

Variabilidad en la actividad general de esterasas de la garrapata *Boophilus microplus* y su relación con la resistencia a organofosforados

General esterase activity variation in the cattle tick *Boophilus microplus* and its relationship with organophosphate resistance

Noé Soberanes Céspedes^a, Rodrigo Rosario Cruz^b, Minerva Santamaría Vargas^a,
Zeferino García Vazquez^b

RESUMEN

La actividad de esterasas incrementada en artrópodos es considerada una importante señal bioquímica de resistencia a pesticidas. En *Boophilus microplus* las esterasas han sido asociadas con resistencia a compuestos organofosforados y piretroides. El objetivo de este estudio fue analizar la resistencia a ixodicidas en cinco cepas de *B. microplus* con diferentes niveles de susceptibilidad, medida por la cuantificación de la actividad de esterasas y su correlación con los Índices de resistencia (IR) de las mismas cepas. El análisis toxicológico se llevó a cabo mediante el bioensayo de paquete de larvas, utilizando una dosis discriminante equivalente a dos veces la DL₉₉ determinada por el análisis Probit, a partir de los cuales se estimaron los IR para cada cepa. Los extractos proteicos de larvas de cada una de las cinco cepas se realizaron macerando 100 mg de larvas de 10 días de edad, en 2 ml de solución amortiguadora de fosfatos. Los macerados, fueron analizados mediante espectrofotometría para la detección de esterasas. La actividad específica de esterasas, mostró una correlación significativa ($P < 0.05$) con el IR del clorfenvinfos ($r = 0.80$) pero no con el índice del coumafos ($r = 0.70$) ni con el del diazinon ($r = 0.47$). Se concluye que la detección espectrofotométrica de esterasas es un marcador de resistencia al acaricida clorfenvinfos, que puede ser fácilmente adaptado en microplaca y propuesto como un método más rápido fácil y más sensible comparado con el bioensayo tradicional de paquete de larvas.

PALABRAS CLAVE: Esterasas, Garrapatas, *Boophilus microplus*, Resistencia, Ixodicidas.

ABSTRACT

Increased esterase activity in arthropods is considered as an important biochemical marker of pesticide resistance. In *Boophilus microplus*, esterases have been associated with resistance to both organophosphate and pyrethroid families. The purpose of this study was to analyze ixodicide resistance in five *B. microplus* strains with different levels of susceptibility as measured by esterase activity and its correlation with resistance indexes (RI). Toxicological analysis was performed using the larval package bioassay with one discriminating dose equivalent to 2X the LD₉₉ as determined by the Probit analysis, from which the RI for each strain was estimated. Larval protein extracts from each of the five strains were obtained by homogenizing 100 mg of 10-day-old larvae in 2 ml of phosphate buffer solution. The larval protein homogenates were spectrophotometrically analyzed for esterase detection. Specific esterase activity showed a significant ($P < 0.05$) correlation with the RI of chlorfenvinphos ($r = 0.80$), but not with those of coumafos ($r = 0.70$) or diazinon ($r = 0.47$). It was concluded that esterase spectrophotometric detection is a resistance marker for chlorfenvinphos *B. microplus* resistance, and it can be easily adapted to a microplate, and proposed as a fastest, easiest and sensitive method when compared with the traditional larval package bioassay.

KEY WORDS: Esterases, Ticks, *Boophilus microplus*, Resistance, Ixodicides.

Las garrapatas son los ectoparásitos más importantes del ganado en las áreas tropicales y subtropicales,

Ticks are the most important ectoparasites affecting cattle in tropical/subtropical areas. The tick

Recibido el 2 de marzo de 2004 y aceptado para su publicación el 2 de noviembre de 2004.

^a Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria SENASICA-SAGARPA.

^b CENID-Parasitología Veterinaria. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Km 11.5 Carr. Fed. Cuernavaca-Cuautla, Col. Progreso 62550 Jiutepec, Morelos, México. rosario.rodrigo@inifap.gob.mx Correspondencia al segundo autor.

y *Boophilus microplus* es especialmente importante por su alta prevalencia en áreas de producción ganadera⁽¹⁾. La resistencia a los ixodicidas en la garrapata *B. microplus* es un fenómeno que ha empezado a incrementarse como un problema para la ganadería, ya que en México su distribución también coincide con las áreas tropicales, que son las zonas más importantes de la industria ganadera nacional.

Desde 1981 se encuentra documentada la resistencia en la garrapata *B. microplus* hacia ixodicidas organoclorados (OC), organofosforados (OF), y en 1993 a piretroides sintéticos (PS)^(2,3,4), aumentando la frecuencia y dispersión geográfica de los casos, de 5 a 223 casos confirmados toxicológicamente para PS y de 4 a 178 para dobles resistentes a OF y PS de 1993 a 1996⁽⁵⁾. Los insecticidas OF actúan uniéndose al sitio activo de la acetilcolinesterasa para prevenir la hidrólisis de acetilcolina, un neurotransmisor esencial. La resistencia a la mayoría de los OF's comúnmente involucra un secuestro o hidrólisis del ixodicida en los tejidos del artrópodo, lo que explica la sobreproducción de enzimas con actividad de esterases en insectos resistentes^(6,7). En la garrapata *B. microplus* el análisis toxicológico y bioquímico de cepas resistentes a OF's, ha demostrado que entre las principales enzimas implicadas en el metabolismo de estos acaricidas se encuentran las esterases^(8,9), por lo que se ha hipotetizado una correlación entre los niveles incrementados de estererasas, con la expresión fenotípica de resistencia a OF^(9,10). La aplicación práctica de los estudios de resistencia a insecticidas es el desarrollo de métodos para cuantificar la resistencia, y generar la información necesaria sobre su distribución y frecuencia, para formular programas viables en el manejo de la resistencia a acaricidas⁽¹¹⁾. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el grado de asociación de los factores de resistencia obtenidos mediante el análisis Probit con la actividad general de estererasas de las cepas de garrapatas *B. microplus* resistentes a los ixodicidas, con la finalidad proponer un método diagnóstico práctico, rápido, masivo y barato.

Las larvas de las cinco cepas de *Boophilus microplus* utilizadas fueron obtenidas de colonias mantenidas

Boophilus microplus is particularly important due to its high prevalence in cattle-producing areas⁽¹⁾. *B. microplus* ixodicide resistance has started to increase in cattle operations. In Mexico the distribution of such resistance prevails in the tropical areas (country's major cattle-producing areas).

Resistance to organochlorinated (OC) and organophosphate (OP) compounds was first documented in 1981, while resistance to synthetic pyrethroids (SP) was first documented in 1993^(2,3,4). From 1995 to 1996, increased toxicologically-confirmed resistance frequency/geographic dispersion to PS rose from 5 to 223 cases while dual OP/PS resistance rose from 4 to 178 cases⁽⁵⁾. OP pesticides work by binding the acetyl cholinesterase active sites, thus preventing acetylcholine –an essential neurotransmitter– hydrolysis. Resistance to most OP ixodicides typically involves their sequestration and/or hydrolysis in arthropods' tissues. This explains increased production of enzymes with esterase activity among resistant insects^(6,7). Toxicological/biochemical analyses of OP resistant *B. microplus* strains have shown that esterases are found among major enzymes involved in the metabolism of these acaricides^(8,9). Therefore, a correlation between increased esterase levels and the phenotypic expression of OP resistance has been hypothesized^(9,10). The practical application of insecticide resistance studies includes the development of methods to quantify resistance, and to generate the necessary information about resistance distribution/frequency, in order to design viable programs for acaricide resistance management⁽¹¹⁾. The purpose of this research was to evaluate the level of association between resistance indexes –as determined by the Probit analysis– and the general esterase activity in ixodicide resistant *B. microplus* strains, with the aim of proposing a practical, rapid, massive, inexpensive diagnostic method.

Larvae from five *B. microplus* strains were obtained from the colonies maintained in SENASICA-SAGARPA's center, Jiutepec, Morelos, Mexico. The following strains were used: A "Susceptible" strain from Coahuayutla municipality, state of Guerrero (1997); An OC/OP-resistant, "Tempoal"

en el Centro de Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria SENASICA-SAGARPA en Jiutepec, Morelos, México. Las cepas utilizadas fueron: “Susceptible” obtenida en el municipio de Coahuayutla en el estado de Guerrero (1997); “Tempoal” resistente a OC y OF de Tempoal, Veracruz (1986); “Tuxpan” resistente a OF de Tuxpan, Veracruz (1982), “Mora” resistente a OF y PS de Emiliano Zapata, Tabasco (1993) y “Aldama” resistente a OF y PS de Aldama, Tamaulipas (1994).

Para los ensayos toxicológicos, se utilizaron larvas de *B. microplus* de 10 días de edad, y a cada una de las cepas se les realizó la prueba de paquete de larvas (PL)⁽¹²⁾ utilizando los ixodicidas coumafos, clorfenvinfos y diazinon (grado de pureza del 97.0, 93.9 y 95.4 %), en el laboratorio de pruebas biológicas del SENASICA-SAGARPA, y los datos se analizaron mediante el análisis Probit utilizando el paquete estadístico POLO-PC⁽¹³⁾, calculándose las concentraciones letales 50 % (CL₅₀) del coumafos, clorfenvinfos y diazinon, y los índices de resistencia (IR) por cepa. El IR es el coeficiente obtenido de dividir la CL₅₀ de la cepa resistente entre la CL₅₀ de la cepa susceptible.

La preparación de los extractos larvarios para los ensayos enzimáticos se realizaron macerando 100 mg de larvas, resuspendiéndose en 2 ml de solución amortiguadora de fosfatos (SAF) pH 7.2; la suspensión fue centrifugada a 100 xg por 5 min separando los sobrenadantes. Todas las concentraciones de proteínas fueron determinadas usando el método de Bradford⁽¹⁴⁾. Las proteínas totales de las cepas de *B. microplus* se separaron electroforéticamente en geles de poliacrilamida, en condiciones desnaturizantes con dodecil sulfato de sodio (SDS) por el método de SDS-PAGE⁽¹⁵⁾ utilizando un gel de separación del 10 % y 50 mg de proteína por carril. Al finalizar la electroforesis SDS-PAGE, las proteínas se renaturalizaron mediante tres lavados sucesivos del gel con 100 ml de triton X-100 al 1 %, y cada gel se colocó en sustrato de Gomori (10 ml de SAF 1X, conteniendo Fast Garnet (0.04 mg/ml) y a-naftil acetato (0.01 %)). Posteriormente, el gel se incubó a temperatura ambiente, hasta la aparición de bandas definidas de color rojo en cada gel⁽¹⁰⁾.

strain from Tempoal, state of Veracruz (1986); An OP-resistant, “Tuxpan” strain from Tuxpan, state of Veracruz (1982); An OP/PS-resistant, “Mora” strain from Emiliano Zapata, state of Tabasco (1993); and an OP/PS-resistant, “Aldama” strain, from Aldama, state of Tamaulipas (1994).

For the toxicological analyses, 10-day-old *B. microplus* larvae were used. Each strain was subjected to the larval package (LP) test⁽¹²⁾, using the following ixodicides: coumaphos, chlorfenvinfos, and diazinon (97.0, 93.9, and 95.4 % purity, respectively), at SENASICA-SAGARPA’S Biological Test Laboratory. Data was analyzed by the probit analysis, using the POLO-PC⁽¹³⁾ statistical software. Lethal concentrations 50% (LC₅₀) for coumaphos, chlorfenvinfos, and diazinon were calculated. Tick strain resistance indexes (RI) to these three ixodicides were also determined. RI is the coefficient obtained by dividing the LC₅₀ for the resistant strain by the LC₅₀ for the susceptible strain.

Larval extracts used in the enzyme assays were prepared by macerating 100 mg larvae. This macerate was then re-suspended in 2 ml pH 7.2 phosphate buffer solution (PBS). The suspension was centrifuged at 100 xg for 5 min. Supernatant was separated. All protein concentrations were determined using Bradford’s method⁽¹⁴⁾. Total *B. microplus* strain proteins were separated by polyacrylamide gel electrophoresis under denaturing conditions with sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE)⁽¹⁵⁾ using a 10 % separation gel and 50 mg protein per lane. Once SDS-PAGE was completed, proteins were re-natured using three successive gel washings with 100 ml 1% X-100 triton. Each gel was then placed in 10 ml of Gomori’s substrate, containing Fast Garnet (0.04 mg/ml), and 0.01% a-naphthyl acetate. Gels were then incubated at room temperature until clearly distinct red bands appeared⁽¹⁰⁾. Esterase specific activity (SA) was determined in international units (IU = mmoles hydrolyzed substrate/min/mg total protein) present in the larval extracts from each strain. SA expressed in IU was calculated using the following equation⁽⁷⁾:

$$SA = \frac{\text{corrected absorbance}}{\text{assay time (min)}} \times \frac{\text{assay volume}}{*e^{mM} \times \text{cell amplitude (cm)}}$$

Se determinó la actividad específica (AE) de enzimas con actividad de esterases en unidades internacionales (UI=mmoles del sustrato hidrolizado/min/mg de proteína total) presentes en los extractos de larvas de cada una de las cepas. La AE expresada en UI se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación⁽⁷⁾:

$$AE = \frac{\text{absorbancia corregida}}{\text{tiempo del ensayo (min)}} \times \frac{\text{volumen del ensayo}}{*e^{mM} \times \text{amplitud de la celda (cm)}}$$

Donde :

* e^{mM} = 23.593 litro mmol⁻¹ cm⁻¹ a 538 nm (coeficiente de extinción molar para a-naftil acetato).

El análisis de correlación se llevó a cabo con el programa estadístico SPSS ver.9.0, y las variables analizadas fueron los IR y las UI de enzimas con actividad de esterasa, a partir de las cuales se obtuvieron los coeficientes de correlación, para cada uno de los OF.

Los IR determinados mediante la prueba toxicológica de PL a cada una de las cepas de *B. microplus* fueron: para la cepa “Mora”, 9.2, 8.4 y 11.6 para coumafos clorfenvinfos y diazinon respectivamente, para la cepa “Tuxpan”, 3.4, 5.2 y 14.16 para coumafos clorfenvinfos y diazinon; para la cepa “Aldama”, 2, 2.6 y 1.8 para coumafos clorfenvinfos y diazinon, y para la cepa “Tempoal”, 5.5, 4.8 y 12.5 para coumafos clorfenvinfos y diazinon respectivamente (Cuadro 1).

Where:

* e^{mM} = 23.593 liter mmol⁻¹ cm⁻¹ a 538 nm (molar extinction coefficient for a-naphthyl acetate).

Correlation analysis was performed using the SPSS (ver. 9.0), and analyzed variables were RI and IU enzymes with esterase activity from which correlation coefficients were obtained for each of the OP's.

RI determined by the LP toxicological test for the different *B. microplus* strains were: “Mora” strain, 9.2, 8.4, and 11.6; “Tuxpan” strain, 3.4, 5.2, and 14.16; “Aldama” strain, 2, 2.6, and 1.8; and “Tempoal” strain, 5.5, 4.8, and 12.5 for coumafos chlorfenvinfos, and diazinon respectively (Table 1).

The SDS-PAGE assay revealed one band in the “Mora”, “Tuxpan”, “Aldama”, and “Tempoal” resistant strains which was able to hydrolyze a naphthyl acetate esters, resulting in a red, insoluble, chromogenic compound in the presence of the substrate. This demonstrated qualitative enzyme activity differences between resistant and susceptible strains (Figure 1).

Specific esterase activity (in IU) calculated from a-naphthyl acetate substrate hydrolysis was as follows: “Susceptible” strain, 0.0168 IU; “Tempoal” strain, 0.0170 IU; “Aldama” strain 0.0280 IU; “Tuxpan”

Cuadro 1. Actividad específica de esterases medida en unidades internacionales e índices de resistencia calculados para ixodicidas organofosforados en cepas de garrapatas *Boophilus microplus* para tres ixodicidas

Table 1. Specific esterase activity measured in international units (IU), and resistance indexes (RI) calculated for three organophosphate ixodicides in *Boophilus microplus* tick strains

Strains	Coumafos (r=0.70)		Clorfenvinfos (r=0.80)		Diazinon r=0.47	
	IU	RI	IU	RI	IU	RI
Tempoal	0.0170	5.5	0.0170	4.8	0.0170	12.5
Aldama	0.0280	2.0	0.0280	2.6	0.0280	1.8
Tuxpan	0.0360	3.4	0.0360	5.2	0.0360	14.1
Mora	0.0520	9.2	0.0520	8.4	0.0520	11.6
Susceptible	0.0168	1.0	0.0168	1.0	0.0168	1.0

IU=mmol/min/mg of protein. r= Pearson's correlation coefficients.

El ensayo para la detección de esterasas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) reveló una banda en las cepas resistentes “Mora”, “Tuxpan”, “Aldama” y “Tempoal”, que fueron capaces de hidrolizar ésteres de α -naftil acetato, produciendo un compuesto cromogénico insoluble color rojo en presencia del sustrato, lo cual demuestra las diferencias cualitativas en la actividad enzimática de las cepas resistentes con respecto de la cepa susceptible (Figura 1).

La actividad específica de esterasas expresada en UI y calculadas a partir de la hidrólisis del sustrato α -naftil acetato, fueron para la cepa “Susceptible” de 0.0168 UI; “Tempoal” 0.0170 UI; “Aldama” 0.0280 UI; “Tuxpan” 0.0360 UI y “Mora” 0.0520 UI (Cuadro 1).

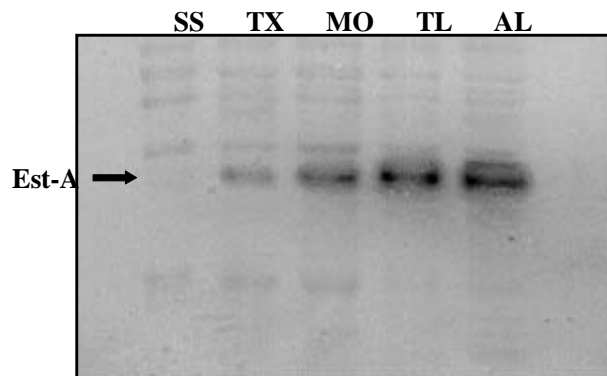
Los coeficientes de correlación de Pearson entre los índices de IR y la actividad específica de cada uno de los organofosforados fueron, para el clorfenvinfos $r=0.80$, seguida por el coumafos con $r=0.70$ y para el diazinon $r=0.47$ (Figura 2), de los cuales sólo se encontraron diferencias significativas para el caso del clorfenvinfos ($P<0.05$).

El fenómeno de la resistencia a insecticidas ha sido documentado ampliamente en mosquitos, áfidos y moscas. En estas especies se han asociado cambios en la actividad de carboxilesterasas con la resistencia a compuestos OF; en áfidos y mosquitos se ha probado que el mecanismo molecular de la resistencia, es la amplificación de genes que codifican para carboxilesterasas, lo que da como resultado un incremento en la actividad de carboxilesterasas^(16,17,18,19).

En el caso de la garrapata *B. microplus* se han encontrado diferentes proteínas con una cantidad relativa incrementada, así como, actividad de esterasas incrementada en una cepa de garrapata resistente a OF en relación a una cepa susceptible⁽¹⁰⁾, lo cual se confirma con la detección de una banda capaz de hidrolizar el sustrato α -naftil acetato como se muestra en la Figura 1, en las cepas de garrapatas resistentes a OF y PS utilizadas para este estudio, en las cuales se comprobó visualmente el incremento

Figura 1. Tinción para esterasas en geles de poliacrilamida (SDS PAGE) de cepas de *Boophilus microplus* que muestran diferencias cualitativas en la intensidad de la banda que hidroliza el α -naftil acetato (Est-A)

Figure 1. Staining for esterases in polyacrylamide gels (SDS PAGE) for *Boophilus microplus* strains showing qualitative differences in the intensity of the band that hydrolyzes α -naphthyl acetate (Est. A)



SS=cepa susceptible; TX=cepa Tuxpan; MO=cepa mora; TL=cepa Tempoal; AL=cepa Aldama

strain 0.0360 IU; and “Mora” strain 0.0520 IU (Table 1).

Pearson’s correlation coefficients between RI’s and the specific activity of each OP were as follows: chlorfenvinphos $r=0.80$; coumaphos, $r=0.70$; and diazinon $r=0.47$ (Figure 2), out of which only chlorfenvinphos showed significant differences ($P<0.05$).

Insecticide resistance has been extensively documented in mosquitoes, aphids, and flies. In aphid and mosquito species, changes in carboxyl esterases have been associated with resistance to OP, and it has been shown that the resistance molecular mechanism is the amplification of carboxyl esterase-coding genes, resulting in increased carboxyl esterase activity^(16,17,18,19).

In one OP resistant *B. microplus* strain, increased relative amounts of different proteins have been found, as compared to a susceptible strain⁽¹⁰⁾. This was confirmed with the detection of one band that

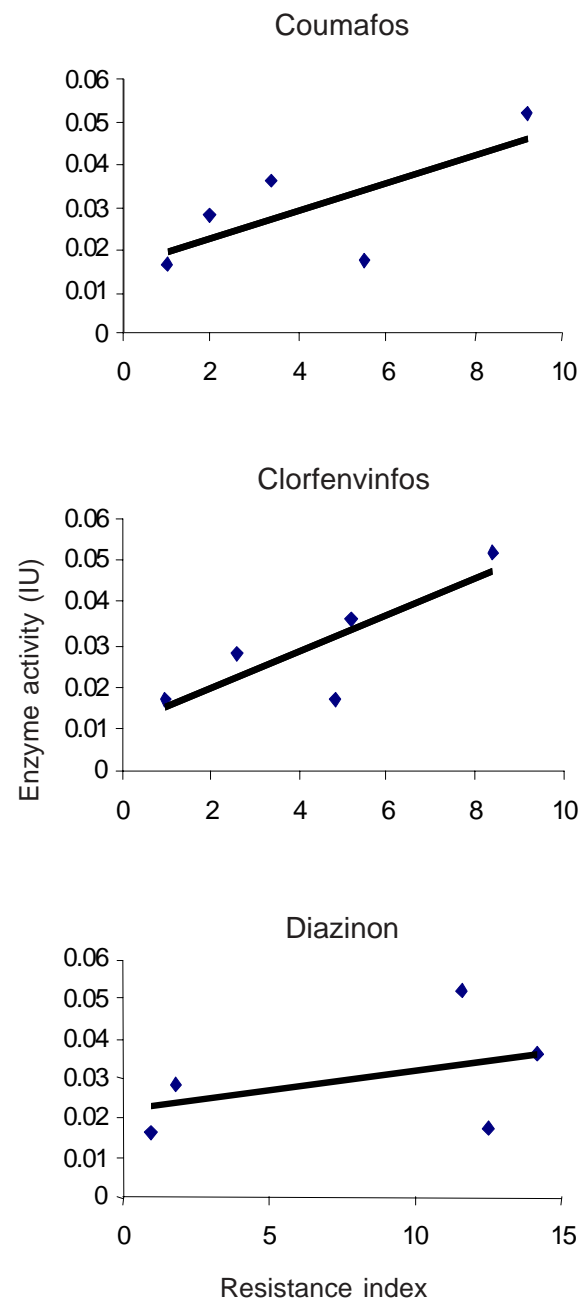
en la actividad; sin embargo se desconoce el grado de asociación entre la actividad específica de esterasas y los índices de resistencia obtenidos del perfil toxicológico mediante la prueba de PL hacia diferentes compuestos OF, tales como, coumafós, clorfenvinfos y diazinon. Los resultados obtenidos en este trabajo, demuestran una correlación significativa para el clorfenvinfos ($P < 0.05$) pero no para el coumafós ni para el diazinon y parecen apoyar las evidencias previamente reportadas sobre la participación de mecanismos oxidativos de detoxificación en cepas de *Boophilus microplus*, sugiriendo que las esterasas pudieran no tener un papel importante en el metabolismo tanto del coumafós como del diazinon, basados en los datos obtenidos en el análisis toxicológico de cepas mexicanas utilizando los sinergistas, piperonil butóxido, trifenilfosfato y dietilmaleato⁽²⁰⁾.

Dos tipos de resistencia a compuestos OF se han asociado con cambios en la actividad de ali-esterasas, la resistencia tipo-diazinon^(21,22), y la resistencia tipo-malathion^(21,22,23), en los cuales la capacidad de hidrólisis de ésteres alifáticos se encuentra reducida en ambos fenotipos de resistencia. Este fenómeno ha sido explicado por la hipótesis de la presencia de una ali-esterasa mutante^(24,25), la cual propone que una mutación estructural en una carboxilesterasa, disminuye la capacidad de hidrolizar a los sustratos de carboxilesterasas como el metil butirato y naftil acetato, ambos compuestos alifáticos, e incrementa la capacidad de hidrolizar compuestos OF, lo cual ha sido probado en tres dípteros, *Musca domestica*⁽²⁶⁾, *Lucilia cuprina*⁽²⁷⁾ y *Crysomya putoria*⁽²³⁾.

Esta hipótesis podría explicar parcialmente la baja correlación entre la actividad específica de esterasas y los índices de resistencia para el caso del diazinon en las cepas de *Boophilus microplus* analizadas en el presente trabajo, aunque evidencias toxicológicas utilizando dietilmaleato como sinergista, señalan la participación de mecanismos que involucran la participación de isoformas de la familia de la Glutacion-S-Transferasa, lo cual apoya la falta de correlación encontrada en este trabajo para el caso del diazinon⁽²⁰⁾.

Figura 2. Correlación entre los Índices de resistencia de las cepas de *Boophilus microplus* hacia los organofosforados coumafós, clorfenvinfos y diazinon, y la actividad enzimática

Figure 2. Correlation between the resistance index of different *Boophilus microplus* strains to the organophosphates coumafós (A), clorfenvinfos (B), and diazinon (C), and enzyme activity



La respuesta lineal de los índices de resistencia hacia clorfenvinfos y la actividad específica de esterasas medida mediante la hidrólisis de naftil acetato en estas cepas de referencia, demuestra que a mayor índice de resistencia hay un incremento proporcional en la actividad específica, lo que hace de este ensayo un buen indicador de resistencia por lo menos hacia este compuesto OF. Debido a que el ensayo fotocolorimétrico es práctico, sencillo, barato y podría fácilmente adaptarse a microplaca, con el fin de poder analizar muestras en forma masiva y sustituir la prueba de PL, aunque, es necesario realizar más experimentos con el fin de determinar si el mecanismo de resistencia a clorfenvinfos es por hidrólisis o por secuestro del ixodocida OF.

AGRADECIMIENTOS

Se Agradece al Dr. Hugo Fragoso y al Dr. Salvador Neri Orantes del Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal por las facilidades brindadas en la realización del presente trabajo. Este proyecto fue parcialmente financiado por el CONACyT y el USDA-ARS con los proyectos 3441P-B y FG-MX-109 (MX-ARS-10).

LITERATURA CITADA

1. Jongejan F, Uilenberg G. Ticks and control methods. Rev Sci Tech Off Int Epiz 1994;13:1201-1226.
2. Aguirre JA, Santamaria VM, Hernandez, MC, Ortiz, EM, Roman ES, Sobrino, AL. Purificación y caracterización toxicológica de garrapatas *Boophilus microplus* resistentes a ixodocidas organofosforados y organoclorados [resumen]. VII Reunión anual Asoc Mex de Parasitología Veterinaria, A.C. Cd. Victoria, Tamps. México. 1986:72.
3. Ortiz EM, Santamaria VM, Ortiz NA, Osorio MJ, Soberanes CN, Franco BR, Quezada DR, Fragoso SH. Hallazgos de resistencia en garrapatas *Boophilus microplus* hacia ixodocidas piretroides en la Republica Mexicana [resumen]. XIV Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias. Acapulco, Gro. México. 1994:181.
4. Ortiz EM, Santamaria VM, Ortiz NA, Soberanes CN, Osorio MJ, Franco BR, Martínez IF, Quezada DR, Fragoso SH. Caracterización de la resistencia de *B. microplus* a ixodocidas en México. III Seminario Internacional de Parasitología Animal. "Resistencia y control en garrapatas y moscas de importancia had the ability of hydrolyzing the α -naphthyl acetate substrate, as shown in Figure 1, in the OP/SP resistant tick strains used in this study, in which increased esterase activity was visually proven. Nevertheless, the degree of association between specific esterase activity and the resistance indexes obtained from the toxicological profile using the LP test to different OP (i.e. coumaphos, chlorfenvinphos, and diazinon) remains unknown.

Results obtained in this study showed a significant correlation for chlorfenvinphos ($P < 0.05$), but not for coumaphos or diazinon ($P > 0.05$). This data seems to support previously published evidence about the participation of detoxification oxidative mechanisms in *B. microplus* strains, suggesting that esterases might not play an important role in the metabolism of both coumaphos and diazinon, based on results from the toxicological analysis of Mexican strains using the synergistic compounds piperonyl-butoxide, triphenyl-phosphate, and diethyl-maleate⁽²⁰⁾.

Two types of OP resistance have been associated with alterations in ali-esterase activity, i.e.: the diazinon-type resistance^(21,22), and the malathion-type resistance^(21,22,23). Aliphatic ester hydrolysis ability has been found to be decreased in both resistant phenotypes. This phenomenon has been explained by hypothesizing the presence of a mutant ali-esterase^(24,25). This proposes that a structural mutation in one carboxyl-esterase decreases the ability of hydrolyzing both carboxyl-esterase substrates (i.e.: aliphatic compounds such as methyl-butyrate and naphthyl-acetate) and OP. This has been proven in three dipterous insects: *Musca domestica*⁽²⁶⁾, *Lucilia cuprina*⁽²⁷⁾, *Crysomya putoria*⁽²³⁾. This hypothesis could partially explain the low correlation between specific esterase activity and RI of diazinon on the *B. microplus* strains analyzed in this research. Even though, toxicological evidence using dimethyl-maleate as a synergistic compound showed the participation of mechanisms involving iso-forms of the glutathione S-transferase class, that supports a lack of correlation found in this study for the particular case of diazinon⁽²⁰⁾.

The linear response in the resistance indexes to chlorfenvinphos, and the specific esterase activity

- veterinaria". SAGAR-CANIFARMA-FAO-IICA-INIFAP. Acapulco, Gro. Méx. 1995:58-66.
5. Fragoso SH, Soberanes CN, Ortiz EM, Santamaría VM, Ortiz NA. Epidemiología de la resistencia a ixodícidas piretroides en garrapatas *Boophilus microplus* en la República Mexicana. III Seminario Internacional de Parasitología Animal "Resistencia y control en garrapatas y moscas de importancia veterinaria". Acapulco, Gro. Méx. 1995:45-57.
 6. Dary O, Georghiou GP, Parsons E, Pasteur N. Microplate adaptation of Gomori's assay for quantitative determination of general esterase activity in single insects. *J Econ Entomol* 1990;(83):2187-2192.
 7. Devonshire AL, Field LM. Gene amplification and insecticide resistance. *Annu Rev Entomol* 1991;36:1-23.
 8. De Jersey J, Nolan J, Davey PA, Kiddles PW. Separation and characterization of the pyrethroid- hydrolyzing esterases of the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Pestic Biochem Physiol* 1985;23:349-357.
 9. Zhou X, Scharf EM, Parimi S, Meinke JL, Wright JR, Chandler DL, Sigfried BD. Diagnostic assay based on esterase-mediated resistance mechanisms in western corn rootworms (Coleoptera: Chrysomelidae). *J Econ Entomol* 2002;956:1261-1266.
 10. Rosario CR, Miranda ME, Garcia VZ, Ortiz EM. Detection of esterase activity in susceptible and resistant *Boophilus microplus* tick strains. *Bull Entomol Res* 1997;87:197-202.
 11. Hemingway J, Small GJ. Resistance mechanisms in cockroaches—the key to control strategies. In: Proceedings, 1st international conference on insects pests in the urban environment. Wildley and Robinson editors. Cambridge, U.K; BCPP Wheatons; 1993:141-152.
 12. Stone BF, Haydock KP. A method for measuring the acaricide susceptibility of the cattle *B. microplus* (Can.). *Bull Entomol Res* 1962;53:563-578.
 13. LeOra Software. A user's guide to probit or logit analysis. LeOra Software, Berkeley, CA. 1987.
 14. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analyt Biochem* 1976;72:248-254.
 15. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:6180-685.
 16. Devonshire AL, Field LM. Gene amplification and insecticide resistance. *Annu Rev Entomol* 1991;36:1-23.
 17. Poiré M, Raymond M, Pasteur N. Identification of two distinct amplification of the esterase B locus in *Culex pipiens* (L.) mosquitoes from mediterranean countries. *Biochem Genet* 1991;30:13-26.
 18. Raymond M, Poulin, E, Boiroux V, Dupont E, Pasteur N. Stability of insecticide resistance due to amplification of esterase genes in *Culex pipiens*. *Heredity* 1993;70:301-307.
 19. Vaughan A, Heminway J. Mosquito carboxylesterase Est-alpha-2 (A2). *J Biol Chem* 1995;270:17044-17049.
 20. Li YA, Davey BR, Miller JR, George EJ. Resistance to Coumaphos and Diazinon in *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) and evidence for the involvement of an oxidative detoxification mechanism. *J Med Entomol* 2003;40;4:482-490.
 21. Bell JD, Busvine JR. Synergism of organophosphates in *Musca domestica* in *Chrysomia putoria*. *Entomol Exp Appl* 1967;10:263-269.

measured by naphthyl-acetate hydrolysis in these reference strains, shows that the higher the RI, the higher the proportional increase in the specific activity. Therefore, this assay is proposed as a resistance indicator at least for this particular OP. Given that the photocolometric assay is convenient, simple and inexpensive, it could be easily adapted to a microplate in order to analyze massive amounts of samples, thus replacing the LP test. Nevertheless, more studies should be performed in order to determine whether the resistance mechanism to chlorfenvinphos is due to hydrolysis or sequestration of this particular OP ixodicide.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to express our gratitude to Dr. Hugo Fragoso and Dr. Salvador Neri Orantes, from Mexico's National Services of Health, Quality and Food Safety, for their help in performing this study. This project was partially funded by CONACyT and the USDA-ARS's projects 3441P-B and FG-MX-109 (MX-ARS-10).

End of english version

22. Campbell PM, Yen JL, Masoumi A, Russell RJ, Batterham P, McKenzie JA, Oakeshott JG. Cross-resistance patterns among Australian sheep Blowfly, *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae), resistant to organophosphorus insecticides. *J Econ Entomol* 1998;91:367-375.
23. Townsend MG, Busvine JR. The mechanism of malation resistance in the blowfly *Chrysomia putoria*. *Entomol Exp Appl* 1969;12:243-267.
24. Oppenoorth FJ, Van asperen K. Allelic genes in the housefly producing modified enzymes that cause organophosphate resistance. *Science* 1960;132:298-299.
25. Bigley WS, Plapp FW Jr. Cholinesterase and ali-esterase in organophosphorous-susceptible and-resistant house flies. *Ann Entomol Soc Amer* 1960;53:360-364.
26. Van Asperen K, Oppenoorth FJ. Organophosphate resistance and esterase activity in houseflies. *Entomol Exp Appl* 1959;12:243-267.
27. Hughes PB, Raftos DA. Genetics of an esterase associated with resistance to organophosphorus insecticides in the sheep blow fly *Lucilia cuprina* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae). *Bull Entomol Res* 1985;84:39-44.