

Artículos de Revisión y Reflexión

Mecanismos moleculares y bioquímicos de resistencia a acaricidas en la garrapata común de los bovinos *Rhipicephalus microplus*

Molecular and biochemical mechanisms of acaricide resistance in common cattle tick *Rhipicephalus microplus*

Edgar Díaz Rivera, MSc.

Laboratorio de Parasitología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad del Tolima, Ibagué, Colombia

ediazr@ut.edu.co

Resumen

La garrapata común de los bovinos, *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*, considerada uno de los problemas parasitarios más importantes en áreas tropicales y subtropicales del mundo, desde hace algunas décadas ha venido desarrollando resistencia a los acaricidas que se emplean para su control, que se han vuelto ineficaces. La resistencia, que es de carácter genético, preadaptativo, originada en mutaciones del ADN, requiere el estudio de los genes relacionados con su manifestación y que en *R. microplus* generan, principalmente, dos tipos de respuesta fisiológica, como el aumento en la detoxificación enzimática y la insensibilidad en el sitio blanco. Esta revisión busca describir los mecanismos de acción de los acaricidas empleados comúnmente para controlar esta garrapata y las alteraciones genéticas y moleculares que interfieren en la acción de estos compuestos químicos, cuya identificación posibilitaría el ajuste de los planes de control a fin de reducir el grado de selección hacia los mecanismos de resistencia.

Palabras clave: ácaro, mutaciones, detoxificación enzimática, insensibilidad del sitio blanco.

Abstract

The common cattle tick, *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*, considered one of the most important parasitic problems in tropical and subtropical areas of the world, for the last few decades has developed resistance to acaricides used for control, rendering them ineffective. The resistance, which is genetic in nature, preadaptative and originated from DNA mutations, requires the study of the genes that are related with their manifestation in *R. microplus*, where it generates mainly two types of physiological response such as an, increased enzymatic detoxification and insensitivity at the target site. This review aims to describe the mechanisms of action of acaricides commonly employed to control this ticks and finally the genetic and molecular alterations that interfere with the action of these chemicals and whose identification allows to adjust control programs to reduce the degree of acaricide resistance.

Keywords: mite, mutations, increased enzymatic detoxification, insensitivity at the target site.

Introducción

La garrapata común del ganado, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Murrell y Barker, 2003) hace parte del grupo de artrópodos más frecuentemente extendidos en regiones ganaderas tropicales y subtropicales del mundo entero, donde las garrapatas son consideradas los más importantes parásitos externos de los bovinos (Baffi *et al.*, 2008). *Rhipicephalus microplus* es responsable de pérdidas económicas directas al alimentarse de sangre y causar anemia e irritación de la piel, así como de pérdidas indirectas al mantener y propagar agentes patógenos, como los protozoarios *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*, las rickettsias *Anaplasma marginale* y *Anaplasma centrale*, y diversas enfermedades virales, todas ellas causantes de mortalidad en bovinos (Avendaño y Correa, 2002; Baxter y Barker, 2002; Peter *et al.*, 2005; Walker, 2009; Francischetti *et al.*, 2010; Kaufman, 2010). Asimismo, un alto componente de las pérdidas económicas generadas por estas garrapatas está dado por las prácticas de control para reducir las altas infestaciones en los bovinos, basadas, principalmente, en la aplicación de compuestos químicos de alto costo económico (Porto *et al.*, 2011).

Además de las pérdidas asociadas a la presencia de *R. microplus* sobre los animales, la continua aplicación de pesticidas en un intento por controlar sus altas infestaciones ha resultado en el desarrollo de resistencia a los químicos en esta especie de garrapata (Benavides, 2008). Durante las últimas cuatro décadas, el desarrollo de productos garrapaticidas de gran eficacia y poder residual permitió al ganadero disponer de una herramienta de control práctica y adaptable a diferentes sistemas de producción. Estas características, sumadas a una disminución de la toxicidad hacia los humanos en los más modernos grupos químicos, crearon un falso sentido de seguridad en el productor pecuario, quien sustituyó el diagnóstico y el asesoramiento profesional por la casi exclusiva utilización de fármacos. Sin embargo, el desarrollo paulatino de la resistencia parasitaria en el ámbito mundial ha demostrado que los antiparasitarios son un recurso necesario, pero no renovable, en la medida que la resistencia sigue extendiéndose y persiste en las poblaciones parasitarias (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación [FAO], 2003; Nari, 2011).

El control de garrapatas en las últimas décadas ha dependido ampliamente del uso efectivo de químicos, como arsenicales, organoclorados, organofosforados, carbamatos, formamidas, piretroides, lactonas macrocíclicas y fenilpirazolonas (Peter *et al.*, 2005, Baffi *et al.*, 2008; Rodríguez-

Vivas *et al.*, 2010, Prullage *et al.*, 2011). La estrategia mundial más utilizada consiste en la aplicación de ixodicidas sobre el cuerpo de los animales infestados, con intervalos de tiempo determinados por la región ecológica, por las especies a combatir y por la eficacia residual del ixodicida (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2008). Bajo esta estrategia, el método más utilizado para aplicar los acaricidas es el de aspersión con bomba de espalda, práctica donde los productos químicos disponibles para realizarla son principalmente organofosforados, piretroides, amidinas y carbamatos (Benavides y Romero, 2001; Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología-Fondo Sectorial de Investigación en Materia Agrícola, Pecuaria, Acuicultura, Agrobiotecnología y Recursos Fitogenéticos [Conacyt-Sagarpa], 2005; Baffi *et al.*, 2007), los cuales tienen como efecto común en la garrapata alterar la transmisión del impulso nervioso en la unión sináptica mediante diferentes mecanismos de acción que afectan los neurotransmisores o los canales iónicos que intervienen en ella (Figura 1).

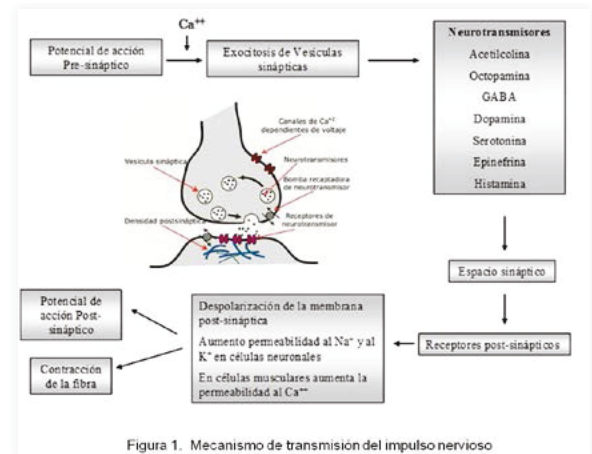


Figura 1. Mecanismo de transmisión del impulso nervioso

La resistencia química en ectoparásitos es un fenómeno actual y que aumenta día a día en América Latina y el Caribe, donde los compuestos químicos utilizados para controlar las diversas plagas básicamente son los mismos (Nari y Eddi, 2004). Aunque los acaricidas han desempeñado un papel importante en el control de *R. microplus* como consecuencia de su uso intensivo y en condiciones inapropiadas esta especie de garrapata ha desarrollado resistencia a la mayoría de ellos en varios países volviéndolos ineficaces (Rosado *et al.*, 2008; Alonso *et al.*, 2006).

En Colombia, aun cuando no se han realizado estudios nacionales para determinar la extensión de la situación de resistencia, se han ejecutado trabajos de carácter local o regional que permiten visualizar el problema, encontrando que está presente en diversas regiones e incluye los acaricidas más

utilizados (Díaz, 2012), como lo muestra la tabla 1. De igual forma, un estudio realizado en 1999 en los departamentos del Tolima, Huila y suroccidente de Cundinamarca, permitió conocer problemas de baja

efectividad de acaricidas en el 30% de los ganaderos de esta región, lo que obligaba a realizar baños garrapaticidas con una alta frecuencia (Díaz *et al.*, 2000).

Tabla1. Reportes de quimiorresistencia en *R. microplus* en Colombia

Autor	Compuesto	Organo-fosforados	Piretroides sintéticos	Formamidinas
López, 1976 Empresa privada		XXX		
López, 1986 Antioquia		XXX	XXX	
Benavides <i>et al.</i> , 1987 Villavicencio			XXX	
Rivera y Rodríguez, 1988 Villavicencio			XXX	
Gutiérrez y Pérez, 1988 Córdoba			XXX	XXX
Romero <i>et al.</i> , 1997 Huila		XXX	XXX	
Betancourt, 1993 Valle			XXX	
Barreto, 1990 Tolima		XXX		XXX
Benavides <i>et al.</i> , 2000 Colombia		XXX	XXX	XXX

Fuente: Díaz (2012)

Por todo lo mencionado, se hace necesario conocer los diferentes mecanismos fisiológicos de quimiorresistencia en *R. microplus*, que tienen su origen en cambios moleculares, genéticos y bioquímicos, para así poder diseñar estrategias de control eficaces (Chevillon, 2007b; Hunt, 2011).

Mecanismo de acción de los principales acaricidas

Compuestos organofosforados (OP). Grupo de compuestos que varían ampliamente en estructura y propiedades químicas. Se pueden mezclar con agua, pero son miscibles en solventes orgánicos. La mayoría de los OP existe como fosfatos, fosfonatos, fosforotioatos y fosforoditioatos. Su toxicidad aguda varía sustancialmente, pero muchos de ellos tienen toxicidad muy alta para mamíferos. El principal sitio blanco para los OP es la enzima acetilcolinesterasa, la cual es fosforilada por la acción del acaricida sobre el grupo hidroxilo de una serina en el sitio activo de la enzima. Este proceso inactiva la acetilcolinesterasa y bloquea la degradación del neurotransmisor acetilcolina, cuyas concentraciones sinápticas aumentan generando hiperexcitación del sistema nervioso central (SNC). En artrópodos, los efectos están confinados al SNC (sin cerebro y cadena nerviosa ganglionar ventral) donde se ubican prácticamente todas las sinapsis colinérgicas,

conduciendo a su parálisis o muerte (Cossio-Bayugar *et al.*, 2002; Bloomquist, 2003; Li *et al.*, 2003; Hawkes *et al.*, 2005; Liming *et al.*, 2006).

Carbamatos. Son compuestos ésteres del ácido carbámico, solubles en solventes orgánicos. Algunos carbamatos de naturaleza más alifática pueden ser mezclables en agua para actuar como insecticidas sistémicos efectivos. Los carbamatos a menudo son altamente tóxicos para los mamíferos. Actúan sobre el SNC con un modo de acción similar al de los OP, pero causando una reacción de carbamitación del grupo hidroxilo en una serina en la acetilcolinesterasa, que genera un grupo hidroxilado que migra, llevando a la inactivación de la enzima. Esto resulta en hiperexcitabilidad, parálisis y muerte en artrópodos (Bloomquist, 2003; Hawkes *et al.*, 2005; Liming *et al.*, 2006).

Piretroides sintéticos (PS). Son ésteres del ácido crisantémico que tienen un alto grado de lipofilia. Su blanco primario son los canales del sodio voltaje-dependientes, estructuras que comprenden cuatro dominios (I-IV) conformados por seis hélices transmembranales (S1-S6), donde los PS actúan impidiendo o demorando su cierre. Esto retrasa el mecanismo normal de inactivación del impulso nervioso, con lo que se incrementa la liberación de neurotransmisores en las terminales nerviosas tanto dentro del SNC como del periférico. La sinapsis neuromuscular de los artrópodos es un blanco

especialmente importante para estos químicos, y causan principalmente ataxia, convulsiones, descoordinación y, finalmente, la caída de la garrapata (He *et al.*, 1999; Bloomquist, 2003; Hemingway *et al.*, 2004; Peter *et al.*, 2005).

Formamidinas. El principal integrante de este grupo es el amitraz, que pasa por una conversión metabólica y se convierte en un metabolito activo llamado U-40481 o BTS-27271. Es ligeramente soluble en agua, pero muy soluble en solventes orgánicos. Su toxicidad para mamíferos es moderada. Estos compuestos imitan la acción de la octopamina, neurotransmisor que regula el comportamiento de excitación dentro del SNC, actuando también como una neurohormona sobre tejidos periféricos que inducen la movilidad de lípidos y carbohidratos y como un neuromodulador central y periférico que actúa sobre los músculos, la corpora cardíaca y la corpora allata en los artrópodos, mediando toda su actividad a través de tres clases de receptores acoplados a proteínas G vinculadas a la adenilato ciclasa. La sobreestimulación ejercida por el amitraz sobre estos receptores origina su efecto tóxico en el SNC, impidiendo la acción reguladora de la octopamina. Todo esto genera sobreestimulación de las sinapsis octopaminérgicas, dando lugar a temblores, convulsiones, anorexia, desprendimientos e interrupción de la reproducción. Es posible que las formamidinas también intervengan en la inhibición de monoaminooxidasas, que alteran el ciclo energético del artrópodo (Bloomquist, 2003; Chen *et al.*, 2007; Chevillon *et al.*, 2007b; Prullage *et al.*, 2011).

Lactonas macrocíclicas (LM). Hacen parte de este grupo de compuestos las avermectinas (como la ivermectina, doramectina, abamectina y eprinomectina) y las milbemicinas (como la moxidectina y milbemicina oxima), sustancias obtenidas de los hongos *Streptomyces avermitilis* y *Streptomyces cyaneogriseus*, respectivamente, con acción endectocida, es decir, con efecto tóxico sobre ecto- y endoparásitos. Son insolubles en agua, pero altamente liposolubles, por lo que se pueden absorber y distribuir en tejidos, como grasa, piel y mucosa intestinal. En parásitos susceptibles (nematodos y artrópodos) las LM se unen a un receptor de glutamato ligado a canales del cloro, con lo que se impide el cierre de los canales y se aumenta la permeabilidad de este ion, y desencadena la hiperpolarización de la membrana, cesando el estímulo nervioso y originando una parálisis flácida con el consiguiente desprendimiento y muerte del parásito (Bloomquist, 2003; Rodríguez-Vivas *et al.*, 2010).

Fenilpirazoles. Familia de pesticidas de amplio espectro, que tiene como sitio blanco los receptores

del ácido gama-amino butírico (GABA). Uno de sus integrantes más reconocidos es el fipronil, compuesto que posee alta toxicidad en artrópodos y que fue inicialmente empleado para control de plagas en cultivos, siendo usado posteriormente para controlar *R. microplus* y la mosca *Haematobia irritans* en bovinos, así como *R. sanguineus* en caninos, con buenos resultados. Su mecanismo de acción se basan en el bloqueo de los canales del cloro que son controlados por receptores del GABA, a los cuales el fipronil se une en las membranas celulares de las neuronas de los invertebrados impidiendo la acción inhibitoria del neurotransmisor y permitiendo que continúe la entrada de iones cloruro. Adicionalmente, el fipronil y sus metabolitos bloquean dos tipos de activadores glutamato de los canales del cloro que se encuentran solamente en invertebrados. El resultado de este mecanismo es la parálisis y posterior muerte del artrópodo (Castro-Janer *et al.*, 2010; Prullage *et al.*, 2011).

Mecanismos de resistencia a acaricidas en *Rhipicephalus microplus*

Resistencia se define como la habilidad de una población de parásitos para tolerar dosis de tóxicos que serían letales para la mayoría de individuos en una población normal (susceptible) de la misma especie, siendo un mecanismo defensivo del parásito a nivel molecular (Errecalde *et al.*, 2003; Conacyt-Sagarpa, 2005; Badii y Garza, 2007). Es una modificación genética que confiere a las poblaciones de artrópodos la capacidad de adaptarse a ambientes tóxicos, siendo una condición preadaptativa promovida naturalmente por la selección de genes asociados a hidrólisis de componentes alelopáticos o artificialmente por la aplicación de productos químicos (Rosario-Cruz *et al.*, 2009).

La resistencia a pesticidas es una característica hereditaria que implica cambios en el ADN, generada por mutaciones en genes del sitio blanco de los acaricidas, como son los genes de la acetilcolinesterasa en el caso de los organofosforados, del canal del sodio para los piretroides, de la octopamina para las formamidinas y del GABA para las avermectinas, o por mutaciones en los genes de enzimas multifuncionales tipo oxidasas, hidrolasas y transferasas, que dan lugar a manifestaciones metabólicas relacionadas con sus niveles de concentración o su actividad detoxificante (Heminway *et al.*, 2004; Peter *et al.*, 2005). Inicialmente, los genes de resistencia o mutantes son raros en la población, pero por selección continua aumentan su

proporción en la medida que aumenta la población de parásitos resistentes (Sangster, 2001).

Esta situación se origina en el uso frecuente de acaricidas con un mismo mecanismo de acción, lo cual lleva a que los individuos que no presentan el alelo resistente hacia ese fármaco sean eliminados mientras los que sí lo presentan sobreviven, permitiéndoles transmitir este genotipo a su descendencia, con lo cual, a través de generaciones posteriores, aumentan su frecuencia en la población. En la práctica, se sospecha la presencia de resistencia, cuando un producto que antes era útil para el control, ya no demuestra el mismo efecto, siempre y cuando se asegure que se trabaja con óptimas condiciones de aplicación (Benavides, 2001).

El desarrollo de resistencia en artrópodos depende, entre muchos otros factores, del ciclo de vida de estos organismos, del número de descendientes por generación, de las poblaciones refugio existentes en campo (individuos que no han sido puestos en contacto con plaguicidas), así como del volumen,

frecuencia y condiciones de aplicación de los compuestos (Sangster, 2001). La garrapata de un hospedador *R. microplus* tiene un ciclo corto de vida y produce muchos descendientes, pudiendo manifestar rápidamente resistencia, lo cual es particularmente común en este artrópodo (Peter *et al.*, 2005). Esta situación, unida al uso intensivo de acaricidas y a las condiciones inadecuadas de preparación y aplicación, da lugar a que sus poblaciones desarrollen mecanismos que permiten la supervivencia de algunos individuos expuestos al tratamiento, mientras los susceptibles son eliminados (Baffi *et al.*, 2008).

Los mecanismos que frecuentemente se observan como respuesta al uso continuo de plaguicidas se enmarcan en respuestas, como la alteración del comportamiento para evitar el contacto, alteraciones morfológicas que disminuyen la penetración del químico o alteraciones fisiológicas y bioquímicas que aumentan la degradación metabólica del producto o reducen su efecto sobre el sitio blanco (Badii y Garza, 2007), como se observa en la tabla 2.

Tabla 2. Tipos de resistencia en respuesta a la acción de plaguicidas

Tipos de resistencia	Mecanismo	Blancos afectados
Resistencia metabólica	Aumento en la detoxificación enzimática	Esterasas, oxidasas de función mixta, glutathion S-transferasas
	Insensibilidad del sitio blanco	Esterasas, canales del sodio, receptores de octopamina, receptores del GABA
Resistencia no metabólica	De comportamiento	Modificación de conducta para prevenir el contacto
	De penetración	Modificación en la concentración lipídica de la cutícula

Fuente: Díaz (2012)

La resistencia a la penetración es una modificación del exoesqueleto para inhibir o retardar la penetración del químico, y tiene que ver con la concentración de lípidos que facilitan o retardan la penetración del pesticida a través de esta estructura (Alonso-Díaz *et al.*, 2006). El metabolismo incrementado se caracteriza por la detoxificación enzimática del garrapaticida que es degradado a consecuencia de la acción de enzimas que participan en los procesos de detoxificación, como son las oxidasas de función mixta, hidrolasas (esterasas, carboxylesterasas) y glutathion S-transferasas (Conacyt-Sagarpa, 2005; Shahein *et al.*, 2008). La sensibilidad reducida se basa en la modificación que hace el ácaro del sitio blanco del ixodocida a fin de contrarrestar la toxicidad del principio activo del producto (He *et al.*, 1999). En *R. microplus*, las alteraciones en el metabolismo de degradación del principio activo y los cambios en la

estructura del sitio blanco parecen ser las respuestas principales (Jamroz *et al.*, 2000; Conacyt-Sagarpa, 2005; Chevillon *et al.*, 2007b; Rosario-Cruz *et al.*, 2009).

Según diversas investigaciones, estas respuestas están soportadas en alteraciones de tipo genético y molecular, como amplificación génica, mutaciones puntuales en los genes que codifican algunas enzimas detoxificantes (esterasas, glutathion S-transferasas y oxidasas de función mixta), modificación del sitio diana de los pesticidas y procesos de selección que ocurren dentro de secuencias de genes también asociados con la resistencia a compuestos xenobióticos (Cossio-Bayugar *et al.*, 2002; Wheelock *et al.*, citados por Baffi *et al.*, 2008; Shahein *et al.*, 2008; Rosario-Cruz *et al.*, 2009), respuestas que serán analizadas con detalle más adelante en este mismo documento para diferentes acaricidas.

La introducción de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha estimulado el desarrollo de nuevas herramientas epidemiológicas y de diagnóstico, con lo cual la biología molecular está siendo usada para entender los mecanismos y el mapa de los genes responsables de resistencia. A la par con esta situación, las grandes compañías farmacéuticas han iniciado la búsqueda de nuevas clases de drogas, teniendo en cuenta mecanismos basados en la identificación de procesos bioquímicos que típicamente dependen de genes que se expresan en receptores particulares o enzimas, aun cuando el desarrollo de estos nuevos fármacos requiere de un tiempo considerable (Jabbar *et al.*, 2005).

Muchas de las investigaciones mundiales se han enfocado en el desarrollo de estrategias de control de *Rhipicephalus microplus*, identificación de cambios moleculares implicados en la resistencia acaricida y análisis de factores de riesgo agrícolas involucrados en la evolución de la resistencia (He *et al.*, 1999; Hernández *et al.*, 2000; Jamroz *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2005; Chevillon *et al.*, 2007a). De esta manera, se trabaja en el desarrollo de técnicas para el diagnóstico de la frecuencia de genes de resistencia usando marcadores de ADN que permiten una detección rápida y específica de su presencia en garrapatas (Jamroz *et al.*, 2000; Rosario-Cruz *et al.*, 2000; Baxter y Barker, 2002; Baffi *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2007), como se aprecia en la tabla 3.

Tabla 3. Estudios moleculares del fenómeno de quimiorresistencia en *R. microplus*

Compuesto	Estudio	Autores
Organofosforados Carbamatos	Identification of point mutations in putative carboxylesterase and association with acaricide resistance in <i>Rhipicephalus (B.) microplus</i> .	Baffi <i>et al.</i> , 2007 (Brasil)
	R86Q, a mutation in BmAChE3 yielding a <i>Rhipicephalus microplus</i> organophosphate insensitive acetylcholinesterase.	Temeyer <i>et al.</i> 2007 (Estados Unidos)
	Analysis of the sequence and expression of a second putative acetylcholinesterase cDNA from organophosphate-susceptible and organophosphate-resistant cattle ticks.	Baxter and Barker, 2002 (Australia)
	Identification of a point mutation in an esterase gene in different populations of the southern cattle tick <i>Boophilus microplus</i> .	Hernández <i>et al.</i> , 2000 (México)
Piretroides	A survey of <i>Rhipicephalus microplus</i> populations for mutations associates with pyrethroid resistance.	Chen <i>et al.</i> , 2009 (Estados Unidos)
	Identification of a point mutation in the para-type sodium channel gene of the cattle tick <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> associated with resistance to synthetic pyrethroid acaricides.	Morgan <i>et al.</i> , 2009 (Australia)
	Gene structure and expression of a pyrethroid-metabolizing esterase, CzEst9, from a pyrethroid resistant Mexican population of <i>Rhipicephalus (B.) microplus</i> .	Guerrero & Nene 2008 (Estados Unidos)
	Identification of a point mutation in the para-type sodium channel gene from a pyrethroid resistant cattle tick.	He <i>et al.</i> , 1999 (Estados Unidos)
Amidinas	Mutations in a putative octopamine receptor gene in amitraz resistant cattle ticks.	Chen <i>et al.</i> , 2007 (Estados Unidos)

Fuente: Diaz, 2012

Resistencia a organofosforados (OP) y carbamatos

Dentro de los acaricidas de mayor uso se encuentran los ésteres de ácidos fosfóricos o carbámicos, lo que los convierte en objetivo de las esterases, grupo de enzimas altamente variable y multifuncional

que bien pueden actuar como blancos alternativos o que, a través de procesos de catálisis, hidrolizan específicamente estos plaguicidas, protegiendo a la acetilcolinesterasa de su efecto (Cossio-Bayugar *et al.*, 2002; Baffi *et al.*, 2008; Zhou y Zia, 2009; Rosario-Cruz *et al.*, 2009). Algunos estudios han mostrado como las esterases, especialmente

acetilcolinesterasas (AChE) y carboxilesterasas (CaE), están relacionadas con resistencia, ya sea a través de aumento en el metabolismo de detoxificación ya sea mediante insensibilización del sitio blanco (Li *et al.*, 2005; Rosario-Cruz *et al.*, 2009). La insensibilidad de la AChE y la detoxificación metabólica por CaE no específicas han sido consideradas como el principal mecanismo de resistencia a OP en la garrapata *R. microplus* (Rosario-Cruz *et al.*, 1997; Jamroz *et al.*, 2000; Villarino *et al.*, 2002; Pruet y Pound, 2006).

Alteraciones moleculares en el gen de la AChE originan en la enzima menor sensibilidad a los inhibidores, presentando un amplio espectro de insensibilidad entre especies y entre compuestos dentro de las especies (Hawkes *et al.*, 2005; Liming *et al.*, 2006; Zhou y Xia, 2009). En *R. microplus* se ha demostrado la presencia de AChE insensible en poblaciones de campo resistentes a OP (Liming *et al.*, 2006), entre ellas algunas cepas de México y de Australia (Pruett y Pound, 2006).

Varios estudios han encontrado que en esta garrapata el gen codificante de AChE puede sufrir amplificación génica, dando origen a tres genes: *AChE1*, *AChE2* y *AChE3* en cepas resistentes, donde la enzima AChE1 es afectada por el acaricida OP, mientras las otras dos enzimas, AChE1 y AChE2, no se afectan manteniendo la viabilidad del individuo portador de los genes alternativos (Jamroz *et al.*, 2000; Baxter y Barker, 2002; Temeyer *et al.*, 2007).

Por otra parte, diversas investigaciones han mostrado relación entre resistencia a OP y aumento de la actividad de CaE en cepas australianas, texanas, mexicanas y brasileras de *R. microplus*, a través de su efecto en la hidrólisis y secuestro de estos compuestos químicos mediado por mutaciones puntuales que dan lugar a una alta frecuencia de homocigotos mutantes resistentes a OP por el aumento en la detoxificación metabólica de estos acaricidas (Hernández *et al.*, 2000; Rosario-Cruz *et al.*, 2000; Baxter y Barker, 2002; Villarino *et al.*, 2003; Oakeshott *et al.*, 2005; Soberanes *et al.*, 2005; Liming *et al.*, 2006; Baffi *et al.*, 2007; Baffi *et al.*, 2008; Rosario-Cruz *et al.*, 2009; Díaz, 2012).

En artrópodos, la resistencia se ha asociado con presencia de mutaciones puntuales que alteran la hidrólisis del pesticida, que incrementan la eficiencia catalítica de la enzima (Hemingway *et al.*, 2004; Liming *et al.*, 2006; Baffi *et al.*, 2007; Zhou y Xia, 2009). En *R. microplus* se identificó una mutación puntual en un fragmento de DNA de 372 pb de una CaE en poblaciones mexicanas resistentes, donde se sustituyó una Guanina (G) por una Adenina (A) (Hernández *et al.*, 2000), mientras en una población brasileras resistente se encontró la misma mutación,

una sustitución de G por A, traduciendo en la secuencia de aminoácidos una sustitución de lisina por arginina (Baffi *et al.*, 2007).

En Colombia, una investigación realizada con cepas de campo colectadas en el municipio de Ibagué encontró la carboxilesterasa en mención, y que fue denominada Est9 (Guerrero y Nene, 2008), e identificó la misma mutación en garrapatas resistentes a OP mediante procedimientos de polimorfismos de fragmentos de restricción (RFLP) (Díaz, 2012).

Resistencia a piretroides

Dado el serio problema que representa la resistencia a los piretroides, se han realizado extensos estudios para descifrar los mecanismos que desencadenan esta situación. El sitio blanco de este grupo de acaricidas es el canal del sodio dependiente del voltaje, en cuyo gen se han descubierto hasta el momento 10 mutaciones en diversos artrópodos, básicamente sustituciones de un solo nucleótido (SNP) que son responsables de la resistencia hacia este tipo de compuestos, por lo que en *R. microplus* los trabajos se han focalizado en la búsqueda de estos SNP (Jamroz *et al.*, 2000; Rodríguez-Vivas *et al.*, 2011).

He *et al.* (1999) y Rosario-Cruz *et al.* (2005) encontraron en México cepas de garrapatas altamente resistentes a acaricidas piretroides que presentaban una mutación puntual, T por A en el dominio IIS6 del gen del canal de sodio, de localización diferente a la reportada en el mismo gen en insectos resistentes y que reduce la sensibilidad del canal del sodio a los piretroides. En Australia, Morgan *et al.* (2009) identificaron una mutación, C por A, en el dominio IIS4-5 de este gen en individuos *R. microplus* resistentes a un piretroide, cipermetrina, similar a una mutación reportada en mosca blanca, *Bemisia tabaci*, pero que no se había reportado previamente en garrapatas. Posteriormente, Jonsson *et al.*, (2010) identificaron otra mutación, G por T, en el mismo sector del gen del canal del sodio en otra cepa de *R. microplus* que presentó moderada resistencia solamente a flumetrina, observando que el nivel de resistencia aumentaba ampliamente al presentarse las dos mutaciones en el mismo individuo.

Los hallazgos refuerzan la tesis de que la insensibilidad en el sitio blanco es uno de los principales mecanismos de resistencia hacia piretroides en la garrapata común de los bovinos; sin embargo, la detoxificación metabólica por incremento en la actividad de esterases también interviene en el desarrollo de resistencia hacia este

tipo de acaricidas (Morgan, 2009). En México, Brasil y Colombia, varios investigadores han encontrado mutaciones en una esterasa en poblaciones de garrapatas moderadamente resistentes a piretroides, que interviene en la manifestación del fenómeno pero con una magnitud de la resistencia menor a la producida por mutaciones en el sitio blanco, es decir, en el gen del canal del sodio (Rosario-Cruz *et al.*, 2005; Baffi *et al.*, 2007; Díaz, 2012). Esto lleva a que, en la evaluación de resistencia, se encuentren con el mecanismo de detoxificación aumentada por esterasas niveles de resistencia que van desde seis hasta 160 veces la DL50 para una población susceptible, mientras que, a través del mecanismo de insensibilidad en el canal del sodio, estos niveles pueden llegar a superar 1.000 veces la DL50.

Resistencia a formamidinas

La resistencia a compuestos de este grupo, como el amitraz, normalmente se ha presentado luego de manifestarse el fenómeno hacia los organofosforados y piretroides. El modo de acción del amitraz no está completamente aclarado, y se han propuesto varios sitios blanco, uno en el receptor del neurotransmisor octopamina, donde interfiere con la transmisión del impulso nervioso en el SNC de los artrópodos, otro en la monoaminoxidasas, en la que ejerce algún efecto inhibitorio (Chevillone *et al.*, 2007). En la búsqueda de alteraciones moleculares relacionadas con resistencia al amitraz en Australia, se aisló el cADN de un receptor putativo de octopamina en *R. microplus*, pero al comparar la secuencia de nucleótidos de garrapatas susceptibles y resistentes al acaricida no se encontró diferencia alguna entre ellos, por lo que se cree que en este país la resistencia no está dada por una mutación en el sitio blanco del acaricida (Baxter y Barker, 1999).

Posteriores trabajos con cepas de garrapatas de México y Brasil muy resistentes al amitraz obtuvieron secuencias de nucleótidos casi idénticas a las reportadas en Australia, pero con dos sustituciones, A por C y T por C, que las diferenciaron de individuos susceptibles y que posiblemente traducen aminoácidos que alteran el receptor de octopamina (Chen *et al.*, 2007), mostrando que, en poblaciones de *R. microplus* del continente americano, el mecanismo de insensibilidad en el sitio blanco sí podría ser responsable del fenómeno.

Buscando dilucidar el mecanismo de resistencia hacia el amitraz, otros estudios han encontrado que este mecanismo puede ser poligénico y recesivo, con lo cual la resistencia no se mantiene en poblaciones en las cuales la presión de selección no es permanente. Asimismo, se han propuesto otros sitios blanco,

como los receptores alfa-adrenoceptores presentes en abejas o los alfa2-adrenoceptores en mamíferos, pero nada de esto se ha comprobado plenamente (Jonsson y Hope, 2007). También, al hacer estudios con sinérgicos, como el piperonil butóxido, se ha encontrado que el aumento en la detoxificación, a través de oxidasas de función mixta, puede contribuir a la resistencia al amitraz en algunas poblaciones de *R. microplus* (Li *et al.*, 2004).

Consideraciones finales

Debido al amplio uso de compuestos químicos para controlar las altas poblaciones de *R. microplus*, esta garrapata ha desarrollado resistencia hacia ellos, principalmente a través de dos tipos de respuesta fisiológica, aumento en la detoxificación por efecto de enzimas no específicas o insensibilidad en el sitio blanco, respuestas que están mediadas por alteraciones moleculares en los genes relacionados, pero que, como se observa a lo largo del presente documento, normalmente no son controladas por un solo gen, sino por diferentes genes que intervienen en la manifestación del fenómeno que normalmente involucra varios de los acaricidas disponibles en el mercado.

Esto indica que no es suficiente identificar un gen determinado y sus posibles polimorfismos que se relacionen con un tipo de resistencia específica, ya que muy posiblemente en la respuesta del ácaro están interviniendo varios mecanismos bioquímicos y moleculares que potencializan el efecto. Por ello, es necesario seguir investigando para conocer a fondo los genes incluidos, así como sus alteraciones moleculares relacionadas con resistencia a acaricidas, lo cual permitirá determinar marcadores moleculares que ayuden a establecer las frecuencias genotípicas y alélicas de la resistencia en una población de campo, y que combinado con pruebas biológicas tradicionales para la detección de resistencia, ofrezca información sobre la efectividad de los planes de control racional de garrapatas y de los programas de manejo de resistencia, y contribuir a un mejor monitoreo y ajuste oportuno de las estrategias a fin de reducir el nivel de selección hacia el mecanismo de resistencia encontrado.

Referencias

- Alonso-Díaz, M.A., Rodríguez-Vivas, R.I., Fragosó-Sánchez, H., Rosario-Cruz, R., 2006. Ixodicide resistance of the *Boophilus microplus* tick to ixodocides. *Archivos Medicina Veterinaria* 38, 105-113.
- Avendaño, L., Correa, A., 2002. Tick infestations. *Parasites*, external. Elsevier Science pp. 2210-2215.

- Badii, M., Garza, V., 2007. Resistencia en insectos, plantas y microorganismos. CULCYT/Impacto Ecológico 4, 9-25.
- Baffi, M., Rocha, G., Ueira, C., Soares, C., Ricardo, L., Bonetti, A.M., 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.
- Baffi, M., Rocha, G., Soares, C., Ceron, C., Bonetti, A., 2008. Esterase enzymes involved in pyrethroid and organophosphate resistance in a Brazilian population of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acar, Ixodidae). *Molecular Biochemistry Parasitology* 160, 70-73.
- Baxter, G.D., Barker, S.C., 1999. Isolation of a cDNA for an octopamine-like, G-protein coupled receptor from the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Insect Biochemistry Molecular Biology* 29, 461-467.
- Baxter, G., Barker, S., 2002. Analysis of the sequence and expression of a second putative acetylcholinesterase cDNA from organophosphate-susceptible and organophosphate-resistant cattle ticks. *Insect Biochemistry Molecular Biology* 32, 815-820.
- Benavides, E., Romero, A., 2001. Consideraciones para el control integral de parásitos externos del ganado. Carta FEDEGAN 70, 64-86.
- Benavides, E., 2001. Control de las pérdidas ocasionadas por los parásitos del ganado. Carta FEDEGAN 69, 52-63.
- Benavides, E., 2008. Evaluación crítica de las estrategias de extensión de alternativas para el control de garrapatas en animales domésticos en América Latina. VI Seminario Internacional de Parasitología Animal, Boca del Río Veracruz, 3 a 5 de septiembre del 2008. pp. 6.
- Bloomquist, J., 2003. Insecticidas: químicas y características. Radcliffe: Texto Mundial de MIP. Universidad de Minnesota. <http://ipmworld.umn.edu> (consultado el 21 de agosto de 2010).
- Castro-Janer, E., Martins, J., Mendes, M., Namindome, A., Klafke, G., Schummaker, T., 2010. Diagnoses of fipronil resistance in Brazilian cattle ticks (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) using *in vitro* larval bioassays. *Veterinary Parasitology* 173, 300-306.
- Cossio-Bayugar, R., Barhoumi, R., Burghardt, R., Gale, G., Holman, P., 2002. Basal cellular alterations of esterase, glutathione, glutathione s-transferase, intracellular calcium, and membrane potentials in coumaphos-resistant *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) Cell Lines. *Pesticide Biochemistry Physiology* 72, 1-9.
- Conacyt-Sagarpa, 2005. Resistencia de la garrapata *Boophilus microplus* a los ixodicidas en el sureste de México. Folleto técnico No. 1. Mérida, México. pp. 12.
- Chen, A.C., He, H., Davey, R.B., 2007. Mutations in a putative octopamine receptor gene in amitraz-resistant cattle ticks. *Veterinary Parasitology* 148, 379-383.
- Chevillon, C.H., Basile, B., Barré, N., Durand, P., Arnathau, C., Meêus, T., 2007a. Direct and indirect inferences on parasite mating and gene transmission patterns Pangamy in the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Infection Genetics Evolution* 7, 298-304.
- Chevillon, C.H., Ducornez, S., Meêus, T., Koffi, B., Gaia, H., Delathière, J., Barré, N., 2007b. Accumulation of acaricide resistance mechanisms in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) populations from New Caledonia Island. *Veterinary Parasitology* 147, 276-288.
- Díaz, E., Benavides, E., Parra, M.H., Arcos, J.C., Riveros, E., Jaramillo, F., Londoño, J.E., 2000. Investigación epidemiológica de las principales limitantes parasitarias en explotaciones ganaderas del Tolima, Huila y suroccidente de Cundinamarca. Informe final proyecto PRONATTA-CORPOICA.
- Díaz, E., 2012. Estudio molecular del gen de una carboxilesterasa relacionada con quimiorresistencia en la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias, Universidad del Tolima.
- Errecalde, C., Prieto, G., Lüders, C., García, H., 2003. Naturaleza y control de la quimiorresistencia en ectoparásitos. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 16, 3.
- FAO, 2003. Resistencia a los antiparasitarios: estado actual con énfasis en América Latina. Estudio FAO, Producción y Sanidad Animal 157. pp. 55.
- Francischetti, I., Sa-Nunes, A., Mans, B., Santos, I., Ribeiro, J., 2010. The role of saliva in tick feeding. *Frontiers Bioscience* 14, 2051-2088.
- Guerrero, F.D., Nene, V.M. 2008. Gene structure and expression of a pyrethroid-metabolizing esterase, CzEst9, from a pyrethroid resistant Mexican population of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Journal Medical Entomology* 45, 677-685.
- Hawkes, N., Janes, R., Hemingway, J., Vontas, J., 2005. Detection of resistance-associated point mutations of organophosphate-insensitive acetylcholinesterase in the olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Gmelin). *Pesticide Biochemistry Physiology* 81, 154-163.
- He, H., Chen, A.C., Davey, R.B., Ivie, G.W., George J.E., 1999. Identification of a point mutation in the *para*-type sodium channel gene from a pyrethroid-resistant cattle tick. *Biochemical Biophysical Research Communications* 261, 558-561.
- Hernández, R., He, H., Chen, A., Waghela, S., Wayne, G., George, J., Wagner, G., 2000. Identification of a point mutation in an esterase gene in different populations of the southern cattle tick, *Boophilus microplus*. *Insect Biochemistry Molecular Biology* 30, 969-977.
- Hemingway, J., Hawkes, N., McCarroll, L., Ranson, H., 2004. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochemistry Molecular Biology* 34, 653-665.
- Hunt, P., 2011. Molecular diagnosis of infections and resistance in veterinary and human parasites. *Veterinary Parasitology* 180, 12-46.
- Jabbar, A., Iqbal, Z., Muhammad, G., Nisar, M., Zahid, R., Sandhu Z., Lateef, M., 2005. The interplay of molecular biology and veterinary parasitology: A need of the time. *International Journal Agriculture Biology* 7, 845-852.
- Jamroz, R., Guerrero, F., Pruetz, J., Oehler, D., Miller, R., 2000. Molecular and biochemical survey of acaricide resistance mechanisms in larvae from Mexican strains of the southern cattle tick, *Boophilus microplus*. *Journal Insect Physiology* 46, 685-695.
- Jonsson, N., Hope, M., 2007. Progress in the epidemiology and diagnosis of amitraz resistance in the cattle tick *Boophilus microplus*. *Veterinary Parasitology* 146, 193-198.
- Jonsson, N., Cutullè, C., Corley, S., Seddon, J., 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 Parasitology* 40, 1659-1664.
- Kaufman, W., 2010. Ticks: Physiological aspects with implications for pathogen transmission. *Ticks Tick Borne Diseases* 1, 11-22.
- Li, A., Davey R., Miller, R., George, J., 2003. Resistance to coumaphos and diazinon in *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) and evidence for the involvement of an oxidative detoxification mechanism. *Journal Medical Entomology* 40(4), 482-490.
- Li, A., Davey, R., Miller, R., George, J., 2004. Detection and characterization of amitraz resistance in the southern cattle tick, *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Journal Medical Entomology* 41, 193-200.
- Li, A., Pruetz, J., Davey, R., George, J., 2005. Toxicological and biochemical characterization of coumaphos resistance in the San Roman strain of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Pesticide Biochemistry Physiology* 81, 145-153.

- Liming, T., Mingan, S., Jiangzhong, Y., Peijun, Z., Chuanxi, Z., Zhenhua, T., 2006. Resistance pattern and point mutations of insensitive acetylcholinesterase in a carbamate-resistant strain of housefly (*Musca domestica*). *Pesticide Biochemistry Physiology* 86, 1-6.
- Morgan, J.A., Corley, S.W., Jackson, L.A., Lew-Tabor, A.E., Moolhuijzen, P.M., Jonsson, N.N., 2009. Identification of a mutation in the para-sodium channel gene of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* associated with resistance to synthetic pyrethroid acaricidas. *International Journal Parasitology* 39, 775-779.
- Murrell, A., Barker, S., 2003. Synonymy of *Boophilus* Curtice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). *Systematic Parasitology* 56, 169-172.
- Nari, A., Eddi, C., 2004. Panorama de la resistencia medicamentosa en el control de las enfermedades ectoparasitarias en las Américas. Cuarta conferencia electrónica REDECTOPAR. [http://www.corpoica.org.co/SitioWeb/redectopar/ Conferencias.asp](http://www.corpoica.org.co/SitioWeb/redectopar/Conferencias.asp) (consultado el 30 de noviembre de 2010).
- Nari, A., 2011. Towards sustainable parasite control practices in livestock production with emphasis in Latin America. *Veterinary Parasitology* 180, 2-11.
- Oakeshott, J., Claudianos, C., Campbell, P., Ollis, D., Newcomb, R., Russell, R., 2005. Biochemical genetics and genomics of insect esterases. *Comprehensive Molecular Insect Science* chapter 5.10, pp. 309-381.
- Peter, R.J., Van den Bossche, P., Penzhorn, B.L., Sharp, B., 2005. Tick, fly and mosquito control —lessons from the past, solutions for the future. *Veterinary Parasitology* 132, 205-215.
- Porto, L.R., Jonsson, N.N., D'Occhio, M.J., Barendse, W., 2011. Molecular genetic approaches for identifying the basis of variation in resistance to tick infestation in cattle. *Veterinary Parasitology* 180, 165-172.
- Pruett, J.H., Pound, J.M., 2006. Biochemical diagnosis of organophosphate-insensitivity with neural acetylcholinesterase extracted by sonication from the adult tick synganglion. *Veterinary Parasitology* 135, 355-363.
- Prullage, J., Tran, H., Timmons, P., Harriman, J., Chester, T., Powell, K., 2011. The combined mode of action of fipronil and amitraz on the motility of *Rhipicephalus sanguineus*. *Veterinary Parasitology* 179, 302-310.
- Rodríguez-Vivas, R., Rosado, J., Rosario, R., García, Z., Alonso, M., 2008. Situación actual de la resistencia a los ixodídeos de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en el sureste de México: diagnóstico, epidemiología y control. VI Seminario Internacional de Parasitología Animal, Boca del Río Veracruz. pp. 20.
- Rodríguez-Vivas, R., Arieta-Román, R., Pérez-Cogollo, L., Rosado-Aguilar, J., Ramírez-Cruz, G., Basto-Estrella, G., 2010. Uso de lactonas macrocíclicas para el control de la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en el ganado bovino. *Archivos Medicina Veterinaria* 42, 115-123.
- Rodríguez-Vivas, R., Trees, A., Rosado, J., Villegas, S., Hodgkinson, J., 2011. Evolution of acaricide resistance: Phenotypic and genotypic changes in field populations of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in response to pyrethroid selection pressure. *International Journal Parasitology* 1, 895-903.
- Rosado, J., Rodríguez, R., García, Z., Fragoso, H., Ortiz, A., Rosario, R., 2008. Development of amitraz resistance in field populations of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) undergoing typical amitraz exposure in the Mexican tropics. *Veterinary Parasitology* 152, 349-353.
- Rosario-Cruz, R., Miranda-Miranda, E., García-Vázquez, Z., Ortiz-Estrada, M., 1997. Detection of esterase activity in susceptible and organophosphate resistant strains of the cattle tick *Boophilus microplus*. *Bulletin Entomology Research* 87, 197.
- Rosario-Cruz, R., García-Vázquez, Z., Edward, J. G., 2000. Detección inmunológica de esterases en dos cepas de la garrapata *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) resistentes a ixodídeos. *Técnica Pecuaria México* 38, 203-210.
- Rosario-Cruz, R., Guerrero, F., Miller, R., Rodríguez, R., Domínguez, D., Cornel, A., Hernández R., George, J., 2005. Roles Played by Esterase Activity and by a Sodium Channel Mutation Involved in Pyrethroid Resistance in Populations of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) Collected from Yucatán, Mexico. *Journal Medical Entomology* 42, 1020-1025.
- Rosario-Cruz, R., Almazan, C., Miller, R., Domínguez, D., Hernández, R., de la Fuente, J., 2009. Genetic basis and impact of tick acaricide resistance. *Frontiers Bioscience* 14, 2657-2665.
- Sangster, N.C., 2001. Managing parasiticide resistance. *Veterinary Parasitology* 98, 89-109.
- Shahein, Y.E., El-Hakim, A.E., Kamal, A.M., Reda, R., Abdul-Moez, S., Mahmoud, N., 2008. Molecular cloning, expression and characterization of a functional GST mu class from the cattle tick *Boophilus annulatus*. *Veterinary Parasitology* 152, 116-126.
- Soberanes, N., Rosario, R., Santamaría, M., García, Z., 2005. Variabilidad en la actividad general de esterases de la garrapata *Boophilus microplus* y su relación con la resistencia a organofosforados. *Técnica Pecuaria México* 43(2), 239-246.
- Temeyer, K., Pruet, J., Untalan, P., Chen, A., 2007. R86Q, a Mutation in *BmAChE3* yielding a *Rhipicephalus microplus* organophosphate-insensitive acetylcholinesterase. *Journal Medical Entomology* 44, 1013-1018.
- Villarino, M., Wagner, G., George, J., 2002. In vitro detection of acaricide resistance in *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Experimental Applied Acarology* 28, 265-271.
- Villarino, M., Waghela, S., Wagner, G., 2003. Biochemical detection of esterases in the adult female integument of organophosphate-resistant *Boophilus microplus* (Acari Ixodidae). *Journal Medical Entomology* 40, 52-57.
- Walker, A., 2009. Review of "Ticks: Biology, Disease and Control". *Parasitology Vectors* 2, 1.
- Zhou, X., Xia, Y., 2009. Cloning of an acetylcholinesterase gene in *Locusta migratoria manilensis* related to organophosphate insecticide resistance. *Pesticide Biochemistry Physiology* 93, 77-84.