor comprensión de los procesos de resistencia a químicos y poder así contribuir al desarrollo de fármacos que afecten nuevos sitios blanco y al desarrollo de nuevas vacunas contra esta garrapata, todo ello con el objeto de disminuir los problemas de resistencia a plaguicidas y optimizar los programas de control de altas infestaciones.

Declaración de ética: los autores declaran que todos están de acuerdo con esta publicación y que han hecho aportes que justifican su autoría; que no hay conflicto de interés de ningún tipo; y que han cumplido con todos los requisitos y procedimientos éticos y legales pertinentes. Todas las fuentes de financiamiento se detallan plena y claramente en la sección de agradecimientos. El respectivo documento legal firmado se encuentra en los archivos de la revista.

AGRADECIMIENTOS

Al Comité Central de Investigaciones de la Universidad del Tolima por el financiamiento de la presente investigación.

RESUMEN

Para el control de *Rhipicephalus microplus*, garrapata común de los bovinos, se usan compuestos piretroides entre otros. El estudio de los mecanismos de resistencia hacia piretroides en esta garrapata ha demostrado la presencia de mutaciones en el gen del canal del sodio, sitio blanco del acaricida. El presente estudio tuvo como objetivo principal detectar el polimorfismo T2134A en el gen del canal del sodio que ha sido relacionado con resistencia a piretroides en individuos portadores. Para ello se recolectaron 182 garrapatas *R. microplus* en dos fincas con historial de resistencia a este tipo de acaricidas y se sometieron a una prueba de inmersión de hembras en una solución de cipermetrina preparada a la dosis recomendada para uso en campo, obteniendo seis individuos susceptibles, 92 resistentes y 84 medianamente resistentes. Se extrajo el ADN de todos los especímenes utilizando QIAamp DNA Mini Kit® y se procesó por PCR convencional empleando cebadores alelo específicos para amplificar un segmento del dominio IIIS6 del gen del canal del sodio. Los amplicones resultantes se detectaron por electroforesis en geles de agarosa al 2 % teñidos con GelRed® y se visualizaron con luz ultravioleta. De igual manera se efectuó el secuenciamiento de 20 muestras obtenidas en los tres fenotipos susceptible, medianamente resistente y resistente y las secuencias resultantes fueron alineadas mediante el programa Mega 7 y comparadas con secuencias almacenadas en el GenBank®. Los análisis mostraron que la población de *R. microplus* estudiada no presentaba la mutación esperada sino una mutación diferente en el sitio 2134. Se observó la sustitución de una timina pero por una citosina, T2134C, que a la traducción genera el cambio de una fenilalanina por una leucina, a diferencia de la mutación previamente identificada, que genera el cambio de una fenilalanina por una isoleucina. Esto demuestra la presencia de un polimorfismo que no ha sido reportado en esta especie de garrapata y que generaría un nuevo marcador molecular de resistencia a piretroides para poblaciones de este ácaro.

Palabras clave: garrapatas; resistencia a químicos; pesticidas; mutaciones; reacción en cadena de la polimerasa.

REFERENCIAS

- Andreotti, R., Guerrero, F., Soares, M., Cavalcante, J., Miller, R., & Perez, A. (2011). Acaricide resistance of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in state of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria*, 20(2), 127-133.
- Baffi, M., de Souza, G., Ueira, C., de Sousa, C., Gourlard, L., & Bonetti, A. (2007). Identification of point mutations in a putative carboxylesterase and their association with acaricide resistance in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*, 148, 301-309.

- Bonfield, J. K., Smith, K. F., & Staden, R. (1995). A new DNA sequence assembly program. *Nucleic Acids Research*, *23*, 4992-4999.
- Brackenbury, W. J., & Isom, L. L. (2011). Na channel β subunits: overachievers of the ion channel family. *Frontier in Pharmacology*, *2*, 53.
- Burguer, T. D., Shao, R., & Barker, S. C. (2014). Phylogenetic analysis of mitochondrial genome sequences indicates that the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, contains a cryptic species. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *76*, 241-253.
- Chen, A., He, H., Temeyer, K., Jones, S., Green, P., & Barker, S. (2009). A survey of *Rhipicephalus microplus* populations for mutations associated with pyrethroid resistance. *Journal of Economic Entomology*, *102*(1), 373-380.
- Diaz, E., & Vallejo, A. (2013). Identificación de un polimorfismo del gen Est9 relacionado con resistencia a piretroides en *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Revista MVZ Córdoba*, *18* (Supl), 3708-3714.
- Diaz-Rivera, E. (2015). Evaluación *in vitro* de resistencia a acaricidas en *Rhipicephalus microplus*. Estudio de caso en el norte del Tolima, Colombia. *Revista Colombiana de Ciencia Animal*, *8*(1), 37-43.
- Domingues, L., Brasil, B., Paiva Bello, A., da Cunha, A., de Barros, A., Cerqueira, R., ... Friche, L. (2012). Survey of pyrethroid and organophosphate resistance in Brazilian field populations of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: Detection of C190A mutation in domain II of the *para*-type sodium channel gene. *Veterinary Parasitology*, *189*, 327-332.
- Dong, K., Du, Y., Rinkevich, F., Nomura, Y., Xu, P., Wang, L., ... Zhorov, B. (2014). Molecular biology of insects sodium channels and pyrethroid resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *50*, 1-17.
- Drummond, R., Ernst, S., Trevino, J., Gladney, W., & Graham, O. (1973). *Boophilus annulatus* and *Boophilus microplus*: Laboratory test of insecticides. *Journal of Economic Entomology*, *66*, 130-133.
- Guerrero, F. D., Davey, R. B., & Miller, R. J. (2001). Use of an allele-specific polymerase chain reaction assay to genotype pyrethroid resistant strains of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*, *38*(1), 44-50.
- Guerrero, F. D., Lovis, L., & Martins, J. R. (2012). Acaricide resistance mechanisms in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria*, *21*, 1-6.
- He, H., Chen, A., Davey, R., Ivie, G., & George, J. E. (1999). Identification of a point mutation in the *para*-type sodium channel gen from a pyrethroid resistant cattle tick. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *261*(3), 558-561.
- Hemingway, J., Hawkes, N. J., McCarroll, L., & Ranson, H. (2004). The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *34*, 653-665.
- Jonsson, N. N., Cutulle, C., Corley, S. W., & Seddon, J. M. (2010). Identification of a mutation in the para-sodium channel gene of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* associated with resistance to flumethrin but not to cypermethrin. *International Journal for Parasitology*, *40*, 1659-1664.
- Klafke, G. M., Miller, R. J., Tidwell, J., Barreto, R., Guerrero, F. D., Kaufman, P. E., & Perez de Leon, A. A. (2017). Mutation in the sodium channel gene corresponds with phenotypic resistance of *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* (Acari: Ixodidae) to pyrethroids. *Journal of Medical Entomology*, *54*(6), 1639-1642.
- Kumar, R., Nagar, G., Sharma, A., Kumar, S., Ray, D. D., Chaudhuri, P., & Ghosh, S. (2013). Survey of pyrethroids resistance in Indian isolates of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: Identification of C190A mutation in the domain II of the para-sodium channel gene. *Acta Tropica*, *125*, 237-245.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, *35*(6), 1547-1549.
- Lovis, L., Guerrero, F. D., Miller, R. J., Bodine, D. M., Bettschart, B., & Sager, H. (2012). Distribution patterns of three sodium channel mutation associated with pyrethroid resistance in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* populations from north and south America, south Africa and Australia. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, *2*, 216-224.
- Low, V. L., Tay, S. T., Koh, K. L., Tan, T. K., Lim, Y. A., Ong, B. L., ... Sofian-Azirun, S. (2015). Molecular characterisation of the tick *Rhipicephalus microplus* in Malaysia: new insights into the cryptic diversity and distinct genetic assemblages throughout the world. *Parasites & Vectors*, *8*, 341.
- Miller, R. J., Davey, R. B., & George, J. E. (1999). Characterization of pyrethroid resistance and susceptibility to coumaphos in Mexican *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*, *36*, 533-538.
- Murrell, A., & Barker, S. (2003). Synonymy of *Boophilus* Curtice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). *Systematic Parasitology*, *56*(3), 169-172.
- Nari, A. (2011). Towards sustainable parasite control practices in livestock productions with emphasis in Latin America. *Veterinary Parasitology*, *180*, 2-11.
- Rinkevich, F. D., Du, Y., & Dong, K. (2013). Diversity and convergence of sodium channel mutations involved

- in resistance to pyrethroids. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 106, 93-100.
- Rosario-Cruz, R., Guerrero, F., Miller, R. J., Rodriguez-Vivas, R. I., Dominguez-Garcia, D. I., Cornel, A. J., ... George, J. E. (2005). Roles played by esterase activity and by a sodium channel mutation involved in pyrethroid resistance in population of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) collected from Yucatan, Mexico. *Journal of Medical Entomology*, 42(6), 1020-1025.
- Sangster, N. C. (2001). Managing parasiticide resistance. *Veterinary Parasitology*, 98, 89-109.
- Solorio, R. J., Rodriguez-Vivas, V. R. I., Perez, G. E., & Wagner, G. (1999). Management factors associated with *Babesia bovis* seroprevalence in cattle from eastern Yucatan, Mexico. *Preventive Veterinary Medicine*, 40, 261-269.
- Soderlund, D. M., & Knipple, D. C. (2003). The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 33, 563-577.
- Stone, N., Olafson, P., Davey, R., Buckmeier, G., Bodine, D., Sidak-Loftis, L., ... Wagner, D. (2014). Multiple mutations in the para-sodium channel gene are associated with pyrethroid resistance in *Rhipicephalus microplus* from the United States and Mexico. *Parasites & Vectors*, 7, 456-470.
- Sungirai, M., Baron, S., Zandile, D., De Clercq, P., Maritz-Olivier, C., & Madder, M. (2018). Genotyping acaricide resistance profiles of *Rhipicephalus microplus* tick populations from communal land areas of Zimbabwe. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 9, 2-9.
- Villarino, M., Wagner, G. G., & George, J. E. (2002). *In vitro* detection acaricide resistance in *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Experimental and Applied Acarology*, 28, 265-271.
- Wyk, R. D., Baron, S., & Maritz-Olivier, C. (2016). An integrative approach to understanding pyrethroid resistance in *Rhipicephalus microplus* and *R. decoloratus* ticks. *Tick and Tick-borne Diseases*, 7(4), 586-594.