

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN
CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS,
INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES
FORESTALES, AGRÍCOLAS Y PECUARIAS

Título de la tesis

**“Caracterización transcriptómica de mecanismos de resistencia múltiple a
acaricidas en *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*”**

TESIS PROFESIONAL PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRIA EN CIENCIAS

PRESENTA:

Eduardo Ferrara Tijera

DIRECTOR:

Dr. Hugo Gildardo Castelán Sánchez

CODIRECTORA:

Dra. Raquel Cossío Bayugar

CUERNAVACA, MORELOS

MAYO, 2026



1. AGRADECIMIENTOS

A mis asesores, a la Dra. Raquel y el Dr. Hugo, por su invaluable guía, paciencia y por compartir su conocimiento para llevar este proyecto a término.

A el personal de salud que me ayudo a superar los contratiempos médicos experimentados durante la realización de este proyecto, así como el tratamiento recibido por parte del sector salud.

A las herramientas tecnológicas y plataformas como Sci-Hub, que democratizan el conocimiento y permitieron el acceso a la información necesaria para esta investigación.

Al personal del Cenepa, quienes mantuvieron el material biológico ocupado para este proyecto y pusieron su grano de arena para la creación de este proyecto de investigación.

2. DEDICATORIAS

A mi red de apoyo conformada por:

Andrea, Guadalupe y Aldo por tener rato aguantándome, queriéndome y apoyándome, a Erica, Daniel, Atzin, Carlos e Ian quienes me han apoyado en las malas además de regalarme su compañía, a Pedrin, Marquillo, Dory y Brandon por siempre ser una luz en mi camino y animarme cuando se ha necesitado.

Gracias por estar pendiente, y ser parte de mi vida, por motivarme a seguir adelante y por el cariño y los buenos momentos.

A mi abuela Licha, por creer siempre en mí.

A mi madre y mi abuela, por ser los cimientos de mi vida.

A mis hermano Ruben, por tratar de comprenderme y acompañarme cuando lo necesité.

A mi hermana Melissa por todo su apoyo.

A mi gato (Tito), que siempre me brindo compañía.

3. CONTENIDO

3.1 TABLA DE CONTENIDO

1. Agradecimientos	2
2. Dedicatorias	3
3. Contenido	4
3.1 Tabla de contenido	4
3.2 Tabla de Figuras	8
4. Abstract	11
5. Resumen	12
6. Marco teórico	13
6.1 Garrapatas	13
6.2 Rhipicephalus (Boophilus) microplus	15
6.3 Sector ganadero en México	16
6.4 Control de las garrapatas	17
6.4.1 Amidinas	19
6.4.2 Carbamatos	19
6.4.3 Fipronil	20
6.4.4 Organofosforados	20
6.4.5 Piretroides	20
6.5 Resistencia a acaricidas	21
6.6 Mecanismos de resistencia	21
6.6.1 Resistencia relacionada con patrones de comportamiento	22
6.6.2 Resistencia relacionada con el sistema digestivo	22
6.6.3 Resistencia toxicodinámica	22
6.6.4 Resistencia cinética (detoxificación metabólica)	23
6.6.4.1 Monooxigenasas (citocromo P450 (CYP), <i>FMOS Y MOS</i>)	23
6.6.4.2 Citocromo P450 (<i>CYP</i>)	23
6.6.4.3 Monooxidasas dependientes de flavinas (<i>FMOS y MAOs</i>)	24
6.6.4.4 Enzimas Superóxido dismutasa	26
6.6.4.5 Glutación S-Transferasa (<i>GST</i>) y Glutación Peroxidasa (<i>GPx</i>)	26
6.6.4.6 Glutación peroxidasas (<i>GPx</i>)	26
6.6.4.7 Catalasas	27
6.6.4.8 Esterasas y acetilcolinesterasa	27
6.6.4.9 Acetilcolinesterasa (<i>AChE</i>)	28
6.6.4.10 Deshidrogenasas de cadena corta	28

6.6.4.11 Transportadores: Casete de unión A ATP (ABC) y Superfamilia de facilitadores mayores (MFS)	29
6.6.5 Penetración reducida.....	29
6.7 Medición de la resistencia a acaricidas en garrapatas.....	29
6.7.1 Paquete de larvas	29
6.7.2 Zimogramas	30
6.7.3 Ensayos bioquímicos	31
6.7.4 PCR en tiempo real cuantitativo (qRT-PCR)	31
6.8 Secuenciación masiva y transcriptoma	32
6.8.1 Relación de mecanismos de resistencia en genética molecular con mecanismos de resistencia bioquímicos - físicos.....	32
6.8.2 Mutaciones.....	34
6.8.3 Regulación Génica.....	34
6.8.3.1 Regulación <i>cis</i> y <i>trans</i>	34
6.8.3.2 Duplicación Génica.....	34
6.8.3.3 Amplificación génica	34
6.8.3.4 Empalme alternativo (<i>alternative splicing</i>)	35
7. Antecedentes	36
7.1 Resistencia a <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> a los acaricidas en México	36
7.2 Resistencia toxicodinámica.....	37
7.2.1 Sitio de acción y Resistencia a Amidinas	37
7.2.2 Resistencia a Carbamatos y Organofosforados	38
7.2.3 Resistencia a Fipronil	41
7.2.4 Resistencia a piretroides	42
7.3 Resistencia toxicocinética.....	43
7.3.1 Resistencia ligada a la absorción	43
7.3.2 Metabolismo de xenobióticos.....	44
7.3.2.1 Citocromo p450 (<i>CYP</i>)	44
7.3.2.2 Deshidrogenasas de cadena corta.....	45
7.3.2.3 Esterasas.....	46
7.3.2.4 Lipasas	46
7.3.2.5 Carboxilesterasas	46
7.3.2.6 Colinesterasas	46
7.3.2.7 Galactosiltransferasa	46
7.3.2.8 Aldehído deshidrogenasas.....	47

7.3.2.9 Sulfotransferasas	47
7.3.3 Excreción de xenobióticos.....	47
7.3.3.1 Resistencia mediada por transportadores ABC.....	47
7.3.3.2 Resistencia mediada por superfamilia de facilitadores mayores	48
7.3.4 Respuesta al estrés oxidativo.....	48
7.3.4.1 Super óxido dismutasa	49
7.3.4.2 Catalasa	49
7.3.4.3 Sistema tiorredoxina	49
7.4 Factores de Transcripción	49
8. Justificación	51
9. Hipótesis	51
10. Objetivos Generales	52
11. Objetivos particulares	52
12. metodología.....	53
12.1 Cepas de referencia (Mantenimiento y cría de garrapatas).....	53
12.2 Pruebas de bioensayo LPT y AIT	53
12.3 Purificación de ARN.....	55
12.4 Evaluación de la integridad del ARN	56
12.5 Limpieza de lecturas	59
12.6 Reconstrucción de los transcritos para el análisis diferencial.....	59
12.7 Evaluación de métricas de ensamblado y alineamiento.....	59
12.8 Comparación de métricas y selección del mejor ensamblador	60
12.9 Cuantificación y análisis de expresión diferencial.....	60
12.10 Anotación funcional y fusión de datos.....	60
12.11 Análisis dirigido de mecanismos de resistencia	61
12.12 Ensamblado de genes blanco (moléculas diana).....	61
12.13 Análisis de variantes y alineamientos múltiples	61
12.14 Filogenia de acetilcolinesterasas	61
13. Resultados	62
13.1 Extracción de ARN	62
13.2 Ajuste de carga de ARN total y preparación de alícuotas	63
13.3 Análisis de la integridad del ARN	64
13.4 Recepción y organización de archivos de secuenciación	66
13.5 Evaluación de calidad y limpieza de secuencias crudas	66
13.6 Reconstrucción de los transcritos.....	72
13.7 Evaluación de mapeos contra el genoma de referencia.	75

13.8 Cuantificación de transcritos.....	79
13.9 Anotación Funcional.....	80
13.10 Ensamblados Dirigidos para Moléculas Diana de Acaricidas	82
13.10.1 Búsqueda de mutaciones asociadas a resistencia en genes blanco de acaricidas	84
13.11 Análisis de componentes principales PCA y mapas de calor	87
13.12 Resultados de la expresión diferencial de la comparación entre Rancho Nuevo vs Zacatecas (Cepa susceptible).....	89
13.13 Resultado de la expresión diferencial de la comparación entre las cepas Vargas vs Zacatecas (cepa susceptible).....	96
13.14 Árbol filogenético para clasificación de Acetilcolinesterasas	103
13.15 Análisis de perfil de resistencia y mecanismos involucrados en la resistencia múltiple a acaricidas.....	105
14. Discusión.....	118
14.1 Extracción y secuenciación.....	118
14.2 Reconstrucción de los transcritos.....	118
14.3 Expresión diferencial	118
14.4 Resistencia Toxicodinámica (Interacción con el sitio de acción).....	119
14.4.1 Acetilcolinesterasas – resistencia a organofosforados y carbamatos	120
14.4.2 Receptor GABA – resistencia a fipronil.....	121
14.4.3 Receptores de octopamina/tiramina y receptores β -adrenérgicos – (amidinas) y Canales de sodio dependientes de voltaje (Piretroides).....	121
14.5 Resistencia Toxicocinética.....	122
14.5.1 Absorción.....	122
14.5.2 Sensor de xenobióticos	123
14.5.3 Metabolismo de xenobióticos o resistencia metabólica.	123
14.5.3.1 Modificación funcional Fase I.....	124
14.5.3.2 Fase II (Conjugación)	126
14.5.3.3 Fase III (excreción).....	126
14.5.4 Estrés oxidativo.	127
15. Conclusiones.....	128
16. Literatura.....	129
17. Anexos	154
17.1 Bases de datos.	154
17.2 Alineamientos múltiples con las referencias.....	158
17.2.1 AchE1	158
17.2.2 AchE2	164
17.2.3 Receptor β -adrenérgico de octopamina	172

3.2 TABLA DE FIGURAS

Figura 1.-Aproximación de la distribución global de las especies: <i>R. annulatus</i> , <i>R. (B.) microplus</i> y <i>R. australis</i> , <i>Rhipicephalus (Boophilus)</i> . <i>R. (B.) microplus</i> es la especie de mayor distribución, presente en América, África y Asia. <i>R. annulatus</i> se encuentra en América, África y Europa. En cambio <i>R. australis</i> está restringido a Oceanía (Burger <i>et al.</i> , 2014)	14
Figura 2.-Diferencias morfológicas clave entre las garrapatas <i>R. (B.) microplus</i> y <i>R. (B.) australis</i> de acuerdo con (Estrada-Peña <i>et al.</i> , 2012), donde observamos la vista ventral y la vista dorsal así como las diferencias morfológicas entre hembras y machos,	14
Figura 3.-Mapa de Distribución de <i>R. (B.) microplus</i> en México, este mapa muestra la situación actual de la campaña nacional mexicana para el control <i>R. (B.) microplus</i> donde en verde podemos observar la zona libre, en amarillo la zona de erradicación, en amarillo/anaranjado en control, y en verde la zona de control reconocida por el gobierno como zona libre natural de la garrapata. (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, 2025).....	16
Figura 4.- a) Electroforesis en SDS-PAGE de proteínas obtenidas de diferentes estadios de garrapatas (huevo, larva y adulto) teñidas con azul de Coomassie, b) Zimogramas con actividad GST, obtenidos de proteínas de las muestras antes mencionadas (SDS-PAGE).(Miranda-Miranda, <i>et al</i> 2023).....	30
Figura 5.-Diagrama de flujo de los pasos para obtener los perfiles de transcripción a partir del material genético, (gráfico creado con Biorender).	55
Figura 6.-Fotografía del material biológico obtenido en colaboración con el laboratorio de referencia regional de la FAO para la resistencia a Acaricidas.	55
Figura 7.-Fotografía de una de las muestras de larvas viables de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> emergiendo de la ovoposición por instinto hacia lo alto de los frascos de contención.	56
Figura 8.-Fotografía de la electroforesis capilar de los ARN total utilizando el kit de Agilent RNA 6000 Nano Reagents utilizando el equipo Bioanalyzer 2000	57
Figura 9.-Diagrama de flujo de los pasos elegidos para evaluar el mejor ensamble para el organismo.....	58
Figura 10.- Cálculo del valor del RIN obtenido con el sistema Bioanalyzer (Agilent Technologies), para verificar la calidad e integridad del ARN total extraído.	64
Figura 11.-Electroferogramas y simulación digital de Gel de electroforesis obtenido con el sistema Bioanalyzer (Agilent Technologies), para verificar la calidad del ARN total extraído.	65
Figura 12.-Gráfico de barras que muestra el número de lecturas con y sin adaptador por réplicas biológicas y cepa.....	69
Figura 13.-Gráfico de anillo doble que muestra los porcentajes de la distribución de las lecturas de acuerdo con la cepa y a la réplica biológica obtenida.	70
Figura 14.-Gráfica de barras apiladas que muestra el porcentaje de las lecturas que pasaron el filtro de calidad y las lecturas conservadas.....	71
Figura 15.- En la izquierda tenemos el gráfico de pastel que representa la cantidad de bases conservadas y desechadas antes y después de realizar el filtro de calidad, mientras que a la derecha se tiene el gráfico de pastel de las lecturas y bases conservadas y desechadas después de aplicar el filtro de calidad con <code>trim_galore!</code> , gráfico realizado con el software <code>ggplot</code> y el lenguaje R.....	72
Figura 16.- Mapa de calor generado a partir de las métricas normalizadas para su comparación, del lado derecho se observa la sumatoria de las métricas normalizadas como la calificación normalizada.....	75

Figura 17.- Mapa de calor de las métricas de mapeo normalizada, a la derecha se observa una tabla con los valores de la calificación normalizada de dichos parámetros por cada software. .	78
Figura 18.- Gráfico comparativo de los resultados de los porcentajes de Asignación de las cuentas transcriptómicas para los softwares STAR/FeatureCounts y Trinity/Salmon.	80
Figura 19.-Gráfico de barras con porcentajes de los transcritos que pudieron ser anotados con el software Trinotate.	82
Figura 20.- Gráficos de componentes principales, el de la izquierda muestra la varianza entre los componentes principales PC1 y PC2 mientras que el gráfico de la derecha es el gráfico de dispersión de PCA con log ₂ FC	88
Figura 21.—Mapa de calor con agrupamiento jerárquico de las cepas con sus respectivas réplicas biológicas. La gama cromática que transita del rojo al azul indica la magnitud de cambio en términos de puntuación estándar (Z-score), reflejando la desviación de los 1000 transcritos con mayor varianza inter-muestral. El dendrograma superior ilustra la relación de similitud entre muestras.	88
Figura 22.- Análisis de expresión diferencial entre la cepa Rancho Nuevo y la cepa susceptible Zacatecas de <i>R. (B.) microplus</i> . A la izquierda se presenta el gráfico MA, que muestra en el eje x la media de los recuentos normalizados y en el eje y los valores de log ₂ fold change (log ₂ FC). Cada punto representa un transcrito; los que se alejan del eje horizontal corresponden a transcritos con mayor o menor expresión. A la derecha se presenta el volcano plot, que representa en el eje x los valores de log ₂ FC y en el eje y el valor transformado de $-\log_{10}(\text{p-valor})$. Los transcritos más significativos estadísticamente se encuentran en la parte superior del gráfico. Ambas gráficas fueron generadas en R utilizando la paquetería ggplot2.....	89
Figura 23.-Gráfico del top 35 de los genes expresados diferencialmente, donde en el eje de las x, se tienen los valores de log ₂ FC mientras que en el eje de las y se tiene el nombre del transcrito, dentro de la barra se encuentra la anotación del transcrito, diagrama realizado con R y la paquetería de ggplot.	90
Figura 24.-Análisis de expresión diferencial entre la cepa Vargas y la cepa susceptible Zacatecas de <i>R. (B.) microplus</i> . A la izquierda se muestra el gráfico MA, donde cada punto representa un transcrito; el eje X indica la media de los recuentos normalizados y el eje Y el cambio de expresión (log ₂ FC). Este gráfico permite visualizar cómo varía la expresión génica en función de su abundancia. A la derecha, el diagrama de volcán muestra el log ₂ FC en el eje X y el valor de significancia estadística transformado ($-\log_{10} \text{p-valor}$) en el eje Y. Los puntos rojos corresponden a transcritos sobreexpresados de forma significativa, mientras que los azules indican transcritos reprimidos. Este análisis evidencia un patrón claro de genes diferencialmente expresados entre la cepa Vargas (potencialmente resistente) y la cepa susceptible Zacatecas.	97
Figura 25.-Se muestran 35 transcritos con una gran magnitud de cambio en la (log ₂ fc) expresión, donde las barras verdes representan transcritos sobre expresados en la cepa vargas y las barras azuladas son transcritos represores. tanto a la izquierda como a la derecha.....	98
Figura 26.- Árbol filogénico, realizado con el objetivo de clasificar los transcritos anotados como Acetilcolinesterasas junto con las secuencias de referencia del NCBI. Los transcritos obtenidos, se agrupan en diferentes clados.....	104
Figura 27.-Gráfico de calor que describe la expresión diferencial de moléculas relacionadas con la resistencia toxicodinámica y las mutaciones que se encontraron en las proteínas de AchE1 y AchE, gráfico realizado con lenguaje R y paquetería ggplot.....	113
Figura 28.-Gráfico de mapa de calor que hace la comparativa entre ambas cepas multirresistentes a acaricidas (Rancho Nuevo y Vargas) y su expresión diferencial de enzimas involucradas en la desintoxicación metabólica, donde se encuentran las Aldehído deshidrogenasas, deshidrogenasas de cadena corta, monoxigenasas dependientes de flavina y monoxigenasas <i>CYP450</i> , gráfico creado con lenguaje R y paquetería ggplot.	114

Figura 29.-Gráfico de mapa de calor que hace la comparativa entre ambas cepas multirresistentes a acaricidas (Rancho Nuevo y Vargas) y su expresión diferencial de enzimas involucradas en la desintoxicación metabólica, donde se encuentran las Sulfotransferasas, Galactosiltransferasas y Esterasas, gráfico creado con lenguaje R y paquetería ggplot.....	115
Figura 30.- Gráfico de calor que hace la comparativa entre ambas cepas multirresistentes a acaricidas (Rancho Nuevo y Vargas) y su expresión diferencial de enzimas involucradas en las proteínas relacionadas con la cutícula, transportadores ABC y la superfamilia de los facilitadores mayores, gráfico creado con lenguaje R y paquetería ggplot.	116
Figura 31.-Gráfico de calor que hace la comparativa entre ambas cepas multirresistentes a acaricidas (Rancho Nuevo y Vargas) y su expresión diferencial de enzimas involucradas en la respuesta a especies reactivas de oxígeno ROS, donde se encuentra la catalasa, sistema tiorredoxina peroxirredoxina, superóxido dismutasa y del sensor nuclear de hidrocarburos de anillo translocador, gráfico creado con lenguaje R y paquetería ggplot.....	117

4. ABSTRACT

The cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* represents a serious threat to livestock production due to the significant economic losses it causes through both direct damage and pathogen transmission. In this study, total RNA was extracted from three *R. (B.) microplus* strains: two strains with confirmed multiple resistance to five acaricide families; Carbamates, Organophosphates, Pyrethroids, Amidines and fipronil (Rancho Nuevo and Vargas), and one susceptible strain (Zacatecas). Each strain was processed with three biological replicates for transcriptomic analysis using high-throughput sequencing. A total of 139,645,928 reads were generated, yielding 10.41 Gb of sequencing data with an average Phred quality score of 34.55. After quality filtering, 138,217,916 high-quality reads were retained, with only 1.02% of reads discarded. *De novo* assembly using Trinity-BG combined with reference mapping via STAR was identified as the most effective approach, achieving 92.6% mapping efficiency and a remarkable 61.4% improvement in mapping accuracy using STAR. Differential expression analysis performed with DESeq2 revealed 13,310 isoforms in the field-resistant group compared to the control, 14,175 in the laboratory-resistant group versus control, and 10,963 between the field- and laboratory-resistant groups. Annotation with Trinotate linked 39.79% of the differentially expressed transcripts to known functions. 268-331 transcripts were associated with resistance mechanisms from RN and Vargas strains. Additionally the assembly of 31 sequences of the target molecules from 3 of 5 resistant acaricides were compared against 39 SNPS associated with this phenomenon. This study identified toxicodynamic acaricide resistance mechanisms, where the overexpression of target molecules as gamma-aminobutyric acid (GABA) receptors and acetylcholinesterases (*AchEs*) and the detection of SNPs may imply target -site insensitivity. Toxicokinetic mechanisms were found, Reduced penetration, through the expression of cuticle proteins and endochitinases; metabolic resistance phase 1 (Functional modification): through the complex differential expression of *CYP450* and Flavin-dependent monooxygenases (*FMOS* and *MAOS*), Short-chain dehydrogenases (*SDR*), aldehyde dehydrogenases (*ALDH*), and carboxylesterases (*CES*); metabolic resistance phase 2 (Conjugation): Glutathione S-transferases, Sulfotransferases, and Galactosyltransferases; metabolic resistance phase 3 (Excretion): *ABC* cassette and Major Facilitator Superfamily (*MFS*); Oxidative stress response: Catalase, Superoxide Dismutase (*SOD*), and Thioredoxin-peroxiredoxin system (*Trx/Prx*); and the transcription factor and chemosensor: Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator. These findings indicate that the resistant strains employ combined and complex mechanisms of metabolic detoxification, neurophysiological protection, and complex regulation to mitigate the effects of acaricides, which provides a solid molecular basis for the development of diagnostic tools and integrated control strategies against multiple acaricide resistance in *R. (B.) microplus*.

5. RESUMEN

La garrapata del ganado *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* representa una seria amenaza para la producción pecuaria, debido a las importantes pérdidas económicas que ocasiona tanto por daño directo como por transmisión de patógenos. En este estudio, se extrajo ARN total de tres cepas de *R. (B.) microplus*: dos cepas con resistencia múltiple a cinco familias de acaricidas; carbamatos, organofosforados, piretroides, amidinas y fipronil (Rancho Nuevo y Vargas), y una cepa susceptible (Zacatecas). Cada cepa fue procesada con tres réplicas biológicas para llevar a cabo el análisis transcriptómico mediante secuenciación masiva. Un total de 139,645,928 lecturas, fueron generadas con una producción de 10.41 Gb de datos y una calidad promedio Phred de 34.55. Tras el filtrado por calidad, se conservaron 138,217,916 lecturas útiles, descartándose únicamente el 1.02 % de las lecturas. El ensamblado *de novo* utilizando Trinity-BG, combinado con el mapeo de referencia mediante STAR, fue identificado como el enfoque más eficaz, alcanzando una eficiencia de mapeo del 92.6% y una mejora notable del 61.4% en la precisión del mapeo con STAR. El análisis de expresión diferencial realizado con DESeq2 reveló 13,310 isoformas la cepa Rancho Nuevo comparado con el control, 14,175 isoformas en la cepa Vargas frente al control, La anotación con Trinotate permitió asociar el 39.79% de los transcritos diferencialmente expresados con funciones conocidas, de estas formas conocidas se lograron identificar 268 y 331 transcritos asociados a mecanismos de resistencia para las cepas RN y Vargas. De manera adicional, se logró el ensamblado de 31 secuencias de las moléculas diana de 3 de los 5 grupos de acaricidas que son resistentes, y se evaluaron 39 SNPS asociados con la resistencia a acaricidas en la literatura. Este estudio logró identificar mecanismos de resistencia a acaricidas de resistencia toxicodinámica, donde se encontró la sobreexpresión de moléculas diana como los receptores de ácido gamma-aminobutírico(GABA) acetilcolinesterasas y mutaciones con probable participación en insensibilidad del sitio de acción, y los mecanismos de resistencia toxicocinética encontrados fueron: Penetración reducida, mediante la expresión de proteínas de cutícula y endoquitinasas, resistencia metabólica fase 1 (Modificación funcional): mediante la expresión diferencial compleja de monoxigenasas del *CYP450* y dependientes de Flavinas (*FMOS* y *MAOS*), Deshidrogenasas de cadena corta (*SDR*), aldehído deshidrogenasas (*ALDH*) y carboxilesterasas (CES), resistencia metabólica fase 2 (Conjugación): Glutatió S transferasa, Sulfatotransferasas y Galactosiltransferasas resistencia metabólica fase 3 (Excreción): Cassete *ABC* y Superfamilia de facilitadores mayores (*MFS*), Respuesta de estrés oxidativo: Catalasa, Superóxido Dismutasa (*SOD*) y sistema Tiorredoxina peroxirredoxina (Trx/Prx), y el factor de transcripción y quimio sensor: Receptor nuclear de hidrocarburos de arilo translocador. Estos hallazgos indican que las cepas resistentes emplean mecanismos combinados y complejos de desintoxicación metabólica, protección neurofisiológica y regulación compleja para mitigar los efectos de los acaricidas, lo cual proporciona una base molecular sólida para el desarrollo de herramientas diagnósticas y estrategias integradas de control frente a la resistencia múltiple a acaricidas en *R. (B.) microplus*.

6. MARCO TEÓRICO

6.1 GARRAPATAS

Las garrapatas de mayor importancia médica y pecuaria pertenecen al filo Arthropoda, clase Arachnida, subclase Acari, orden Ixodida y familia Ixodidae. Se reconocen dos familias principales de garrapatas: Argasidae (garrapatas blandas) que incluye 5 géneros y aproximadamente 200 especies; Ixodidae (garrapatas duras), con 14 géneros y cerca de 700 especies. Existe además una tercera familia, Nuttalliellidae, representada únicamente por una especie y un género (Manzano-Román *et al.*, 2012; Paessler *et al.*, 2017).

Estos artrópodos son hematófagos obligado y, por lo tanto, al alimentarse, pueden afectar al hospedero tanto de forma directa como indirecta, generando toxicidad, reacciones alérgicas, abscesos, anemia, inmunosupresión y daño tisular en el sitio de la mordida (Mans *et al.*, 2004; Paessler *et al.*, 2017). Además, son vectores de una amplia gama de patógenos, que incluyen virus, bacterias, protozoarios y helmintos (Jongejan & Uilenberg, 2004; Mans *et al.*, 2004; Paessler *et al.*, 2017; Sahara *et al.*, 2019).

La clasificación taxonómica del subgénero *Rhipicephalus* (*Boophilus*) basada en la morfología ha sido complicada debido a la sutil diferenciación morfológica de las especies *microplus*, *annulatus* y *australis*. Por esta razón, este grupo es reconocido como un complejo de especies crípticas cuya resolución requiere de herramientas moleculares avanzadas. (Amrutha *et al.*, 2023; Roy *et al.*, 2018)

El complejo *Rhipicephalus* (*Boophilus*) compuesto por las especies *annulatus*, *australis* y *microplus*, siendo parásitos hematófagos del ganado, este complejo representa la principal plaga veterinaria a nivel global, responsable de pérdidas económicas multimillonarias en la industria agropecuaria. Dentro de este complejo, *R. (B.) microplus* y *R. annulatus* destacan por su amplia distribución geográfica y su elevado impacto sanitario y productivo (Amrutha *et al.*, 2023; Burger *et al.*, 2014). Como se muestra en la Figura 1, la distribución de *R. annulatus*, *R. australis* y *R. (B.) microplus*, está siendo modificada por factores como el comercio internacional de ganado vivo (Burger *et al.*, 2014) y los efectos del cambio climático (Estrada-Peña & Salman, 2013; Ngoc *et al.*, 2025; Ogden & Lindsay, 2016).

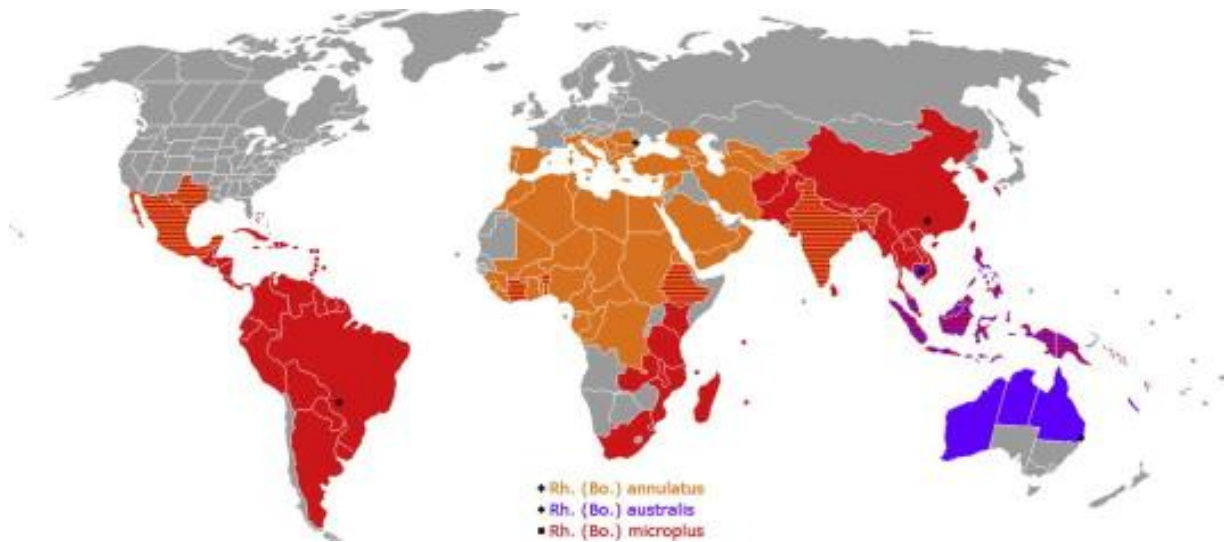


Figura 1.-Aproximación de la distribución global de las especies: *R. annulatus*, *R. (B.) microplus* y *R. australis*, *Rhipicephalus (Boophilus)*. *R. (B.) microplus* es la especie de mayor distribución, presente en América, África y Asia. *R. annulatus* se encuentra en América, África y Europa. En cambio *R. australis* está restringido a Oceanía (Burger et al., 2014).

Las especies del complejo *Rhipicephalus (Boophilus)* fueron originalmente clasificadas dentro del género *Boophilus* debido a características morfológicas distintivas, principalmente relacionadas con la forma del capitulum y la ausencia de festones como se muestra en la Figura 2. No obstante, estudios filogenéticos posteriores basados en análisis morfológicos y moleculares demostraron que *Rhipicephalus* constituía un grupo parafilético respecto a *Boophilus*. Esta evidencia llevó a la reclasificación taxonómica del grupo, integrando a *Boophilus* como un subgénero dentro de *Rhipicephalus* (Amrutha et al., 2023).

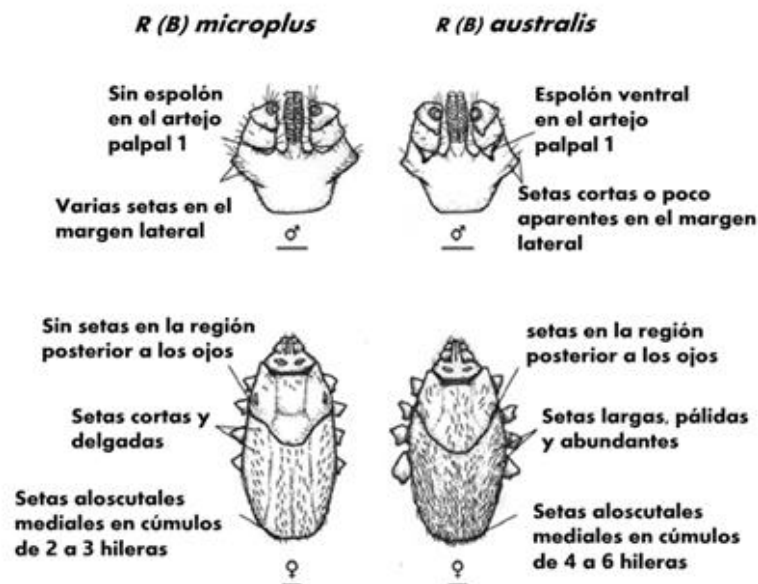


Figura 2.-Diferencias morfológicas clave entre las garrapatas *R. (B.) microplus* y *R. (B.) australis* de acuerdo con (Estrada-Peña et al., 2012), donde observamos la vista ventral y la vista dorsal, así como las diferencias morfológicas entre hembras y machos,

6.2 RHIPICEPHALUS (BOOPHILUS) MICROPLUS

Rhipicephalus (Boophilus) microplus, conocida como la garrapata del ganado, garrapata tropical o garrapata sureña, es un ectoparásito hematófago que infesta principalmente al ganado bovino, aunque también puede parasitar a otros animales como búfalos, caballos, asnos, cabras, ovejas, ciervos, cerdos, perros y algunos animales silvestres (De La Fuente & Kocan, 2006). Esta especie se considera como el ectoparásito de mayor impacto económico para el sector ganadero a nivel mundial, debido a los costos directos e indirectos asociados a su infestación (Abbas *et al.*, 2014). Además, del daño fisiológico que provoca por su alimentación, *R. (B.) microplus* actúa como vector de múltiples agentes patógenos incluyendo virus, bacterias, virus, protozoarios y helmintos, lo que agrava su relevancia en salud animal (Jongejan & Uilenberg, 2004; Mans *et al.*, 2004; Paessler *et al.*, 2017; Sahara *et al.*, 2019).

La dispersión global de *R. (B.) microplus* no está completamente documentada, y existen escasas evidencias directas sobre su introducción al continente americano. Sin embargo, se presume que esta especie es originaria del subcontinente indio o del continente africano, y que fue introducida en América durante los siglos XVI y XVII, posiblemente a través del transporte de ganado bovino en la época colonial (Barré & Uilenberg, 2010; Burger *et al.*, 2014).

En el caso de México, actualmente, el 30.06% del territorio nacional ha sido declarado libre de este ectoparásito, lo que representa una superficie de 599,367.84Km². Esta zona incluye los estados de Sonora, Tlaxcala, Aguascalientes, Baja California y Chihuahua, con excepción de algunos municipios de Chihuahua como Morelos y Guadalupe y Calvo, así como el norte de Baja California Sur (Servicio Nacional de Sanidad, 2025). El resto del país 69.49% del territorio – se encuentra en fase de erradicación o en programas de control intensivo como se muestra en la Figura 3.



Figura 3.-Mapa de Distribución de *R. (B.) microplus* en México, este mapa muestra la situación actual de la campaña nacional mexicana para el control *R. (B.) microplus* donde en verde podemos observar la zona libre, en amarillo la zona de erradicación, en amarillo/anaranjado en control, y en verde la zona de control reconocida por el gobierno como zona libre natural de la garrapata. (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, 2025)

6.3 SECTOR GANADERO EN MÉXICO

En los últimos años, la producción nacional de carne y leche en México ha mostrado un crecimiento sostenido, consolidando al país como uno de los principales productores ganaderos de América Latina y 5° productor de carne a nivel mundial. Se estima una producción anual de aproximadamente 2 millones de toneladas de carne de res y ternera, 13 millones de toneladas de leche y alrededor de 300,000 toneladas de carne destinadas a la exportación (Lagunes-Quintanilla *et al.*, 2024; Parra-Bracamonte *et al.*, 2020; Villavicencio-Gutiérrez *et al.*, 2023). En 2023, México alcanzó una producción de 2,214,928 toneladas de carne de bovino respaldada por un inventario de 36.6 millones de cabezas de ganado (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, 2024).

En las regiones tropicales de México, predomina el sistema de producción ganadera de doble propósito, que combina la obtención de leche y carne. En estas zonas, el hato bovino está compuesto mayoritariamente por animales producto de cruza *Bos taurus* y *Bos indicus*, lo que permite una mayor adaptabilidad a las condiciones climáticas y parasitarias de la región (G. Parra-Bracamonte *et al.*, 2005; Parra-Bracamonte *et al.*, 2020).

El incremento en la incidencia de enfermedades transmitidas por garrapatas, particularmente aquellas causadas por *R. (B.) microplus*, representa una amenaza creciente tanto para la salud animal como para la productividad ganadera. Las pérdidas económicas asociadas a estas enfermedades son considerables derivadas de la disminución en la producción de carne y leche, el incremento en los costos de control y la mortalidad animal. En este contexto, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha promovido el enfoque de “One Health”, que plantea un abordaje interdisciplinario e intersectorial para enfrentar la dispersión de ectoparásitos y las enfermedades que transmiten, incluidas aquellas con potencial zoonótico (Banović et al., 2021; Dantas-Torres et al., 2012)-

6.4 CONTROL DE LAS GARRAPATAS

El control de las infestaciones por garrapatas a representado un desafío persistente, debido a que estos ectoparásitos cuentan con pocos enemigos naturales. Por esta razón, desde la primera mitad del siglo XX, se implementaron estrategias basadas en el uso de productos químicos, entre los que destacan el petróleo crudo, hexacloruro de benceno (BHC), diclorodifeniltricloroetano (DDT) y compuestos arsenicales (Davey *et al.*, 1998). El uso indiscriminado de insecticidas químicos conduce al desarrollo de resistencia por parte de los insectos y a la generación de problemas de contaminación ambiental y daño a la salud humana y animal.

Debido a esa problemática se ha propuesto un enfoque basado en el control integrado de plagas como el planteado por De La Fuente y Kocan (2006), que considera la aplicación de distintos métodos de control, adaptados a las condiciones geográficas y epidemiológicas locales. Dentro de estos enfoques, los acaricidas continúan siendo uno de los componentes más utilizados y eficaces (De La Fuente & Kocan, 2006; Hubbard & Murillo, 2024; Oliveira *et al.*, 2011).

Si bien se han desarrollado alternativas a los insecticidas tradicionales como extractos vegetales, agentes de control biológico (bacterias, nematodos y hongos), y vacunas, mucho de estos métodos presentan eficacia limitada cuando se aplican de forma individual. Por ello, se promueve su integración dentro de estrategias combinadas de manejo para lograr un control más sostenible y efectivo de las poblaciones de garrapatas (Lagunes-Quintanilla *et al.*, 2024).

En México, el control sistemático de *R. (B.) microplus* en el ganado bovino fue oficializado en 1976 con la creación del Fideicomiso de la Campaña Nacional contra la Garrapata (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, 1998). En ese tiempo, el único grupo de ixodídeos autorizados eran los organofosforados. Para 1982, se reportó la primera cepa resistente en la región de Tuxpan, Veracruz. Posteriormente, en 1993, se identificaron poblaciones resistentes a piretroides, como flumetrina, deltametrina y cipermetrina en al menos cuatro estados del país. (Lagunes-Quintanilla *et al.*, 2024; Martínez-Ibáñez, 2016; Martínez-Ibáñez *et al.*, 2021; Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, 1994)

En la actualidad, se dispone de siete clases de pesticidas para el control de garrapatas: organofosforados, piretroides sintéticos, lactonas macrocíclicas, fomamidinas, benzoilureas, fenilpirazoles e isoxazolininas (Waldman *et al.*, 2023).

La mayoría de estos acaricidas actúan sobre el sistema nervioso central de las garrapatas, ejerciendo efectos neurotóxicos. Sus mecanismos de acción incluyen la interferencia en canales iónicos y enzimas clave, tales como: el canal de cloruro regulado por el ácido gamma-aminobutírico (GABA-Cl), el canal de cloruro activado por glutamato (Glu-Cl), los canales de

sodio dependientes de voltaje (Na^+), la enzima acetilcolinesterasa (AChE) y los receptores de octopamina (AOR) específicos de artrópodos (Waldman *et al.*, 2023).

Con el objetivo de estandarizar el manejo y monitoreo de la resistencia, el **Insecticide Resistance Action Committee (IRAC)**, ha propuesto una clasificación funcional de los acaricidas utilizados en el manejo de plagas de la subclase Acari. Esta clasificación se basa en el sitio de acción y el ingrediente activo de cada compuesto, y se representa en la Tabla 1. (De Rouck *et al.*, 2023; Sparks & Nauen, 2015).

Tabla 1.- Clasificación de acaricidas según el Grupo IRAC, su modo de acción y ejemplos de ingredientes activos. (Sparks & Nauen, 2015)

Grupo IRAC	Modo de acción/sitio de acción	Ingrediente Activo
1	Antagonistas del canal de cloruro regulado por GABA	ciclodieno organoclorados (endosulfán), fipronil
2	Moduladores de canales de sodio	piretroides (bifentrina)
3	Moduladores alostéricos del receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR) - Sitio I	spinosad
5	Moduladores alostéricos del canal de cloruro regulado por glutamato	abamectina, milbemectina, ivermectina
6	Inhibidores del crecimiento de ácaros (quitina sintasa)	clofentezina, hexythiazox, etoxazol
10	Inhibidores de la ATP sintasa mitocondrial	diafentiuuron, azociclotina, cihexatin, óxido de fenbutatin, propargita, tetradifon
12	Desacopladores de la fosforilación oxidativa	clorfénapir
13	Inhibidores de la síntesis de quitina	flucicloxuron, flufenoxuron
15	Agonistas del receptor de octopamina	amitraz
19	Inhibidores del transporte de electrones (Complejo III mitocondrial)	acequinocilo, fluacripirimo, bifenazato
20	Inhibidores del transporte de electrones (Complejo I mitocondrial)	fenazaquin, fenpiroximate, pirimidifen,

		piridaben, tebufenpyrad, tolfenpyrad
21	Inhibidores de la acetil-Coenzima A carboxilasa	espiroclorfen, espiromesifen, espirotetramat, espiropidion
23	Inhibidores del transporte de electrones (Complejo II mitocondrial)	cienopirafén, ciflumetofén, piflubumide, cietpirafén
25	Moduladores alostéricos del canal de cloruro regulado por GABA	fluralaner, afoxolaner
30	Moduladores alostéricos del receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR) -Sitio II	Péptido GS- omega/kappa HXTX-HV1a
32	Compuestos de modo de acción desconocido o incierto	dicofol
UN	Antagonistas del canal de cloruro regulado por GABA	ciclodieno organoclorados (endosulfán), fipronil

6.4.1 AMIDINAS

Las amidinas, también conocidas como formamidinas, son acaricidas que actúan inhibiendo la monoamino oxidasa (MAO) la cual es responsable del metabolismo de neurotransmisores en garrapatas y ácaros (de Waal & Danaher, 2014) . Además, estos compuestos funcionan como agonistas inversos o antagonistas de los receptores de octopamina, un neurotransmisor exclusivo de los invertebrados, lo que altera significativamente la señalización neuromuscular en los ectoparásitos (Bártíková *et al.*, 2016).

El amitraz [1,5 di-(2,4-dimetilfenil)-3-metil-1,3,5-triaza-penta-1,4-dieno], con fórmula química $C_{14}H_{23}N_3$ y peso molecular de 293,41 g/mol, es el representante más común de esta familia. Se trata de un compuesto triazapentadieno con acción insecticida y acaricida de amplio espectro utilizado en agricultura, horticultura y medicina veterinaria en todo el mundo desde 1974. (Corta *et al.*, 1999; Del Pino *et al.*, 2015; Gupta *et al.*, 2019).

6.4.2 CARBAMATOS

Los carbamatos son una amplia categoría de compuestos químicos que son ésteres del ácido carbámico con una gran variedad de aplicaciones, incluyendo el uso como agente insecticida (Palermo *et al.*, 2022). Su modo de acción se basa en la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa, esencial para la transmisión de impulsos nerviosos. Esta inhibición provoca una acumulación de acetilcolina en las sinapsis, lo que conlleva a una estimulación neuromuscular continua, parálisis y finalmente, la muerte del insecto por sobreexcitación del sistema nervioso (Bártíková *et al.*, 2016) El carbaril fue el primer miembro de esta familia utilizado como insecticida, tras su introducción en 1956, marcando el inicio de una nueva

generación de control químico más selectiva en comparación con los organoclorados utilizados previamente (Didgikar & Joshi, 2016).

6.4.3 Fipronil

En 1987, la empresa transnacional francesa Rhône-Poulenc Agro desarrolló el acaricida fipronil [5-amino-3-ciano-1-(2,6-dicloro-4-trifluorometilfenil)-4-trifluorometil sulfinil pirazol] (FPL) (Oliveira *et al.*, 2011). Este compuesto actúa sobre el sistema nervioso central de los invertebrados mediante la unión selectiva a los receptores de ácido gamma-aminobutírico (GABA), específicamente a la subunidad $\beta 3$ de los canales de cloro activados por GABA, donde bloquea su función, interfiriendo con el principal mecanismo inhibitorio del sistema nervioso central. Adicionalmente, el fipronil también puede interactuar con canales de cloro activados por glutamato (GluCl) y los canales de glutamato, impidiendo el flujo de iones de cloro (Cl^-) hacia el interior de las células nerviosas. Esta interrupción en la neurotransmisión provoca una hiperexcitación neuronal sostenida, lo que deriva en parálisis y muerte del organismo afectado (Rosa *et al.*, 2024). El fipronil ha demostrado ser eficaz tanto en tratamiento para la erradicación de *R. (B.) microplus*, como en aplicaciones profilácticas para prevenir nuevas infestaciones (Davey *et al.*, 1998).

6.4.4 ORGANOFOSFORADOS

Los organofosforados son compuestos químicos derivados de la esterificación entre un ácido fosfórico y un alcohol. Su principal mecanismo de acción consiste en la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (AChE), lo que provoca una acumulación excesiva del neurotransmisor acetilcolina en las sinapsis del sistema nervioso, generando una sobreestimulación neuronal que puede llevar a parálisis y muerte del organismo (Abreu-Villaça & Levin, 2016; Adeyinka *et al.*, 2023).

Aunque estos compuestos fueron sintetizados por primera vez en el siglo XIX (alrededor del año 1800) (Petroianu, 2010), no fue sino hasta la década de 1930 que el químico alemán Willy Lange documentó sus efectos tóxicos, similares a los de los agentes nerviosos. Durante la Segunda Guerra Mundial, el régimen nazi reconoció su potencial como arma química, desarrollando los conocidos gases neurotóxicos de la serie G (Adeyinka *et al.*, 2023).

Posteriormente, el químico alemán Gerhard Schrader, trabajando para la empresa Farbenfabriken Bayer, identificó la estructura general de los organofosforados con actividad anticolinesterásica. Este descubrimiento lo condujo al desarrollo del primer insecticida comercial basado en este grupo químico, conocido como Baldan (Abreu-Villaça & Levin, 2016).

6.4.5 PIRETROIDES

Los piretroides son compuestos sintéticos derivados de los extractos de flores del género *Chrysanthemum*, específicamente *Chrysanthemum cinerariaefolium* y *Chrysanthemum cinereum*. Estos extractos han sido empleados históricamente como insecticidas naturales. Los piretroides se clasifican en dos tipos (tipo I y tipo II), según sus propiedades toxicológicas y estructurales. Los piretroides tipo I carecen de un grupo ciano, mientras que los tipos II contienen este grupo funcional, el cual está asociado con la inducción de movimientos involuntarios y mayor persistencia en el organismo (Thatheyus *et al.*, 2013).

El efecto insecticida de los piretroides se base principalmente en su capacidad para unirse y alterar los canales de sodio dependientes del voltaje (NaV) en las neuronas de los insectos, prologando una despolarización sostenida que lleva a parálisis y muerte (Soderlund, 2011). Sin embargo, estudios neurofisiológicos, estructurales y funcionales han demostrado que los piretroides también pueden afectar otros sitios de acción, como los canales de cloro y calcio ampliando su espectro neurotóxico (Breckenridge *et al.*, 2009).

6.5 RESISTENCIA A ACARICIDAS

La resistencia a acaricidas se describe inicialmente como pérdida de eficacia de un fármaco empleado para el control de parásitos. Sin embargo, la definición propuesta por el grupo de expertos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) la define como “la capacidad de una cepa parasitaria para sobrevivir o multiplicarse a pesar de la administración o absorción de un agente químico en una dosis igual o superior a la recomendada para su erradicación” (Abbas *et al.*, 2014).

Los distintos tipos de resistencia que se reconocen son: la resistencia adquirida, la resistencia cruzada y la resistencia múltiple (Abbas *et al.*, 2014). En artrópodos, la resistencia a pesticidas es un fenómeno multifactorial, que puede involucrar factores de comportamiento, alteraciones bioquímicas, así como mecanismos metabólicos diseñados para contrarrestar la acción de los pesticidas (Cossío-Bayúgar *et al.*, 2018a).

En el caso particular de los acaricidas, la resistencia suele estar mediada por una o una combinación de los siguientes tres mecanismos principales (Dulbecco *et al.*, 2021a).

- a) Incremento en la capacidad de detoxificación, mediante la sobreexpresión de enzimas como las monooxigenasas, esterasas o glutatión S-transferasas.
- b) Reducción en la afinidad del sitio de acción, debida a mutaciones puntuales en genes que codifican los receptores blanco del acaricida (por ejemplo, canales de sodio, GABA, AChE).
- c) Disminución en la penetración a través de la cutícula, ya sea por modificaciones estructurales o por el engrosamiento de esta barrera externa.

La presencia simultánea de estos mecanismos puede potenciar la resistencia y dificultar seriamente el control eficaz de poblaciones de garrapatas en campo.

6.6 MECANISMOS DE RESISTENCIA

Los mecanismos de resistencia a acaricidas pueden agruparse en cuatro categorías principales, según el tipo de alteración fisiológica o conductual que permite al organismo sobrevivir a la exposición al compuesto.

1. Resistencia toxicodinámica: implica modificaciones en el sitio diana del acaricida, lo que reduce la afinidad del compuesto por su objetivo molecular (por ejemplo, mutaciones en canales iónicos, receptores o enzimas).
2. Resistencia toxicocinética: se refiere a alteraciones en la biodisponibilidad del acaricida, ya sea por incremento en su degradación, reducción en su absorción

eliminación más rápida o cambios en la distribución y persistencia del compuesto dentro del organismo.

3. Resistencia digestiva; ocurre cuando el sistema digestivo del parásito inactiva o neutraliza el tóxico antes de que llegue al sitio de acción.
4. Resistencia conductual: implica cambios en el comportamiento del parásito que reducen su exposición al acaricida, como evitar áreas tratadas o modificar patrones de alimentación o movimiento (Feyereisen *et al.*, 2015a).

La documentación y clasificación de estos mecanismos, así como de los modos de acción de los acaricidas, son desarrolladas por el “Insecticide Resistance Action Committee (IRAC), una iniciativa de la organización Croplife Internacional, como parte de los esfuerzos para mitigar la resistencia y preservar la eficacia de las herramientas disponibles en el sector agrícola y veterinario (Sparks & Nauen, 2015)

6.6.1 RESISTENCIA RELACIONADA CON PATRONES DE COMPORTAMIENTO

La resistencia conductual se refiere a aquellas respuestas adaptativas de los organismos frente a presión selectiva, que les permite evitar la exposición a un agente tóxico. Este tipo de resistencia implica una modificación en la conducta para minimizar el contacto con el compuesto químico (Hubbard & Murillo, 2024). En artrópodos hematófagos, Agnew & Romero en 2017, llevaron a cabo un experimento con *Cimex lectularius* (chinche de cama), en el cual utilizaron bioensayos de comportamiento. Los resultados mostraron que los organismos eran capaces de cambios de conducta que evitaban la exposición al insecticida evaluado, demostrando un mecanismo de evasión activa como forma de resistencia.

6.6.2 RESISTENCIA RELACIONADA CON EL SISTEMA DIGESTIVO

La resistencia digestiva involucra la capacidad del organismo para degradar compuestos tóxicos mediante procesos metabólicos en el tracto digestivo. Un componente clave en este tipo de resistencia es la microbiota intestinal, cuya actividad enzimática puede contribuir a la biotransformación y detoxificación de moléculas exógenas, reduciendo así su toxicidad (Collins & Patterson, 2019).

En este contexto, De Almeida *et al.*, (2017), aislaron bacterias del microbioma intestinal del lepidóptero *Spodoptera frugiperda*, que demostraron capacidad para metabolizar compuestos xenobióticos, evidenciando un papel activo del microbiota intestinal en la detoxificación de plaguicidas. Estos hallazgos respaldan la hipótesis de que la comunidad microbiana resistente en el intestino de artrópodos puede conferir una ventaja adaptativa frente a la exposición continua a acaricidas o insecticidas, modulando la toxicocinética de estos compuestos.

6.6.3 RESISTENCIA TOXICODINÁMICA

La toxicodinámica se refiere a la interacción entre los compuestos tóxicos y sus sitios de acción específicos en el organismo. La resistencia toxicodinámica se manifiesta cuando ocurren modificaciones genéticas o regulatorias que impiden o reducen dicha interacción, ya sea por mutaciones puntuales que alteran la conformación del sitio de blanco o por cambios en la expresión génica del receptor o canal afectado (De Boeck *et al.*, 2022; Feyereisen *et al.*, 2015a). Estas mutaciones pueden ser silenciosas (sin modificar la secuencia de aminoácidos), o pueden conducir a una sobreexpresión o modificación estructural de proteínas blanco, lo que provoca una menor afinidad del acaricida por un sitio de acción y, por ende, insensibilidad farmacológica. Por ejemplo, se han identificado seis mutaciones en el canal de sodio asociado con resistencia a

piretroides, así como cinco mutaciones en el receptor GABA-Cl asociadas con resistencia a fipronil (Castro Janer *et al.*, 2019; Janer *et al.*, 2021).

En el caso específico de *R. (B.) microplus*, Cossío-Bayúgar *et al.* (2020a), demostraron experimentalmente la presencia de mutaciones funcionales en el canal GABA-Cl en cepas resistentes a piretroides. La presencia de estas mutaciones correlación con la persistencia de contracción muscular tras la exposición a cipermetrina, lo cual respalda el rol funcional de los cambios en los sitios diana como mecanismos centrales de resistencia. Estos hallazgos constituyen evidencia directa de que las mutaciones en proteínas blanco no solo están presentes, sino que también alteran la farmacodinámica del acaricida, limitando su eficacia en cepas de garrapatas resistentes.

6.6.4 RESISTENCIA CINÉTICA (DETOXIFICACIÓN METABÓLICA)

La toxicocinética abarca las alteraciones que afectan la absorción, la distribución, el metabolismo y la excreción de los compuestos tóxicos en el organismo. En artrópodos hematófagos, este tipo de resistencia está dominado por mecanismos de detoxificación metabólica, que reducen la toxicidad del compuesto al modificar su estructura química (Feyereisen *et al.*, 2015b).

El principal mecanismo de resistencia a acaricidas en *R. (B.) microplus* es precisamente la desintoxicación metabólica, caracterizada por un incremento en la expresión o actividad de enzimas como esterasas, glutatión S-transferasa (GSTs) y citocromo P450 (CYP450). Estas enzimas convierten los acaricidas en moléculas más hidrofílicas, facilitando su excreción como compuestos menos tóxicos (Cossío-Bayúgar *et al.*, 2018a; Waldman *et al.*, 2023).

En general, la resistencia metabólica se atribuye al aumento en la actividad o expresión de tres grandes familias enzimáticas: esterasas, glutatión-S-Transferasas y la superfamilia del citocromo P450 (Montella *et al.*, 2012).

6.6.4.1 MONOXIGENASAS (CITOCROMO P450 (CYP), FMOS Y MOS)

Las mono oxigenasas citocromo P450 (CYPs) y las monoxigenasas dependientes de la flavina (FMOs) constituyen dos de las principales familias de mono oxigenasas en organismos eucariotas. Ambas participan en procesos de detoxificación metabólica, siendo fundamentales en la biotransformación de xenobióticos, incluidos los acaricidas.

Estas enzimas catalizan reacciones de oxidación en las que un átomo de oxígeno molecular (O₂) es incorporado al sustrato, mientras que el otro átomo es reducido para formar agua. Este mecanismo permite transformar compuestos hidrofóbicos, en moléculas más polares, facilitando su excreción (Sehlmeyer *et al.*, 2010).

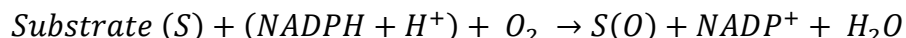
Las CYPs han sido ampliamente estudiadas por su papel en la resistencia metabólica, ya que su sobreexpresión puede conferir tolerancia a múltiples clases de acaricidas. Las FMOs y otras monoxigenasas (MOS) también participan en rutas de detoxificación complementarias, aunque su contribución específica varía entre especies y condiciones ambientales.

6.6.4.2 CITOCROMO P450 (CYP)

La familia del citocromo P450 (CYP) en insectos y ácaros comprende una amplia diversidad de enzimas involucradas en funciones fisiológicas esenciales y en el metabolismo de xenobióticos. Estas enzimas, principalmente mono oxigenasas, catalizan un amplio rango de transformaciones oxidativas, actuando tanto sobre sustratos endógenos como exógenos.

Las enzimas CYP fueron descritas por primera vez en 1982 por Fujii-Kuriyama *et al* y posteriormente Nelson, (2018) realizó un análisis filogenético exhaustivo, agrupando a las CYPs en clanes según su origen evolutivo común, lo que permitió una anotación sistemática de esta extensa familia en insectos.

Estas enzimas funcionan fijando oxígeno molecular (O_2) al sustrato mediante una reacción que depende de electrones proporcionados por NADPH, a través de la NADPH citocromo P450 reductasa (Bergé *et al.*, 1998). La reacción catalizada es la siguiente:



El nombre “citocromo P450” proviene de su propiedad espectrofotométrica: estas proteínas absorben a 450 nanómetros cuando son reducidas y saturadas con monóxido de carbono (CO) (Bergé *et al.*, 1998).

Estudios funcionales han demostrado el papel de CYPs en la resistencia a acaricidas. Por ejemplo, mediante ensayos de knockdown del gen de *CYP4G107* en *Rhodinus prolixus* (artrópodo, vector de Chagas), se observó una disminución en hidrocarburos en la cutícula, lo que sugiere una mayor permeabilidad al acaricia y una menor protección cuticular (Dulbecco *et al.*, 2020, 2021b; Pedrini *et al.*, 2009a). Asimismo, la caracterización del gen *CYP3093A11* permitió definir una nueva subfamilia, *CYP4PR1*, implicada en la resistencia a la deltametrina en *R. infestans* (Dulbecco *et al.*, 2021b).

Hasta la fecha, los citocromos CYPs en insectos se han agrupado en seis familias principales: cinco específicas de insectos (*CYP6*, *CYP9*, *CYP12*, *CYP18* y *CYP28*) y una compartida con otros eucariontes (*CYP4*) (Bergé *et al.*, 1998).

Funcionalmente, el clan *CYP2* se asocia con procesos fisiológicos y de desarrollo; mientras que los clanes *CYP3* y *CYP4* están más relacionados con la adaptación al ambiente y la detoxificación de compuestos xenobióticos (Dulbecco *et al.*, 2021a; Thomas, 2007).

En un estudio realizado por Cossío-Bayúgar *et al.*, (2018b), se utilizó RT-PCR cuantitativa para evaluar la expresión diferencial de genes citocromo P450 (*CYP*) y carboxilesterasa (*CE*) en poblaciones de campo de *R. (B.) microplus* resistentes a piretroides. Los resultados mostraron una sobreexpresión significativa de los genes *CYP*, la cual fue proporcional al grado de resistencia detectado en los bioensayos, confirmando el papel central de esta familia en la resistencia metabólica a piretroides. Estos hallazgos sugieren que la cuantificación de la expresión génica de *CYP* puede ser un marcador diagnóstico útil para monitorear resistencia a acaricidas en garrapatas de campo.

.

6.6.4.3 MONOXIGENASAS DEPENDIENTES DE FLAVINAS (FMOS Y MAOS)

Las monoxigenasas dependientes de flavinas (FMOs) son enzimas de la clase de las flavoenzimas, cuya función principal es catalizar reacciones de oxidación en una amplia variedad de compuestos xenobióticos, incluyendo fármacos, plaguicidas y toxinas ambientales. Estas enzimas incorporan un átomo de oxígeno molecular al sustrato mientras que el segundo átomo es

reducido a agua, constituyendo así un mecanismo clave de detoxificación metabólica en muchos organismos (Alfieri *et al.*, 2008; Cashman, 2024).

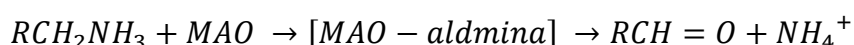
La actividad enzimática de una flavoproteína con estas características fue descrita por primera vez en 1979 por Poulsen & Ziegler, quienes lo identificaron en tejido hepático de cerdos y caracterizaron su cinética de reacción. Posteriormente, esta enzima fue reconocida como una monooxigenasa dependiente de flavinas (FMO) y que pertenecen a la clase de flavoenzimas. En términos funcionales se reconocen cuatro clases principales de flavoproteínas involucradas en la activación de oxígeno molecular y la oxidación de sustratos de importancia biológica.

- **Oxidasa**s, que transfieren electrones al oxígeno molecular produciendo peróxidos de agua
- **Monooxigenasa**s, que insertan un átomo de oxígeno en el sustrato y reducen el otro a agua, como en el caso de las FMOs.
- **Transferasa**s de electrones, que median el paso de electrones entre diferentes sistemas redox.
- **Deshidrogenasa**s/**transhidrogenasa**s, que catalizan la transferencia de átomos de hidrógeno entre sustratos.

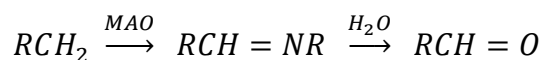
Los sustratos típicos de las FMOs son compuestos nucleofílicos que contienen nitrógeno o azufre, tales como aminas, amidas, tioles y sulfuros, que al oxidarse se transforman en productos con mayor polaridad y con facilidad de excreción,

Por otra parte, las monoaminoxidasas (MAOs) también forma parte de las flavoenzimas y cumplen una función crítica en la degradación de aminas biogénicas neuro activas, convirtiéndolas en aldehído inactivos, los cuales posteriormente se metabolizan a productos aún más polares. Aunque su papel principal está en el metabolismo de neurotransmisores, algunas MAOs también pueden oxidar ciertos xenobióticos, aunque en menor proporción (Cashman, 2024).

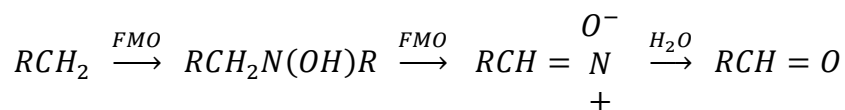
Reacciones representativas: MAO (oxidación de aminas primarias):



Conversión de una amida biogénica a aldehído vía aldimina (MAO)



FMO (oxidación de aminas secundarias vía nitrona)



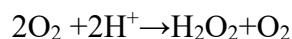
Estas rutas metabólicas son clave tanto en la degradación de moléculas endógenas como en la biotransformación de acaricidas, contribuyendo a la resistencia metabólica observada en varios artrópodos (Tian *et al.*, 2014).

6.6.4.4 ENZIMAS SUPERÓXIDO DISMUTASA

Ante el estrés químico inducido por la exposición a acaricidas, los organismos activan diversas respuestas fisiológicas para mantener la homeostasis celular y minimizar el daño potencial. Una de estas respuestas clave es la activación de defensas antioxidante, los cuales incluyen enzimas como superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y peroxidasa.

Estas enzimas neutralizan las especies reactivas de oxígeno (ROS) generadas durante el metabolismo xenobiótico, evitando el daño a lípidos, proteasas, proteínas y ADN. En estudios realizados en diversos insectos y ácaros, se ha demostrado que la exposición a acaricidas induce un incremento significativo en la expresión de genes antioxidantes, especialmente *SOD*, lo cual se ha propuesto como un biomarcador de resistencia a acaricidas (Xin *et al.*, 2024).

La enzima superóxido dismutasa cataliza la siguiente reacción:



Este proceso convierte los radicales superóxidos en peróxido de hidrógeno, que luego es descompuesto por catalasa o peroxidasa, cerrando el circuito antioxidante.

6.6.4.5 GLUTATIÓN S-TRANSFERASA (GST) Y GLUTATIÓN PEROXIDASA (GPX)

Las glutatión S-transferasas (GST) son una familia de enzimas involucradas en la biotransformación de compuestos tóxicos, tanto endógenos como xenobióticos. Estas enzimas catalizan la conjugación del glutatión reducido (GSH) con compuestos electrofílicos, incrementando su solubilidad y excreción. Su función es clave en los mecanismos de desintoxicación metabólica frente a acaricidas, ya que pueden neutralizar compuestos tóxicos antes de que alcancen sus sitios blancos.

En garrapatas, la expresión diferencial de GST ha sido asociada con resistencia a múltiples familias de acaricidas, incluyendo organofosforados y piretroides. Estas enzimas también participan en la protección celular frente al daño por estrés oxidativo, al reducir intermediarios reactivos generado por la acción de plaguicidas (Aguilar-Díaz *et al.*, 2018; Cossio-Bayugar *et al.*, 2002; Miranda-Miranda *et al.*, 2016; Venthur *et al.*, 2022; J. G. Vontas *et al.*, 2001).

6.6.4.6 GLUTATIÓN PEROXIDASAS (GPx)

Las enzimas glutatión peroxidasas (GPx), y en particular la enzima fosfolípido hidroperóxido glutatión peroxidasa (PHGPx), juegan un papel esencial en la defensa celular al reducir los hidroperóxidos de fosfolípidos generados por estrés oxidativo. En un estudio realizado por Cossío-Bayúgar *et al.* (2005), se aisló y secuenció el gen PHGPx en *R. (B.) microplus*, encontrando diferencias de secuencia entre cepas susceptibles y resistentes. En total, se identificaron ocho mutaciones, de las cuales cinco resultaron en cambios en la secuencia aminoacídica en cepas resistentes a uno o más clases de acaricidas, sin embargo, estas cepas

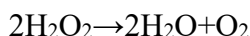
también presentaron una disminución en la expresión de la GPx, indicando una posible redistribución de la desintoxicación metabólica a otras rutas metabólicas.

El análisis de expresión génica mediante PCR en tiempo real reveló que las cepas de organismos resistentes a organofosforados presentaban una sobreexpresión significativa de PHGPx, lo que sugiere una respuesta adaptativa al estrés oxidativo inducido por dichos compuestos. En contraste, las cepas resistentes a dos o más clases de acaricidas mostraron una disminución en la expresión de esta enzima, lo que indica una posible redistribución del esfuerzo detoxificante hacia otras rutas metabólicas.

Estos hallazgos respaldan el papel dual y complementario de las GST y GPx en la resistencia metabólica, ya sea mediante la conjugación directa de compuestos tóxicos o por la neutralización de especies reactivas de oxígeno. Ambas familias enzimáticas se consolidan, así como biomarcadores moleculares clave para el estudio de la resistencia múltiple a acaricidas en *R. (B.) microplus*.

6.6.4.7 CATALASAS

La enzima catalasa (CAT) desempeña un papel esencial en la defensa antioxidante de los organismos, al catalizar la descomposición del peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en agua y oxígeno molecular. Esta reacción es crucial para proteger a las células del daño inducido por especies reactivas de oxígeno (ROS), generadas en condiciones de estrés oxidativo (Singh & Kumar, 2019).



Diversos insecticidas, incluidos piretroides, organofosforados y organoclorados, han demostrado inducir estrés oxidativo al aumentar la producción de ROS en tejidos de insectos y ácaros (Hao, *et al.*, 2020). En este contexto, un incremento en la actividad o expresión de catalasa puede representar un mecanismo compensatorio de defensa y un posible biomarcador de resistencia metabólica.

6.6.4.8 ESTERASAS Y ACETILCOLINESTERASA

Las esterasas constituyen una familia de enzimas ampliamente implicadas en la detoxificación de compuestos xenobióticos incluyendo organofosforados y piretroides. Su función principal consiste en hidrolizar enlaces éster presentes en estas moléculas, lo que puede disminuir su toxicidad antes de que interactúen con su molécula blanco (Cossío-Bayúgar *et al.*, 2021).

En 2000, Hernández *et al.*, identificaron y secuenciaron dos fragmentos de cDNA correspondientes a esterasas en cepas susceptibles de *R. (B.) microplus* y al compararlas con cepas resistentes, detectaron mutaciones que provocaban sustituciones de aminoácidos, lo que sugiere una posible alteración funcional vinculada a la resistencia a piretroides.

Posteriormente, en 2002 Guerrero *et al.*, identificaron mediante PCR dos sustituciones de aminoácidos vinculados con la resistencia a piretroides. Además, concluyeron que una alta frecuencia de alelos de la esterasa *CzEst9* en cepas de organismos resistentes estaba asociada con la resistencia a permetrina.

En un estudio más reciente, de Cossío-Bayúgar *et al.*, 2018b analizaron la expresión génica de enzimas metabolizadoras de xenobióticos (XMEs), como carboxilesterasa (CE), citocromo P450 (CYP) y acetilcolinesterasa (AChE), en muestras de campo de *R. (B.) microplus* resistentes a piretroides. Mediante RT-qPCR, reportaron que uno de los aislados, resistente tanto a piretroides como a organofosforados, mostró una sobreexpresión significativa de carboxilesterasas. Sin embargo, otros aislamientos resistentes a piretroides presentaron subexpresión de CE, pero sobreexpresión de CYP, lo que indica que la CE no es el mecanismo predominante en todos los casos, pero puede desempeñar un papel relevante dependiendo del contexto genético y del acaricida específico.

6.6.4.9 ACETILCOLINESTERASA (AChE)

La acetilcolinesterasa, aunque funcionalmente distinta, también pertenece al grupo de esterasas y representa el blanco molecular de organofosforados y carbamatos. Estos acaricidas inhiben la actividad de la AChE en las sinapsis del sistema nervioso, causando acumulación de acetilcolina y muerte del parásito (Cossio-Bayugar *et al* 2021).

En un estudio reciente, (Cossio-Bayugar *et al.*, 2024) reportaron, mediante análisis de qPCR, una sobreexpresión significativa del gen *AChE* en cepas de *R. (B.) microplus* resistentes a múltiples clases de acaricidas. Además, se identificaron mutaciones no sinónimas en la secuencia codificante del gen, las cuales podrían inducir cambios conformacionales en el sitio activo de la enzima, reduciendo su afinidad por los inhibidores acaricidas. Estas mutaciones, en conjunto con la sobreexpresión, sugieren un doble mecanismo de resistencia toxicodinámica: evasión por alteración estructural y saturación por incremento en la cantidad de enzima blanco. Estos hallazgos refuerzan el papel de *AChE* como un biomarcador molecular relevante en la vigilancia de resistencia, y subrayan la necesidad de considerar tanto componentes transcriptómicos como mutacionales al evaluar resistencia múltiple en campo.

Consideraciones funcionales

Las esterasas actúan de dos formas principales:

1. **Metabolismo o degradación del acaricida** – en especial organofosforados y piretroides, a través de carboxilesterasas.
2. **Secuestro o unión no catalítica** – actuando como reservorio enzimático que evita que el compuesto tóxico llegue al sitio blanco.

En conjunto, estos mecanismos permiten que las esterasas, incluyendo AChE, participen de forma diferencial y complementaria en la resistencia a acaricidas. Su contribución puede depender del tipo de compuesto, la historia de exposición y el trasfondo genético de las poblaciones de garrapatas (Cossio-Bayugar *et al.*, 2021).

6.6.4.10 DESHIDROGENASAS DE CADENA CORTA

Las deshidrogenasas, también conocidas como reductasas de cadena corta, son enzimas que juegan un papel en el metabolismo de hormonas, síntesis de hormonas y ayudan en la desintoxicación de xenobióticos. Estas actúan sobre sustratos tan diversos como esteroides, ácidos grasos, azúcares, hidrocarburos aromáticos, antibióticos y compuestos involucrados en el metabolismo del nitrógeno (Chang *et al.*, 2015; Vogel *et al.*, 2010). Estas enzimas han sido relacionadas con resistencia metabólica en insectos (Tchigossou *et al.*, 2018; Vijay *et al.*, 2015).

6.6.4.11 TRANSPORTADORES: CASETE DE UNIÓN A ATP (ABC) Y SUPERFAMILIA DE FACILITADORES MAYORES (MFS)

Los transportadores ABC (*ATP-binding Cassette*) constituyen una de las familias más amplias de proteínas transmembranales implicadas en el transporte activo. Estas proteínas están formadas típicamente por dos dominios de unión a nucleótidos (NBDs) localizados en el citoplasma, que se encargan de unir e hidrolizar ATP, y dos dominios transmembranales (TMDs) responsables del paso de sustratos a través de la membrana; en algunos casos, pueden contener un tercer dominio adicional (Amezian *et al.*, 2024).

6.6.5 PENETRACIÓN REDUCIDA

Uno de los mecanismos de resistencia a acaricidas en artrópodos consiste en la reducción de la penetración del compuesto a través de la cutícula. Este mecanismo actúa como una barrera física inicial, disminuyendo la cantidad de acaricida que alcanza su sitio de acción en el interior del organismo.

La resistencia por penetración reducida se asocia principalmente con modificaciones estructurales de la cutícula, como el incremento en su grosor y la sobreproducción o acumulación de proteínas cuticulares, lo cual disminuye la tasa de absorción del acaricida (Balabanidou *et al.*, 2018a; Fang *et al.*, 2015)

6.7 MEDICIÓN DE LA RESISTENCIA A ACARICIDAS EN GARRAPATAS

Debido a la importancia del control de garrapatas para el sector ganadero en el mundo, se han diseñado estrategias para poder medir el fenómeno de resistencia a acaricidas de las siguientes maneras:

6.7.1 PAQUETE DE LARVAS

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) ha recomendado el uso de diversas pruebas para la evaluación de la resistencia a acaricidas, siendo una de las más utilizadas es la Prueba de Inmersión de Adultas (PIA), no obstante, también se emplean otros métodos validados, como la prueba del paquete de larvas y la inmersión de larvas, que ofrecen ventajas particulares en estudios experimentales (Araque *et al.*, 2014; FAO, 2004).

La prueba de paquetes de larvas fue descrita por Stone y Haydock en 1962 y consiste en exponer larvas de garrapatas a un papel filtro impregnado con el acaricida, previamente disuelto en un solvente inerte. Posteriormente, se determina la concentración letal media (LC₅₀) y se compara con la LC₅₀ de una cepa susceptible de referencia, permitiendo así estimar el índice de resistencia del acaricida evaluado (Castro-Saines *et al.*, 2021; Jongejan *et al.*, 2024)

En México, una de las cepas más utilizadas como referencia es la cepa Media Joya de *R. (B.) microplus*, la cual ha mostrado alta susceptibilidad a acaricidas convencionales como organofosforados, piretroides y amidinas. Actualmente, esta cepa se emplea ampliamente como cepa estándar para ensayos de resistencia en América Latina (Aguilar-Tipacamú *et al.*, 2008; Martínez-Ibáñez *et al.*, 2021; Prado-Ochoa *et al.*, 2013)

El laboratorio de CENAPA-SENASICA-SADER ha mantenido cepas de referencia para el monitoreo de la resistencia a acaricidas, dichas cepas son seleccionadas y caracterizadas toxicológicamente para evaluaciones de eficacia, teniendo 5 cepas : "Susceptible/Zacatecas", que presenta una tasa de mortalidad del 100 % al exponerse a todos los acaricidas; "Mora", resistente

a organofosforados (OP) y piretroides (Pyr); "San Alfonso", resistente a organofosforados, piretroides y amitraz; y "Rancho Nuevo y Vargas", resistentes a organofosforados, piretroides, amitraz y fipronil (Martínez-Ibáñez *et al.*, 2021; Martínez-Ibáñez, 2016)

6.7.2 ZIMOGRAMAS

Los zimogramas son una técnica que permite detectar actividad enzimática específica tras la separación proteica mediante electroforesis (Gersten & Gabriel, 1992). Esta metodología combina la separación de proteínas en un gel, normalmente por peso molecular utilizando electroforesis, con la detección de la actividad catalítica mediante incubación del gel con un sustrato cromogénico específico (Gersten & Gabriel, 1992; Manchenko, 1994; Miranda-Miranda *et al.*, 2006).

Una vez separadas las proteínas, las bandas enzimáticas activas pueden visualizarse en el gel como zonas coloreadas o aclaradas, dependiendo del tipo de reacción. Esto permite identificar no solo la presencia de la enzima, sino también estimar el tamaño molecular (en kilodaltones) de sus isoformas, así como su actividad relativa (Miranda-Miranda, *et al* 2023).

En 2005, Miranda-Miranda *et al.*, Utilizaron esta técnica para estudiar la actividad de diversas enzimas en *R. (B.) microplus*. Sus resultados mostraron que las enzimas esterasa, fosfodiesterasa, glutatión peroxidasa y catalasa están directa o indirectamente asociadas con la degradación de xenobióticos (como acaricidas), sugiriendo su participación en los mecanismos de resistencia metabólica. Esta técnica, por tanto, representa una herramienta útil para caracterizar funcionalmente la actividad enzimática en poblaciones resistentes (Miranda-Miranda *et al* 2005; Miranda-Miranda *et al*, 2023).

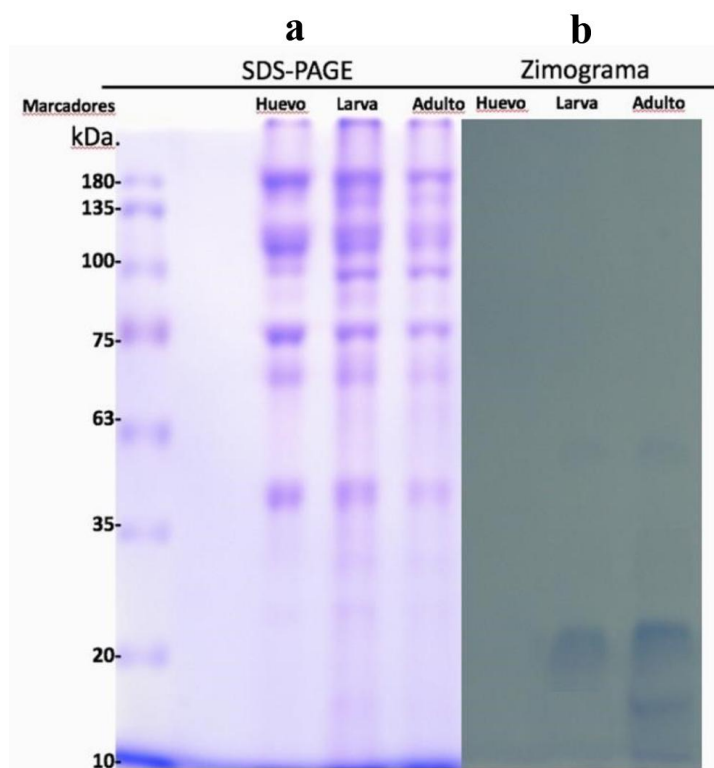


Figura 4.- a) Electroforesis en SDS-PAGE de proteínas obtenidas de diferentes estadios de garrapatas (huevo, larva y adulto) teñidas con azul de Coomassie, b) Zimogramas con actividad

GST, obtenidos de proteínas de las muestras antes mencionadas (SDS-PAGE). (Miranda-Miranda, et al 2023)

Actualmente para el estudio de resistencia se propone la integración de zimogramas y transcriptómica lo cual resulta un puente natural entre los mecanismos de resistencia moleculares (mutaciones y regulación génica) y los mecanismos bioquímico-fisiológicos clásicos (enzimas metabolizadoras de xenobióticos, detoxificación, penetración o excreción) (Miranda-Miranda *et al*, 2023).

Este enfoque dual no solo enriquece la comprensión del fenómeno de resistencia, sino que también facilita el diseño de herramientas diagnósticas más precisas y el desarrollo de estrategias de control que aprovechen marcadores tanto bioquímicos como moleculares (Miranda-Miranda *et al*, 2023). Ejemplo de esto son: el zimograma de acetilcolinesterasa muestra una isoenzima de 65 kDa, que al ser cotejado con transcriptomas de *R. (B.) microplus* en GenBank (PRJNA431211, PRJNA338961, PRJNA193287), se correlaciona con secuencias de ~62 kDa. La diferencia se atribuye a modificaciones postraduccionales como glicosilación. (Miranda-Miranda *et al*, 2023)

6.7.3 ENSAYOS BIOQUÍMICOS

La cuantificación de enzimas involucradas en la detoxificación metabólica como esterasas, glutatión-S-transferasa (GST) y monooxigenasas en *R. (B.) microplus* en realizarse mediante protocolos bioquímicos (Fular *et al.*, 2020; Sachin *et al.*, 2021)

Uno de los métodos más comúnmente empleados se basa en la hidrólisis de sustratos como α y β naftilacetato, en presencia de sal azul (fast blue). Esta reacción forma un complejo coloreado cuya intensidad es directamente proporcional a la cantidad de esterasas presentes en la muestra (Baffi *et al.*, 2008) .

Recientemente, Gupta *et al.* (2023) aplicaron este protocolo para evaluar la correlación entre niveles de actividad enzimática y la resistencia a diferentes clases de acaricidas, demostrando que un incremento en la actividad de estas enzimas puede estar asociado con fenotipos resistentes.

6.7.4 PCR EN TIEMPO REAL CUANTITATIVO (QRT-PCR)

La PCR en tiempo real ha sido utilizada para detectar y cuantificar marcadores genéticos asociados con la resistencia a acaricidas en artrópodos. Esta técnica permite una detección rápida, sensible y específica para la detección de mutaciones y/o cambios de expresión de genes relacionados con la resistencia, como alternativa a los ensayos tradicionales (Feng *et al.*, 2011; Shumate *et al.*, 2023; Yin *et al.*, 2021)

Se ha demostrado una correlación significativa entre los perfiles de resistencia a acaricidas en *R. (B.) microplus* y la expresión diferencial de genes relacionados con la detoxificación metabólica de xenobióticos, particularmente genes que codifican para citocromo P450 y carboxilesterasas. (Cossio-Bayugar *et al.*, 2008; Cossío-Bayúgar *et al.*, 2009; Cossio-Bayugar *et al.*, 2018; Cossio-Bayugar *et al.*, 2024)

Mediante la técnica de PCR en tiempo real cuantitativa (qRT-PCR), se ha validado su utilidad como herramienta diagnóstica y como parámetro predictivo de resistencia, permitiendo

identificar cepas resistentes en etapas tempranas del proceso de selección (Cossío-Bayúgar *et al.*, 2018b)

6.8 SECUENCIACIÓN MASIVA Y TRANSCRIPTOMA

En los últimos años, la secuenciación de alto rendimiento (NGS, por sus siglas en inglés), ha revolucionado el análisis genómico y transcriptómico, posicionándose como una herramienta esencial para la obtención de transcritos, la secuenciación de genomas y el análisis funcional de los datos biológicos. La mejora continua en la calidad de las lecturas y el desarrollo acelerado de algoritmos de análisis, ha surgido una nueva era en el estudio de los transcriptomas (Martin & Wang, 2011; Sahraeian *et al.*, 2017).

Los experimentos transcriptómicos permiten cuantificar perfiles transcripcionales asociados a fenotipos específicos, facilitando el entendimiento de procesos fisiológicos, adaptaciones ecológicas y respuesta a distintos estímulos ambientales o tratamientos. En el caso de las garrapatas, los estudios de transcriptoma han permitido identificar genes diferencialmente expresados, relacionados con mecanismos de resistencia a acaricidas, metabolismo de xenobióticos, rutas antioxidantes, reparación de cutícula e interacción hospedero-parásito o (Chung *et al.*, 2021; Cossío-Bayúgar *et al.*, 2025; Moreton *et al.*, 2016)

La técnica de RNA-seq se ha consolidado como un método robusto para el análisis de expresión génica basada en la cuantificación de la abundancia de transcritos mediante el número de lecturas secuenciadas de ARN mensajeros (Thawng & Smith, 2022). La calidad de un experimento de RNA-seq depende en gran medida de un diseño experimental adecuado, incluyendo la selección del tipo de librería, la profundidad de secuenciación y el número de réplicas biológicas, siendo este último un factor crítico para lograr una detección confiable de la expresión diferencial (Thawng & Smith, 2022).

Cuando se cuenta con un genoma de referencia disponible, se emplea comúnmente la estrategia de reconstrucción de transcritos basada en mapeo, en la cual las lecturas de RNA-seq se alinean contra secuencias génicas conocidas para reconstruir y cuantificar los transcritos esperados (Martin & Wang, 2011).

6.8.1 RELACIÓN DE MECANISMOS DE RESISTENCIA EN GENÉTICA MOLECULAR CON MECANISMOS DE RESISTENCIA BIOQUÍMICOS - FÍSICOS

La resistencia a acaricidas puede analizarse en dos dimensiones:

1. Genética-molecular, que abarca mutaciones puntuales, inserciones/deleciones, recombinaciones y cambios en la regulación génica (*cis/trans*, duplicaciones, amplificaciones, interrupciones, etc.).
2. Bioquímica-fisiológica, que describe la resistencia clásica: modificaciones en la molécula blanco (toxicodinámica), alteraciones en la penetración/metabolismo/excreción (toxicocinética) y la contribución de la microbiota a la resistencia o susceptibilidad.

Esta dualidad se resume en la Tabla 2, que muestra cómo los distintos tipos de cambios genéticos se asocian a los mecanismos bioquímicos/fisiológicos de resistencia (Feyereisen *et al.*, 2015a)

Tabla 2.-Tabla que relaciona en dos dimensiones la resistencia a acaricidas en artrópodos, en las columnas tenemos los tipos de mutaciones que pueden experimentar las secuencias, así como los tipos de regulación génica que podría presentar, y en las filas tenemos los tipos de resistencia de acuerdo con los mecanismos de resistencia fisicoquímicos. (*Feyereisen et al., 2015a*)

Tipo de cambio genético Tipo de mutación	Resistencia toxicodinámica (modificación en molécula diana)	Resistencia toxicocinética (penetración, Metabolismo, secuestación, excreción)	Resistencia relacionada con microbiota (biopesticidas)
Mutaciones que afectan la secuencia			
Mutación en una posición	✓	✓	
Mutaciones en más de una posición	✓	✓	
Inserciones o deleciones y mutaciones no-sense	✓		✓
Recombinación		✓	
Regulación positiva			
Duplicación	✓	✓	
Amplificación	✓	✓	
Cis positiva		✓	
Trans positiva		✓	✓
Regulación negativa			
Interrupción	✓		✓
Cis negativa			✓
Trans negativa			✓

6.8.2 MUTACIONES

Las mutaciones son cambios aleatorios en la secuencia de las bases en el ADN o ARN que pueden alterar la función de un gen (Beggas & Lounici, 2023; Chakrabarty *et al.*, 2016; Ghajar *et al.*, 2025). Estas modificaciones ocurren de manera natural como consecuencia de errores en la replicación o de lesiones espontáneas en el ADN codificante (Dixit & Kumar, 2018).

Las mutaciones pueden presentarse en diferentes formas:

- **Sustituciones puntuales**, cuando ocurre el cambio de un solo nucleótido en la cadena de ADN o ARN, o bien en más de una posición (Fushan & Drayna, 2009),
- **Inserciones o deleciones (indels)**, que implican la adición o eliminación de uno o varios nucleótidos dentro de la secuencia (Torgerson, 2020). Si el número de bases nucleotídicas insertadas o eliminadas es múltiplo de tres, se conserva el marco abierto de lectura de la proteína resultante (*in-frame*). En contraste, cuando la modificación no es divisible entre tres, se genera un desplazamiento del marco de lectura (*Frameshift*), lo cual altera de manera drástica la secuencia de aminoácidos (A. Gupta & Singh, 2013; Termanini, 2020)
- **Mutaciones sin sentido**, en las que un solo cambio de nucleótido convierte un codón codificante en un codón de paro, truncando prematuramente la síntesis de la proteína (Ghajar *et al.*, 2025; Jung *et al.*, 2011; Wittenstein *et al.*, 2023)

6.8.3 REGULACIÓN GÉNICA

La regulación génica es el conjunto de mecanismos que controlan la actividad y la expresión de los genes, permitiendo aumentar o disminuir la cantidad de producto génico de acuerdo con las necesidades del organismo en procesos como la función celular, el desarrollo y la respuesta al medio ambiente (Antoneli *et al.*, 2025; Tai *et al.*, 2013).

6.8.3.1 REGULACIÓN *CIS* Y *TRANS*

La *regulación cis* corresponde a la maquinaria que controla la expresión génica de manera espacio-temporal. Está mediada por elementos *cis*-reguladores (cREs), como promotores, potenciadores (*enhancers*), silenciadores e insultadores, que son regiones de cromatina accesibles donde se unen los factores de transcripción (Chahal *et al.*, 2019; Maston *et al.*, 2006; Narlikar & Ovcharenko, 2009). Estos elementos se encuentran cercanos a los genes que regulan.

Por contraste, los factores reguladores *trans* son proteínas o complejos que, al unirse a secuencias específicas de ADN, pueden modular la expresión de genes distantes o incluso en otro cromosoma (Q. Wang *et al.*, 2019).

6.8.3.2 DUPLICACIÓN GÉNICA

La duplicación génica es un mecanismo que incrementa el número de copias de un gen, aumentando con ello la producción de un producto (Feyereisen *et al.*, 2015b). En *D. melanogaster* se ha reportado que los eventos de duplicación génica son más frecuentes que las mutaciones puntuales, lo que resalta su papel en la evolución de la resistencia a xenobióticos (Schrider *et al.*, 2013).

6.8.3.3 AMPLIFICACIÓN GÉNICA

La amplificación genética es un proceso complejo que puede conducir a la sobreexpresión de un gen o incluso de una región cromosómica completa. Se han descrito múltiples mecanismos asociados a este fenómeno, como translocaciones, reintegraciones de elementos

extracromosomales, la acción de transposones y duplicaciones en tándem repetidas. (Feyereisen *et al.*, 2015b; Hoy, 2019) .

6.8.3.4 EMPALME ALTERNATIVO (*ALTERNATIVE SPLICING*)

El empalme alternativo es un proceso de maduración postranscripcional del ARN mensajero (ARNm) que permite la formación de diferentes isoformas a partir de un mismo gen, mediante la inclusión o exclusión diferencial de exones e intrones. Esto amplía la diversidad proteica y puede modificar funciones celulares clave (Bush *et al.*, 2017).

Existen al menos siete categorías de Empalme alternativo:

1. Omisión de exón.
2. Sitios alternativos de empalme 5'.
3. Sitios alternativos de empalme 3'.
4. Exones mutuamente excluyentes.
5. Retención de intrón.
6. Promotores alternativos.
7. Poliadenilación alternativa (Bhadra *et al.*, 2020).

La mayoría de los genes generan al menos dos isoformas (Jordan *et al.*, 2019). Estas isoformas pueden diferir en su localización intracelular, estabilidad, fosforilación, actividad enzimática y afinidad de unión, lo que influye directamente en la fisiología del organismo y en su capacidad de adaptarse a presiones ambientales o químicas, como el uso de acaricidas (Zhu *et al.*, 2025).

7. ANTECEDENTES

7.1 RESISTENCIA A *RHIPICEPHALUS (BOOPHILUS) MICROPLUS* A LOS ACARICIDAS EN MÉXICO

La resistencia a acaricidas en *R. (B.) microplus* se define como la presencia y aumento significativo en el porcentaje de individuos de una población que sobrevive tras la exposición a dosis estándar de un compuesto químico. Bajo condiciones normales, estas dosis serían letales para la mayoría de los organismos. Este fenómeno representa un serio desafío para el control efectivo del parásito, especialmente en regiones con alta presión de tratamiento químico. (Araque et al., 2014; Castro Janer et al., 2019a; Cossio-Bayugar et al., 2008; M. et al., 2005; Miranda-Miranda et al., 2006; Sparks & Nauen, 2015; Waldman et al., 2023).

La resistencia de *R. (B.) microplus* a distintos grupos de acaricidas en México se ha documentado desde la década de 1980 (Aguirre et al., 1986). Desde entonces, los reportes muestran no solo un incremento en el número de productos comprometidos, sino también una expansión geográfica significativa de la resistencia en diversas regiones del país (Tabla 3). (Aguirre et al., 1986; Miller et al., 2013; Perez-Cogollo et al., 2010; Soberanes-Céspedes et al., 2002).

Tabla 3.- Cronología de aparición de los primeros casos de resistencia a acaricidas en México.

Grupo químico	Año del primer reporte	Región	Referencia
Organoclorados y organofosforados	1981	Este y noreste de México	(Aguirre et al., 1986)
Piretroides sintéticos	1993	Zona del Golfo de México	(Ortiz et al., 1995)
Amitraz	2002	Tabasco	(Soberanes-Céspedes et al., 2002)
Ivermectina	2010	Yucatán	(Perez-Cogollo et al., 2010)
Fipronil	2013	Norte de México	(Miller et al., 2013)

Las principales pérdidas económicas derivadas de la resistencia de *R. (B.) microplus* a los acaricidas incluyen:

- Reducción en la eficacia de los tratamientos, lo que incrementa la carga parasitaria en el ganado.
- Costos elevados debido al uso repetido o combinado de productos acaricidas.
- Aumento del estrés fisiológico en los animales, con impacto negativo en la producción de leche y carne.
- Mayor riesgo de transmisión de enfermedades por vectores, como la babesiosis y anaplasmosis.
- Presión selectiva que acelera la evolución de poblaciones multirresistentes, reduciendo la disponibilidad de herramientas efectivas de control.

Estos factores subrayan la urgencia de desarrollar e implementar estrategias de manejo integrado de garrapatas que incluyan la rotación de compuestos, el monitoreo sistemático de resistencia y la adopción de métodos alternativos de control (Almazan *et al.*, 2018; de Araújo *et al.*, 2019; Rodríguez-Vivas *et al.*, 2017).

7.2 RESISTENCIA TOXICODINÁMICA

La resistencia toxicodinámica se centra en la interacción que tienen una concentración de agente toxico con su sitio de acción para provocar el efecto toxico esperado (De Rouck *et al.*, 2023; Feyereisen *et al.*, 2015a; Jhala & Knezevic, 2017; Muthu Lakshmi Bavithra *et al.*, 2023; Van Leeuwen *et al.*, 2020; Wang & Stresser, 2022) La insensibilidad toxicocinética involucra cambios en el sitio de acción del acaricida, haciendo que estos sitios de acción tengan menos sensibilidad, (Baron *et al.*, 2015; Feyereisen *et al.*, 2015a; Shakya *et al.*, 2023), otro mecanismo de resistencia toxicodinámico es la sobreproducción de la molécula blanco del acaricida (enzima o proteína puede diluir eficazmente el acaricida en relación con su sitio objetivo, dando lugar a que el acaricida se vuelva menos efectivo (İnak *et al.*, 2024a; Jhala & Knezevic, 2017).

7.2.1 SITIO DE ACCIÓN Y RESISTENCIA A AMIDINAS

Las amidinas, como el amitraz, actúan como agonistas de los receptores de octopamina en el sistema nervioso de los artrópodos. La octopamina, análogo funcional de la adrenalina en vertebrados, participa en procesos esenciales como locomoción, alimentación y regulación motora (Bártíková *et al.*, 2016; Del Pino *et al.*, 2015; Gupta, 2006). Al unirse a estos receptores, el amitraz altera la señalización neuronal, provocando parálisis y muerte en los ectoparásitos. La resistencia a Amitraz en *R. (B.) microplus* ha sido documentada en diferentes regiones del mundo, incluyendo América Latina, y se caracteriza por ser un fenómeno complejo y multifactorial, que involucra principalmente mutaciones en genes que codifican para receptores de octopamina. destacando principalmente los siguientes:

En artrópodos, se reconocen al menos tres clases de receptores de octopamina:

1. Receptores de octopamina de tipo α -adrenérgico (α AOR),
2. Receptores de octopamina de tipo β -adrenérgicos (β AOR).
3. Receptores de octopamina/tiramina (OCT/TYR) (Corley *et al.*, 2012; Evans & Maqueira, 2005; Han *et al.*, 1998; Nagaya *et al.*, 2002; Waldman, Klafke, Tirloni, *et al.*, 2023 Cossio-Bayugar *et al* 2015 y Corley *et al.*, 2013)

El estudio pionero de Baxter & Barker (1999) logró amplificar secuencias de receptores de octopamina en *R. (B.) microplus* utilizando oligonucleótidos degenerados diseñados a partir de secuencias de *Drosophila melanogaster* y *Locusta migratoria*. Desde entonces, se han identificado mutaciones específicas asociadas con resistencia.

Mutaciones asociadas a resistencia

Receptor β -adrenérgico en *R. (B.) microplus*:

- Un SNP no sinónimo (A181T), que sustituye isoleucina por fenilalanina (I61F) en el primer dominio transmembrana, fue identificado en la cepa resistente denominada “Último” frente a susceptibles. Esta isoleucina está altamente conservada entre múltiples especies de invertebrados, reforzando su asociación con la resistencia (Takata *et al.*, 2020)

Mutaciones en el ácaro *Varroa destructor* (paralelo relevante en resistencia a amitraz):

- Y215H en el receptor β 2-octopamina, correlaciona con resistencia en Estados Unidos (Rinkevich *et al.*, 2023) Hernández-Rodríguez *et al.*, 2022)
- Encontraron un polimorfismo en un solo nucleótido (A181T) llevando a una substitución de aminoácidos I61F en Receptor de octopamina tipo β -adrenérgico (β -AL) (OAR) de garrapatas del ganado (*R. (B.) microplus*) resistentes al Amitraz.
- Y337F en el séptimo dominio transmembranal del receptor β -adrenérgico, validada experimentalmente con CRISPR-Cas9, lo que confirió a cepas susceptibles un aumento de resistencia de hasta tres veces (İnak *et al.*, 2024b)

Mutaciones en OCT/TYR en *R. (B.) microplus*:

- Sustituciones T8P (treonina $\rightarrow$ prolina) y L22S (leucina $\rightarrow$ serina) se han asociado con resistencia al amitraz en múltiples regiones: Brasil, Filipinas, India, Zimbabue y Sudáfrica (Alota *et al.*, 2021; de La Canal *et al.*, 2021; Jyoti *et al.*, 2021; Robbertse *et al.*, 2016; Sungirai *et al.*, 2018; Waldman *et al.*, 2023).

Mecanismo adicional propuesto:

- Los receptores de **tiramina** pueden ser afectados por el metabolito del amitraz **BTS-27271**, y se ha reportado que las mutaciones T8P y L22S en estos receptores contribuyen a la resistencia (Gross *et al.*, 2015).

Evidencia funcional

Además de las mutaciones, existen estudios funcionales que demuestran el papel central de los receptores de octopamina y tiramina en la fisiología de *R. (B.) microplus*, (Cossío-Bayúgar *et al.*, 2015) mostraron que ligandos adrenérgicos como octopamina, tiramina y amitraz alteran la contracción del ovario, lo que explica el efecto inhibitorio del amitraz sobre la oviposición. Estos resultados confirman que los receptores de octopamina/tiramina no solo median respuestas neuromusculares, sino que también regulan la reproducción, constituyendo blancos críticos tanto para la acción de acaricidas como para la emergencia de resistencia.

En resumen, la evidencia disponible muestra que la resistencia a amitraz en *R. (B.) microplus* está principalmente vinculada a mutaciones puntuales en receptores de octopamina, que modifican la afinidad por el acaricida y comprometen su eficacia. A esto se suma la validación fisiológica de que estos receptores participan en la contracción ovárica y en la inhibición de la oviposición, como lo demuestran los estudios experimentales con ligandos adrenérgicos. Mutaciones homólogas en *Varroa destructor* refuerzan la convergencia evolutiva de estos mecanismos en distintos ectoparásitos expuestos a amidinas.

7.2.2 RESISTENCIA A CARBAMATOS Y ORGANOFOSFORADOS

Los organofosforados y carbamatos son clases de acaricidas ampliamente utilizadas que actúan inhibiendo la enzima acetilcolinesterasa (AChE), esencial para la transmisión sináptica en el sistema nervioso de los artrópodos. Esta inhibición provoca la acumulación de acetilcolina en la sinapsis provocando espasmos rápidos de los músculos, convulsiones y muerte del insecto. (Anderson & Coats, 2012; Boublik *et al.*, 2002; Cardoso *et al.*, 2020). Debido al modo de acción de inhibición de la AChE, existe resistencia a cruzada entre carbamatos y organofosforados. (Abbas *et al.*, 2014; Agwunobi *et al.*, 2021).

En *R. (B.) microplus* se han descrito al menos tres acetilcolinesterasas (*BmAChE 1*, *BmAChE 2* y *BmAChE 3*). Estas enzimas presentan diferentes propiedades bioquímicas y están presentes en diferentes tejidos, sugiriendo funciones diferenciadas en la fisiología de la garrapata (Cardoso *et al.*, 2020; Cossio-Bayugar *et al.*, 2024; Temeyer *et al.*, 2010, 2013)

La resistencia a organofosforados y carbamatos se ha vinculado principalmente a mutaciones en los genes que codifican la *AChE*, que generan enzimas menos sensible o insensible a la acción del acaricida, preservando su función fisiológica y evitando el efecto tóxico (Cossío-Bayúgar *et al.*, 2021).

- Evidencia inicial en *R. (B.) microplus*: (Hernandez *et al.*, 1999, 2000) amplificaron y secuenciaron cDNA de *AchE* en cepas resistentes sin encontrar mutaciones asociadas a resistencia.

Evidencia sobre isoformas de *AChE* en *R. (B.) microplus*

AChE1

- Mutaciones como S282G y P157S han sido consideradas candidatas a conferir resistencia, con base en análisis de cinética enzimática (Temeyer *et al.*, 2019)

AChE2

- Estudios recientes de Cossio-Bayugar *et al.*, (2024) identificaron sustituciones en aminoácidos clave del sitio activo (H476, G477 y D478) mediante secuenciación y análisis de *docking*.
- Se observó además sobreexpresión de colinesterasas y carboxilesterasas en cepas resistentes frente a susceptibles, sugiriendo un mecanismo combinado de mutaciones y regulación génica.

AChE3

- Temeyer *et al.*, (2006) demostraron, mediante expresión en baculovirus, que *AChE3* es sensible a inhibidores específicos, lo que apoya su papel como blanco molecular de organofosforados y carbamatos en garrapatas resistentes.
- ***AChE3* como blanco relevante:** mediante expresión heteróloga en baculovirus, demostraron la inhibición de la enzima *AChE3* por distintos inhibidores, sugiriendo su papel en la resistencia. No obstante, las mutaciones D131G y F33&S en *AChE1* fueron señalados como candidatos de resistencia por experimentos de cinética enzimática. para resistencia relacionada con resistencia basado en los experimentos de cinética enzimática

Tabla 4.- Mutaciones relacionadas con resistencia a organofosforados en la garrapata *R. (B.) microplus*, tabla recuperada de (Temeyer et al., 2019)

Substituciones de aminoácidos relacionados con resistencia a organofosforados en <i>R. (B.) microplus</i>		
<i>BmAChE1</i>	<i>BmAChE2</i>	<i>BmAChE3</i>
P157S	F9L	154V
D188G	A26T	R86Q
E195G	E75G	1123M
E196G	W114R	1492M
Y230C	L141F	T548A
S282G	K208R	T548Y
V331A	I210V	
T362A	P343S	
F390S	M349V	
L417P	M406V	
Q488R	K555M	
1493T		
N566D		
W571R		
W571F		
P590A		
Las sustituciones son respecto a la secuencia de con identificador del NCBI de: CAA11702	Las sustituciones son respecto a la secuencia de con identificador del NCBI de: AF067771	Las sustituciones son respecto a la secuencia de con identificador del NCBI de: AY267337

Evidencia comparativa en otros ácaros e insectos

En *Drosophila melanogaster* se han descrito múltiples mutaciones en genes de *AChE* asociadas a resistencia; sin embargo, estas no son extrapolables directamente a garrapatas ni a otros ácaros (Feyereisen et al., 2015b). En ácaros tetraníquidos se ha documentado, además de mutaciones puntuales, una regulación positiva de la expresión de *AChE* como mecanismo de resistencia:

- ☐ *Tetranychus evansi* resistentes a clorpirifos (Carvalho et al., 2012).
- ☐ *Tetranychus urticae* resistentes a organofosforados (Kwon et al., 2010)

7.2.3 RESISTENCIA A FIPRONIL

El mecanismo de acción del fipronil consiste en su unión selectiva a los receptores de ácido gamma-aminobutírico (GABA), específicamente a la subunidad $\beta 3$ de los canales de cloro activados por GABA. Esta unión bloquea uno de los principales mecanismos inhibitorios del sistema nervioso central, causando hiper excitación neuronal, manifestándose en temblores, parálisis y finalmente, la muerte de las garrapatas. (Davey *et al.*, 1998; Oliveira *et al.*, 2011; Rosa *et al.*, 2024).

Debido a su mecanismo de acción existen reportes de resistencia cruzada entre fipronil y lindano (Castro Janer *et al.*, 2015).

Mutaciones en el gen *Rdl*

La resistencia a fipronil y a otros ciclodienos se ha asociado a mutaciones en el gen *Rdl* (resistencia a dieldrina), que codifica los canales de cloro activados por GABA. Entre las más relevantes:

- **Haplotipo S:** sustitución Ala286 $\rightarrow$ Ser.
- **Haplotipo L:** sustitución Ala286 $\rightarrow$ Leu.

Estas variantes han sido ampliamente documentadas en insectos del género *Drosophila* (Ffrench-Constant *et al.*, 1993; Le Goff *et al.*, 2005) (y posteriormente también en *R. (B.) microplus* (Castro Janer *et al.*, 2019a; Hope *et al.*, 2010a).

En *R. (B.) microplus* (Hope *et al.*, 2010a) amplificaron fragmentos del gen *Rdl* que flanqueaban la mutación en la posición 302, identificando un cambio en la segunda región transmembrana (TM2) de treonina (hidrófila) a luecina (hidrófobo). Mutaciones equivalentes (A302S, A302G o A302N) se han reportado en diversos insectos resistentes a ciclodienos: *Musca domestica* (Thompson, Steichen, *et al.*, 1993), *Aedes aegypti* (Thompson, Shotkoski, *et al.*, 1993), *Blatella germanica* (Kaku & Matsumura, 1994) , *Bemisia tabaci* y *B. argentifolii* (Anthony *et al.*, 1995) y *Tribolium castaneum* (Andreev *et al.*, 1994).

Validación funcional

El papel funcional de estas mutaciones ha sido analizado experimentalmente. Por ejemplo, (Guest *et al.*, 2019) introdujeron la mutación A301S mediante CRISPR/Cas9 en la polilla de la col (*Plutella xylostella*). Aunque la mutación confirió cierto nivel de resistencia, no alcanzó los niveles observados en cepas de campo, lo que indica que suelen requerirse múltiples eventos genéticos o reguladores para una resistencia establecida.

Evidencia en *R. (B.) microplus*

En poblaciones australianas resistentes a dieldrina, (Castro Janer *et al.*, 2019b) identificaron la mutación T290L en el segundo dominio transmembrana (TM2) del canal de cloruro regulado por GABA, utilizando PCR-RFLP y secuenciación de transcritos. Adicionalmente, se confirmaron los haplotipos S (A286S) y L (A286L) como variantes asociadas a resistencia en poblaciones de campo (Castro Janer *et al.*, 2019a)

Otros mecanismos

Más allá de las mutaciones puntuales, se han descrito mecanismos de resistencia adicional, como duplicaciones del gen *Rdl*. En *Drosophila melanogaster* (Remnant *et al.*, 2013) reportaron que cepas resistentes presentaban copias adicionales del gen, acompañadas de una mayor expresión de los canales de Cl receptores de GABA lo que incrementaba la tolerancia al fipronil.

7.2.4 RESISTENCIA A PIRETROIDES

La resistencia a piretroides en *R. (B.) microplus* en México se documentó inicialmente en la década de 1990, en las cepas Coatzacoalcos (1994, Veracruz), Corrales (1995, Colima) y San Felipe (1995, Tamaulipas), estos hallazgos fueron descritos por He *et al.* (1999), quienes mediante la amplificaron y secuenciación de fragmentos de cDNA correspondientes a los dominios III y dominio IV del canal de sodio dependiente de voltaje (NA_v), identificando substituciones relacionadas con resistencia a piretroides.

Mecanismo principal

El mecanismo predominante de resistencia es la resistencia toxicodinámica, causada por mutaciones puntuales en el gen que codifica para el canal de sodio dependiente de voltaje (NA_v), conocidas como mutaciones *Kdr* (*knockdown resistance*). Estas mutaciones alteran el sitio de unión del piretroide, disminuyendo su afinidad sin afectar la función del canal (Breckenridge *et al.*, 2009; Davies *et al.*, 2008; Soderlund, 2011)

Hasta la fecha, se han identificado al menos seis variantes mutacionales en *R. (B.) microplus* asociadas con resistencia, varias de las cuales son empleadas como biomarcadores de resistencia para el diagnóstico y monitoreo (Cossío-Bayúgar *et al.*, 2020b; He *et al.*, 1999; Kumar *et al.*, 2020; Morgan *et al.*, 2009; O'Reilly *et al.*, 2014; Stone *et al.*, 2014a)

Principales mutaciones asociadas a resistencia

Cinco SNPs han sido confirmados como biomarcadores robustos para la detección y monitoreo de resistencia a acaricidas en el gen *Krd* que codifica para el canal de sodio dependiente de voltaje (R. Kumar *et al.*, 2020):

- Mutación M57T (T170C) (Klafke *et al.*, 2019; Stone *et al.*, 2014b)
- La mutación L64I (C190A) (Castro-Janer *et al.*, 2021; Cossío-Bayúgar *et al.*, 2020b; Jonsson *et al.*, 2010; Klafke *et al.*, 2019; R. Kumar *et al.*, 2013; S. Kumar *et al.*, 2021; Morgan *et al.*, 2009; Nogueira Domingues *et al.*, 2012; Shakya *et al.*, 2023; Vudriko *et al.*, 2018)
- la mutación G72V (G215T) (Jonsson *et al.*, 2010; Klafke *et al.*, 2019)
- La mutación F1550I (T2134A) en el dominio III S6 (Cossío-Bayúgar *et al.*, 2020b; He *et al.*, 1999; Klafke *et al.*, 2019)
- La mutación F1550L (T2134C) (Villar *et al.*, 2020)

Otras mutaciones adicionales reportadas en el gen *Krd* incluyen:

- La mutación C148T (N. E. Stone *et al.*, 2014a)
- La mutación G184C (Cossío-Bayúgar *et al.*, 2020b; Klafke *et al.*, 2019)
- La mutación C189A (N. E. Stone *et al.*, 2014a)
- La mutación C190G (N. E. Stone *et al.*, 2014a)
- La mutación C2130T (N. E. Stone *et al.*, 2014a)

- La mutación C2136A (Klafke *et al.*, 2019).

Evidencia experimental

Klafke *et al.*, (2019) emplearon la técnica qPCR-HRM para analizar cepas resistentes a permetrina, cipermetrina, deltametrina. Este análisis permitió confirmar la presencia de mutaciones T170C, G184C, C190A, G215T, T2134A y C2136A en el gen *Krd* las cuales están vinculadas con el fenotipo de resistencia en *R. (B.) microplus*.

Posteriormente, Cossío-Bayúgar *et al.*, (2020) demostraron experimentalmente que los SNPs G184C, C190A y T2134A confieren resistencia a cipermetrina: en presencia del insecticida, ovarios de garrapatas resistentes mantuvieron actividad contráctil, aunque este diseño no contempló los mecanismos de detoxificación de xenobióticos.

Comparación con otros artrópodos

En mosquitos (*Aedes aegypti*), se ha documentado resistencia asociada no solo a mutaciones puntuales, sino también a mayor número de copias del gen *Kdr* (Martins *et al.*, 2013). En contraste, en *R. (B.) microplus* se ha reportado sobreexpresión de esterasas y citocromo P450 en cepas resistentes a piretroides (Cossío-Bayúgar *et al.*, 2018a), lo que sugiere que la resistencia puede involucrar mecanismos combinados de mutaciones y regulación génica.

7.3 RESISTENCIA TOXICOCINÉTICA

La resistencia toxicocinética se refiere a las modificaciones en los procesos de absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME) de compuestos tóxicos dentro del organismo. Estos cambios pueden reducir la biodisponibilidad efectiva del acaricida en el sitio blanco, disminuyendo su toxicidad (De Rouck *et al.*, 2023; Feyereisen *et al.*, 2015a; Muthu Lakshmi Bavithra *et al.*, 2023; J. Wang & Stresser, 2022).

7.3.1 RESISTENCIA LIGADA A LA ABSORCIÓN

Uno de los primeros niveles de defensa frente a los acaricidas es la barrera física de la cutícula. Alteraciones en esta estructura pueden influir directamente en la tasa de absorción del compuesto, su eficacia y la aparición de resistencia (Balabanidou *et al.*, 2016a; Remedio *et al.*, 2015; Sun *et al.*, 2024).

Una de las estrategias observadas es el engrosamiento de la cutícula o cambios en su composición química, lo que ralentiza la penetración del acaricida hacia al interior del organismo (Balabanidou *et al.*, 2016b, 2018b; Pedrini *et al.*, 2009b). Por ejemplo:

- Lilly *et al.*, 2016 compararon el grosor de la cutícula en cepas susceptibles y resistentes de chinches de cama *Cimex lectularius*, usando microscopía electrónica de barrido. Observaron que las cepas resistentes a piretroides presentaban un engrosamiento significativo de la cutícula. encontrando aumento en las cepas resistentes.
- Huang *et al.*, 2018 estudiaron la expresión del gen *CPLCG5* en mosquitos *Culex pipiens* resistentes a piretroides mediante la técnica de Western blot. Detectaron una expresión 2.2 veces mayor en las cepas resistentes, sugiriendo que este gen contribuye a reforzar la estructura cuticular como mecanismos de resistencia.
- En un estudio transcriptómico reciente, Mavridis *et al.*, 2025 identificaron en *Varroa destructor* resistentes a amitraz y flumetrina la sobreexpresión de cinco genes de proteínas de cutícula: proteína de cutícula (*cuticular Protein*) 14, 21, 63, 65 y la proteína cuticlina 1, con

niveles de expresión LFC 10.22 a 35.75. Esto indica una remodelación activa de la cutícula asociada con la resistencia.

Estas observaciones confirman que la modulación de la cutícula, ya sea estructural o transcripcional, representa un mecanismo efectivo de resistencia toxicocinética al reducir la absorción del acaricida. Este tipo de resistencia puede actuar de manera sinérgica con otros mecanismos (como los metabólicos o toxicodinámicos), dificultando el control químico de las poblaciones resistentes.

7.3.2 METABOLISMO DE XENOBIÓTICOS

La resistencia metabólica representa una de las formas más comunes y complejas de resistencia toxicocinética. Este tipo de resistencia se basa en la capacidad del organismo para metabolizar o inactivar el acaricida antes de que alcance su sitio blanco, principalmente a través de la acción de enzimas detoxificantes como:

- Monoxigenasas del citocromo P450 (CYPs),
- Glutación S-transferasas (GSTs)
- Esterasas (CEs)

La sobreexpresión de estos genes ha sido ampliamente documentada tanto en estudios de laboratorio como en campo, correlacionándose con niveles elevados de resistencia a múltiples clases de acaricidas (Baxter & Barker, 2002; Cossío-Bayúgar *et al.*, 2009, 2024; Miranda-Miranda *et al.*, 1995; Cossío-Bayúgar *et al.*, 2024; Temeyer *et al.*, 2007; Wright & Ahrens, 1988)

Por ejemplo, para citocromo P450 en diversos estudios han reportado la sobreexpresión de genes de la familia *CYP* en cepas resistentes de *R. (B.) microplus*, lo cual permite una mayor capacidad para hidroxilar y detoxificar acaricidas antes de que interactúen con sus blancos moleculares (Jamroz *et al.*, 2000; Singh and Rath, 2014; Gaur *et al.*, 2017; Baffi *et al.*, 2008; Nagar *et al.*, 2016).

7.3.2.1 CITOCROMO P450 (*CYP*)

Las enzimas de la familia de citocromo P450 (*CYP*) desempeñan un papel multifuncional en insectos y ácaros, participando en procesos fisiológicos clave como la síntesis y regulación hormonal, el desarrollo, el metabolismo de lípidos y especialmente, en la detoxificación de compuestos xenobióticos (Bergé *et al.*, 1998; Nelson, 2018; Thomas, 2007; Zhou *et al.*, 2010). La implicación directa de estos genes en mecanismos de resistencia metabólica a acaricidas ha sido ampliamente documentada (Bergé *et al.*, 1998).

En artrópodos, los genes *CYP* se agrupan principalmente en cuatro clanes evolutivos: *CYP2*, *CYP3*, *CYP4* y clan mitocondrial (MITO) (Feyereisen, 2012), aunque análisis filogenéticos recientes han propuesto la existencia de hasta nueve clanes, incluyendo *CYP16*, *CYP20*, *CYP19*, *CYP51* y *CYP53* (Dermauw *et al.*, 2020; Charamis *et al.*, 2025). Estos grupos se asocian con funciones específicas, siendo los clanes *CYP3* y *CYP4* los más implicados en la detoxificación de acaricidas y pesticidas.

Gracias a la reciente secuenciación del genoma de *R. (B.) microplus* (Fadahunsi *et al.*, 2023), se han identificado al menos 20 genes *CYP* correspondientes a estos clanes, reflejando su importancia adaptativa en este ectoparásito (Barrero *et al.*, 2017; Nelson., 2018).

Evidencia experimental en garrapatas y otros ácaros

- En *R. (B.) microplus*, Cossío-Bayúgar *et al.*, (2018b) demostraron la sobreexpresión de genes *CYP* en cepas resistentes mediante RT-qPCR, en conjunto con genes de carboxilesterasa (CE), confirmando su papel coordinado en la detoxificación de piretroides.
- Graham *et al.*, (2016) identificaron y caracterizaron el gen *CYP3006G8*, asociado con resistencia a piretroides, el cual posteriormente fue confirmado por Nagar *et al.*, (2021) como un marcador robusto. Además, estos autores detectaron sobreexpresión del gen *CYP4*, mientras que otros como *CYP319A* y *CYPW1* mostraron represión, evidenciando que la regulación puede ser gen específico.
- En *R. annulatus*, (Ziapour *et al.*, 2017) reportaron un incremento en la actividad bioquímica total de citocromo P450 en cepas resistentes a piretroides.
- En *Tetranychus urticae*, ácaro de importancia agrícola, Jia *et al.*, 2019 identificaron 24 genes *CYP* diferencialmente expresados, con predominancia de los clanes *CYP2*. Los genes *CYP392E10* y *CYP392A16* mostraron una sobreexpresión significativa validada por RT-qPCR, confirmando su participación en la detoxificación.
- En los ácaros *Varroa destructor*, Mavridis *et al.*, (2025) reportaron la sobre expresión del gen *CYP3002B2* en cepas resistentes a amitraz y flumetrina. Este gen mostró actividad catalítica directa in vitro, metabolizando ambos compuestos cuando se expresó en *E. coli*, lo cual representa evidencia funcional concluyente.
- Finalmente, (Yessinou *et al.*, 2018) correlacionaron resistencia en cepas de *R. (B.) microplus* con la sobreexpresión de genes P450, aunque no se identificaron genes específicos.

La familia de genes *CYP* representa un sistema enzimático altamente versátil y adaptativo, cuya participación en la resistencia metabólica ha sido ampliamente demostrada en artrópodos parásitos. La expansión genómica de estos genes y su regulación diferencial frente a compuestos acaricidas posicionan a los *CYPs* como biomarcadores clave en el monitoreo molecular de la resistencia y posibles dianas para el diseño de inhibidores selectivos en estrategias de control integrado.

7.3.2.2 DESHIDROGENASAS DE CADENA CORTA

Las deshidrogenasas de cadena corta (*SDR*, por sus siglas en inglés) constituyen una superfamilia de enzimas oxido reductasas que participan en una amplia gama de procesos metabólicos, incluyendo la detoxificación de xenobióticos. Estas enzimas se han identificado como posibles actores en la resistencia a insecticidas, particularmente en especies con antecedentes de exposición crónica a compuestos como organofosforados, piretroides y DDT.

Estudios recientes han demostrado una regulación positiva significativa de genes *SDR* en poblaciones resistentes de insectos. Por ejemplo, Vijay *et al.*, (2015) utilizaron electroforesis bidimensional (2-DE) y espectrometría de masas MALDI-TOF para analizar el proteoma de

Anopheles stephensi multirresistentes a DDT, deltametrina y malatión. Los autores identificaron un conjunto de proteínas reguladas positivamente en las cepas resistentes, entre las que se destacaron varias deshidrogenasas de cadena corta, lo que sugiere un papel relevante en la metabolización de estos insecticidas o en la neutralización de especies reactivas generadas por ellos.

De forma complementaria, Tchigossou *et al.*, (2018) reportaron una expresión aumentada de genes *SDR* en *Anopheles coluzzii*, resistente a insecticidas, mediante transcriptómica. Estos hallazgos posicionan a las *SDR* como enzimas candidatas clave en los mecanismos de resistencia metabólica, aunque su función específica en garrapatas aún requiere mayor caracterización experimental.

7.3.2.3 ESTERASAS

Las esterasas son un grupo de enzimas que catalizan la hidrólisis de ésteres de carboxilo mediante la unión de una molécula de agua, produciendo un alcohol y un ácido en el proceso, estas incluyen colinesterasas, lipasas y fosfolipidasas (Wheelock *et al.*, 2005).

El rol de las esterasas como papel importante se ha relacionado en estudios bioquímicos (Motoyama *et al.*, 1984), donde con ayuda de técnicas de purificación de proteínas y sustratos específicos, se determinó un efecto de desintoxicación a organofosforados en cepas del saltamontes del arroz verde (*Nephotettix cincticeps*).

7.3.2.4 LIPASAS

En mosquitos se han asociado los genes de *lipasa A*, y la *lipasa A* pancreática triaciglicerol mediante ensayos de RT-PCR en mosquitos *Culex pipiens pallens* resistentes a deltametrina (Hu *et al.*, 2020), en insectos como el gorgojo del maíz *Sitophilus zeamais* se ha observado un incremento en la cantidad de enzimas en cepas resistentes a piretroides, mediante el análisis de pruebas bioquímicas (Hu *et al.*, 2020).

7.3.2.5 CARBOXILESTERASAS

(Grigoraki *et al.*, 2015) mediante un análisis transcriptómico y una confirmación mediante ensayos bioquímicos demostraron la relación entre la resistencia a organofosforados y la sobreexpresión de carboxilesterasas en el mosquito asiático del tigre *Aedes albopictus*, en la mosca doméstica (*Musca domestica*) resistente a permetrina, mediante la medición hidrolítica de sustratos específicos, lograron identificar su actividad catalítica de los piretroides. (X. Feng & Liu, 2020).

7.3.2.6 COLINESTERASAS

La familia de las esterasas la cual contiene las Carboxilesterasas y las colinesterasas las cuales pueden catalizar la hidrólisis de xenobióticos estructuralmente diversas, incluyendo insecticidas, compuestos aromáticos de plantas, feromonas de insectos y hormonas, así como contaminantes ambientales (Cruse *et al.*, 2023)

7.3.2.7 GALACTOSILTRANSFERASA

Las UDP (Uridina Difosfato) glucosiltransferasa, catalizan la conjugación de compuestos lipofílicos endógenos y exógenos con azúcares para producir glucósidos más solubles en agua, y son responsables para la desintoxicación en animales, insectos y plantas (Bock, 2016), en el pulgón del algodón *Aphis gossypii* se comprobó mediante análisis de expresión diferencial y el

uso de ARNs de interferencia la relación del gen de una UDP-glucosiltransferasa *UGT344M2* en cepas resistentes al insecticida spirotetramat (perteneciente a la familia derivada de los ácidos tetrámicos)(Pan *et al.*, 2020), En la mosca domestica (*M. domestica*) resistentes a imidacloprid (Neonicotinoides)mediante un transcriptoma comparativo se encontró la sobreexpresión de la enzima galactosiltransferasa, lo cual sugiere su participación como mecanismo de desintoxicación (Reid *et al.*, 2019), (Grigoraki *et al.*, 2015) mediante transcriptoma, encontraron una alza en la expresión de UDP-glucosiltransferasa en mosquitos tigre asiático (*Aedes albopictus*) resistentes a temefos (organofosforados).

7.3.2.8 ALDEHÍDO DESHIDROGENASAS

Las enzimas Aldehído deshidrogenasa (ALDH) son enzimas que han sido ampliamente estudiadas en mamíferos debido a su potencial para poder oxidar productos secundarios de los piretroides en ácido carboxílico (Lumjuan *et al.*, 2014; Ross *et al.*, 2006).

En el mosquito africano de la malaria *A. gambiae*, resistentes a piretroides mediante un microarreglo, se identificaron diferentes genes relacionados con la resistencia metabólica, entre ellos la enzima aldehído deshidrogenasa (Vontas *et al.*, 2005).

Lumjuan *et al.*, (2014) realizaron la caracterización de aldehído deshidrogenasas presentes en mosquitos de la fiebre amarilla *A. aegypti*, mediante qPCR, y expresión de enzimas recombinantes, encontrando una considerable sobreexpresión en cepas resistentes a permetrina, mientras que las isoformas expresadas de *ALDH* mostraron actividad para catalizar piretroides.

7.3.2.9 SULFOTRANSFERASAS

Las sulfotransferasas son enzimas que catalizan la transferencia de un grupo sulfonato (SO_3) de una molécula donadora 3'-fosfoadenosina-5'-fosfosulfato (PAPS) a una molécula receptora, este proceso se llama sulfonación y hace que las moléculas como drogas y hormonas sean más solubles en agua y fáciles de excretar, estas enzimas tienen un rol importante en el metabolismo, desintoxicación y homeostasis de compuestos tanto endógenos como compuestos exógenos (Chapman *et al.*, 2004; Rojas-Cabeza *et al.*, 2025). En el gorgojo rojo de la harina *Tribolium castaneum* resistentes a deltametrina se relacionó el gen TcSULT1 con la tolerancia a acaricidas (Xu *et al.*, 2021).

7.3.3 EXCRECIÓN DE XENOBIÓTICOS

La excreción activa de compuestos tóxicos representa una de las líneas de defensa más eficientes contra xenobióticos en artrópodos. Esta función es realizada por transportadores de membrana, que actúan como bombas de eflujo, movilizandofármacos, metabolitos y acaricidas fuera del interior celular o entre compartimentos, disminuyendo así su concentración intracelular y mitigando el daño potencial (Pohl *et al.*, 2011). Esta vía juega un papel clave en la resistencia toxicocinética, especialmente frente a acaricidas lipofílicos como la ivermectina o el fipronil.

7.3.3.1 RESISTENCIA MEDIADA POR TRANSPORTADORES ABC

Los transportadores ABC (ATP Binding Cassette) constituyen una superfamilia de proteínas transmembranales ampliamente implicadas en procesos de detoxificación y resistencia a múltiples agentes químicos. Estos transportadores utilizan la energía derivada de la hidrólisis de ATP para expulsar compuestos tóxicos fuera de las células.

Diversos estudios han demostrado su relevancia en el contexto de resistencia a acaricidas:

- Pohl *et al.*, (2011) observaron una correlación significativa entre la resistencia a la ivermectina y la expresión de genes transportadores *ABC* en *R. (B.) microplus*. Además, mostraron que ciertos compuestos pueden interferir con la actividad de estos transportadores, restaurando parcialmente la eficacia de la ivermectina en cepas resistentes.
- Cafarchia *et al.*, (2015) identificaron un patrón similar en *R. sanguineus sensu lato*, donde una alta expresión de genes *ABC* estuvo asociada a resistencia a fipronil, reforzando su papel como vía de detoxificación.
- En un estudio transcriptómico más reciente, Shakya *et al.*, (2023) analizaron perfiles de expresión génica en cepas resistentes a ivermectina de *R. (B.) microplus*, reportando una regulación positiva significativamente elevada del gen *RmABCC2*, mientras que los genes *RmABCC1* y *RmABCB10*, también mostraron regulación al alza, aunque no significativa. Estos hallazgos apuntan a que el gen *RmABCC2* podría ser un marcador molecular clave de resistencia a ivermectina.

7.3.3.2 RESISTENCIA MEDIADA POR SUPERFAMILIA DE FACILITADORES MAYORES

Las proteínas de la superfamilia de facilitadores mayores (MFS, por sus siglas en inglés) son uno de los más grandes grupos de transportadores de membrana y se encuentran en bacterias, arqueas y eucariontes. Estas proteínas median el transporte pasivo o activo secundario de una amplia gama de sustratos, incluyendo azúcares, aminoácidos, fármacos y compuestos tóxicos, utilizando gradientes quimioestáticos o electroquímicos como fuente de energía (Kumawat *et al.*, 2023; Xi *et al.*, 2025).

Aunque tradicionalmente menos estudiadas en el contexto de resistencia a plaguicidas en artrópodos, diversos trabajos recientes sugieren un papel emergente de las MFS en procesos de detoxificación:

- (Chen *et al.*, 2024) realizaron un análisis transcriptómico diferencial en larvas del gusano de la col *Trichoplusia ni*, tratadas con diferentes concentraciones de saponinas derivadas del ácido oleanólico. Encontraron una correlación dosis-dependiente entre el tratamiento y el nivel de transcripción de varios genes pertenecientes a la superfamilia *MFS*, lo cual sugiere que estos transportadores podrían estar involucrados en la exportación o modulación de la toxicidad de dichos compuestos.

Este tipo de evidencia indica que los transportadores MFS podrían representar una ruta complementaria o sinérgica a los transportadores *ABC* en la excreción de xenobióticos, contribuyendo así a la resistencia multifactorial observada en algunas poblaciones de artrópodos. Aunque aún faltan estudios específicos en garrapatas, los datos disponibles abren la puerta a futuras investigaciones sobre el papel de la MFS en la resistencia a acaricidas.

7.3.4 RESPUESTA AL ESTRÉS OXIDATIVO

El estrés oxidativo inducido por la resistencia a insecticidas se ha observado en una gran variedad de organismos, como en la exposición de cipermetrina (Giray *et al.*, 2001), organofosforados (Akhgari *et al.*, 2003; Fortunato *et al.*, 2006) y organoclorados (Hao *et al.*, 2020; Koner *et al.*,

1998), activando diferentes mecanismos para poder contrarrestar estas especies reactivas, como las enzimas superóxido dismutasa, catalasas entre otras.(Hao *et al.*, 2020)

7.3.4.1 SUPER ÓXIDO DISMUTASA

La superóxido dismutasa (SOD) es una enzima antioxidante fundamental en garrapatas e insectos, cuya función principal es la dismutación de radicales superóxidos (O_2^-) en oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno, previniendo así el daño oxidativo a estructuras celulares como lípidos, proteínas y ADN (Marklund, 1985).

En un estudio realizado por (Cossío-Bayúgar *et al.*, 2005), se logró aislar y secuenciar el gen PHGPx (fosfolípido hidroperóxido glutatión peroxidasa) en *R. (B.) microplus*. Esta enzima, aunque distinta de la superóxido dismutasa (SOD), también desempeña un papel clave en la protección celular frente al daño oxidativo. Mientras que la SOD actúa eliminando radicales superóxidos la PHGPx se encarga específicamente de reducir hidroperóxidos lipídicos formados durante la peroxidación de membranas inducida por acaricidas. Por lo tanto, ambas enzimas participan en rutas antioxidantes complementarias, que pueden estar sobre expresadas en cepas resistentes como parte de una estrategia fisiológica de defensa frente a los efectos tóxicos del tratamiento químico. Aunque este mecanismo no detoxifica directamente el compuesto tóxico, sí mitiga sus efectos colaterales, facilitando la tolerancia fisiológica a los tratamientos químicos.

7.3.4.2 CATALASA

La catalasa es una enzima que se encuentra en casi todos los organismos expuestos a la atmósfera, esta descompone el peróxido de hidrógeno (especie reactiva altamente tóxica) en oxígeno y agua y forma parte de uno de los sistemas que tienen los insectos ante el estrés oxidativo (Zhang *et al.*, 2016) y la inducción de esta enzima ha sido reportada como efecto secundario del estrés oxidativo debido a la resistencia en insectos (Champion & Xu, 2018; Nagi & Ingham, 2025).

7.3.4.3 SISTEMA TIORREDOXINA

Son un grupo de proteínas presentes en un gran número de organismos, incluyendo insectos, los cuales tienen como propósito la protección y regulación del estrés oxidativo celular, protegiendo a los organismos de las especies de reactivas de oxígeno (ROS)(Gřešková & Petřivalský, 2024),

7.4 FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN

Los factores de transcripción son proteínas que actúan como interruptores génicos capaces de apagar o desactivar respuestas complejas para cierto tipo de respuestas dentro de los organismos, este es un sistema complejo de maquinaria que a menudo es comparado con los directores de una orquesta debido a varias características: son capaces de coordinar múltiples elementos, son capaces de controlar el tiempo de la expresión de pasos consecutivos y secuenciales, y también es capaz de interpretar el contexto de las señales (Latchman, 1997), el factor de transcripción llamado receptor nuclear de hidrocarburos de arilo translocador es un tipo de factor conocido como reguladores de dimerización y sensor ambiental, que ha sido descrito como un factor esencial que ayuda a la detoxificación de xenobióticos, una vez que se unen los compuestos de arilo a compuestos con afinidad, como hidrocarburos aromáticos policíclicos, una vez que se realiza esta unión, este complejo activa la transcripción de genes que codifican a enzimas relacionadas con la detoxificación de xenobióticos como el citocromo p450 (Ema *et al.*, 1992; Vázquez-Gómez *et al.*, 2016). En ácaros, la araña roja o ácaro rojo *Tetranychus cinnabarinus* se encontró la expresión de receptores de hidrocarburos de arilo en exposición a los acaricidas Fenpropatrin

(piretroide), Ciflumentofen (Benzoilacetonitrilo) y Clorpirifos (organofosforado)(Wen *et al.*, 2025).

8. JUSTIFICACIÓN

Rhipicephalus (Boophilus) microplus representa una de las principales amenazas para la salud del ganado y la economía agropecuaria, particularmente en regiones tropicales y subtropicales. Su capacidad para transmitir hemoparásitos como *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* y *Anaplasma marginale*, lo convierte en un vector de alto riesgo sanitario, además de causar pérdidas directas por infestación, reducción de la ganancia de peso, disminución en la producción láctea y deterioro de la piel de los animales.

El control químico mediante acaricidas ha sido históricamente la estrategia más utilizada; sin embargo, su uso indiscriminado, prolongado y en muchos casos sin diagnóstico previo de resistencia, ha conducido al desarrollo de poblaciones multirresistentes. Actualmente, se han documentado cepas resistentes a diversos grupos incluyendo carbamatos, organofosforados, piretroides, amidinas y fipronil, comprometiendo la eficacia de los tratamientos convencionales y elevando los costos de producción.

Ante este escenario, se vuelve crítico entender los mecanismos moleculares que sustentan esta resistencia múltiple. El estudio de estos mecanismos, particularmente aquellos relacionados con el metabolismo de xenobióticos, la modificación del blanco molecular, la alteración en la absorción y la excreción de compuestos tóxicos ofrece una ventana crítica para:

- Identificar biomarcadores de resistencia útiles en programas de monitoreo.
- Comprender la evolución y dispersión de los mecanismos de resistencia en campo.
- Desarrollar estrategias de manejo integrado más eficaces, sostenibles y basadas en evidencia molecular.

Asimismo, el análisis transcriptómico y genómico de cepas resistentes permite el diseño de nuevas herramientas de diagnóstico molecular, así como la selección informada de tratamientos, contribuyendo a reducir el uso indiscriminado de acaricidas y mitigando el impacto ambiental asociado. En este contexto, esta investigación no solo atiende una necesidad científica y sanitaria urgente, sino que también se alinea con los principios de producción pecuaria sostenible y de salud animal global.

9. HIPÓTESIS

La resistencia múltiple en *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* está asociada con la sobreexpresión diferencial de genes implicados en mecanismos de detoxificación enzimática, transporte de xenobióticos y modificaciones estructurales en proteínas blanco, como canales iónicos y enzimas neuroactivas.

10. OBJETIVOS GENERALES

Analizar de manera comparativa el transcriptoma de cepas susceptibles y multirresistentes de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, con el fin de identificar, caracterizar y clasificar los mecanismos moleculares asociados a la resistencia a múltiples familias de acaricidas.

11. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar los perfiles de expresión génica en cepas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* con diferentes niveles de resistencia a organofosforados, piretroides, amidinas y fenilpirazoles utilizando tecnologías de secuenciación de RNA de alto rendimiento (RNA-Seq).
2. Identificar transcritos diferencialmente expresados (DETs) asociados con los principales mecanismos de resistencia a acaricidas en poblaciones multirresistentes.
3. Clasificar los mecanismos de resistencia detectados según su naturaleza molecular: toxicodinámicos, toxicocinéticos o de penetración reducida.
4. Generar información de base para el desarrollo de pruebas moleculares diagnósticas que permitan la detección temprana y monitoreo de resistencia a múltiples acaricidas.

12. METODOLOGÍA

El material biológico utilizado en este estudio fue proporcionado en colaboración con el Laboratorio de Referencia Regional de la FAO en México para el diagnóstico y monitoreo de resistencia y otros parásitos de importancia veterinaria, ubicado en el Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal (CENAPA-SAGARPA).

12.1 CEPAS DE REFERENCIA (MANTENIMIENTO Y CRÍA DE GARRAPATAS)

Tres cepas de referencia de *R. (B.) microplus*, fueron utilizadas, las cuales fueron cultivadas y mantenidas conforme a la metodología descrita por Ibañez *et al.*, (2021) Las características específicas y el origen de cada cepa se detallan en la Tabla 5.

Durante las etapas no parasitarias de su ciclo de vida (puesta de huevos, oviposición y larvas), las garrapatas se mantuvieron en incubadoras a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ con una humedad relativa del 80 al 90 %. Para las etapas parasitarias, se utilizan larvas de 15 a 50 días de edad para infestar al ganado de la raza Aberdeen Angus.

12.2 PRUEBAS DE BIOENSAYO LPT Y AIT

Para la prueba de paquete de larvas (LPT) se utilizaron larvas de quince días acuerdo con Stone & Haydock., (1962). Para la prueba de inmersión de hembras ingurgitadas (AIT) se utilizaron hembras ingurgitadas de 19 a 20 días post-infestación conforme a lo descrito por Drummond *et al.*, (1976).

Tabla 5.- Cepas de referencia y su perfil de resistencia, Las cepas son mantenidas por el laboratorio de referencia regional de la FAO y monitoreadas bajo condiciones de laboratorio, con bioensayos como paquete larvario e inmersión de adultas. (Ibañez et al., 2021)

Cepa	Resistencia a piretroides	Resistencia a organofosfatos	Resistencia a amidinas	Resistencia a fipronil	Estado de origen
Zacateca	-	-	-	-	Zacatecas
Rancho Nuevo	+	+	+	+	Tamaulipas
Vargas	+	+	+	+	Tamaulipas

Las cepas de garrapatas proporcionadas incluían: la cepa Zacatecas, susceptible a fipronil, la cepa Rancho Nuevo, recolectadas en campo, que presenta un factor de resistencia a fipronil de 12.5; y la cepa Vargas, sometida a presión artificial, con 158 de factor de resistencia.

Tabla 6.-Perfil de resistencia a acaricidas de la cepa resistente Varga, Las cepas son mantenidas por el laboratorio de referencia regional de la FAO y monitoreadas bajo condiciones de laboratorio, con bioensayos como paquete larvario e inmersión de adultas. (Ibañez et al., 2021)

	Cepa	Vargas
	Año	1991
	Lugar de origen	Aldama, Tamaulipas
	Acaricida	Factor de resistencia
organofosfatos	Cumafos	1.95
	Clorfenvinfos	32.77
	Diazinón	40.67
Organoclorados	Lindano	-
Piretroides	Flumetrina	2.62
	Deltametrina	7.20
	Cipermetrina	3.81
Amidinas	Amitraz	49
Fenilpirazoles	Fipronil	8.29

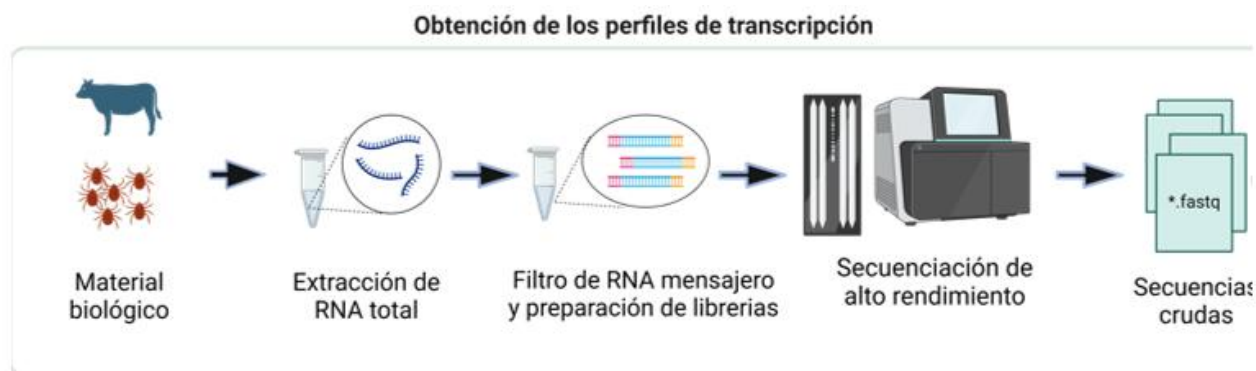


Figura 5.-Diagrama de flujo de los pasos para obtener los perfiles de transcripción a partir del material genético, (gráfico creado con Biorender).



Figura 6.-Fotografía del material biológico obtenido en colaboración con el laboratorio de referencia regional de la FAO para la resistencia a Acaricidas.

12.3 PURIFICACIÓN DE ARN

Se recolectaron larvas recién eclosionadas que sobrevivieron a las pruebas de inmersión de larvas (LPT), seleccionando únicamente individuos viables (Figura 6). Para cada réplica se pesaron 30 ± 1 mg de organismos completos y se transfirieron a viales MagNA Lyser Green Beads (Roche) utilizando puntas de micropipeta libres de ARNasas (Figura 7), la lisis mecánica se realizó con el equipo Magna Lyser (Roche), tras añadir 500 μ l de solución de lisis del kit AllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kit (QIAGEN) y lisando bajo condiciones de 5000 rpm por 15 segundos. El ARN total se extrajo siguiendo las instrucciones del fabricante, lo que permitió la purificación y la estabilidad de los ácidos nucleicos para los análisis moleculares posteriores.



Figura 7.-Fotografía de una de las muestras de larvas viables de Rhipicephalus (Boophilus) microplus emergiendo de la ovoposición por instinto hacia lo alto de los frascos de contención.

El ARN extraído se cuantificó utilizando el espectrofotómetro Nanodrop one (Thermo Fisher Scientific, 2016) , siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para verificar que las muestras cumplieran con la concentración requerida por el laboratorio de secuenciación (UUSMB, 2022), los valores obtenidos en ng/μL se convirtieron a μg/μL utilizando la siguiente fórmula.

$$X \frac{ng}{\mu L} * \frac{1 \mu g/\mu L}{1000 ng/\mu L} = X \frac{\mu g}{\mu L}$$

$$\text{Concentración } (\mu g/\mu L) = \text{Concentración } (ng/\mu L) / 1000$$

Donde “X” es la concentración para convertir.

Y para calcular el volumen final:

$$3 \mu g * \frac{1 \mu L}{X \mu g} = Y \mu L$$

Donde “Y” es el volumen final para 3μg.

12.4 EVALUACIÓN DE LA INTEGRIDAD DEL ARN

La integridad del ARN se evaluó utilizando el equipo Bioanalyzer 2000 (Agilent Technologies, 2013), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para este análisis se usó el kit Agilent RNA 6000 Nano Reagents, con el cual se determinaron los valores de RIN (RNA Integrity Number) de cada muestra como se muestra la Figura 8.

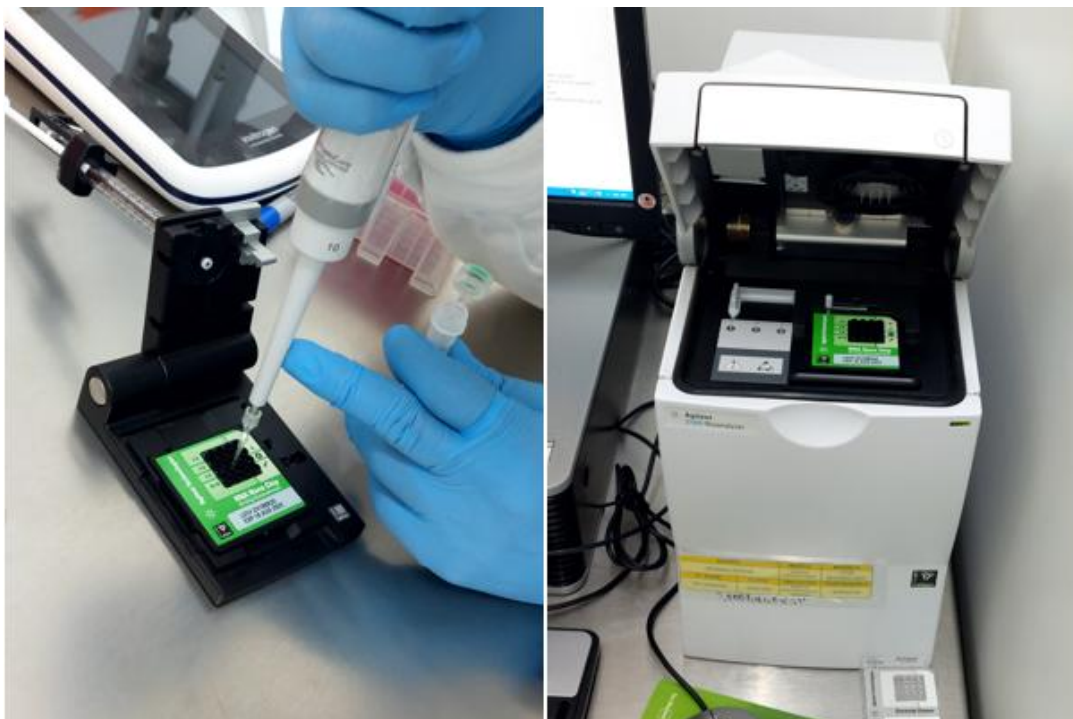


Figura 8.-Fotografía de la electroforesis capilar de los ARN total utilizando el kit de Agilent RNA 6000 Nano Reagents utilizando el equipo Bioanalyzer 2000

La secuenciación de alto rendimiento del transcriptoma se llevó a cabo en colaboración con la Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva y Bioinformática (UUSMB) del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Para ello, se utilizó el sistema NextSeq 550 System (Illumina), empleando el kit TruSeq Stranded mRNA HT para la preparación de las genotecas. La secuenciación se realizó con una configuración de lecturas pareadas (*paired-end*) de 75 pares de bases (pb). Posteriormente, las secuencias obtenidas fueron procesadas mediante un pipeline bioinformático que constó de tres etapas principales: (1) limpieza y control de calidad de las lecturas, (2) ensamble *de novo* del transcriptoma, y (3) evaluación de métricas del ensamblado, como se muestra en la Figura 9.

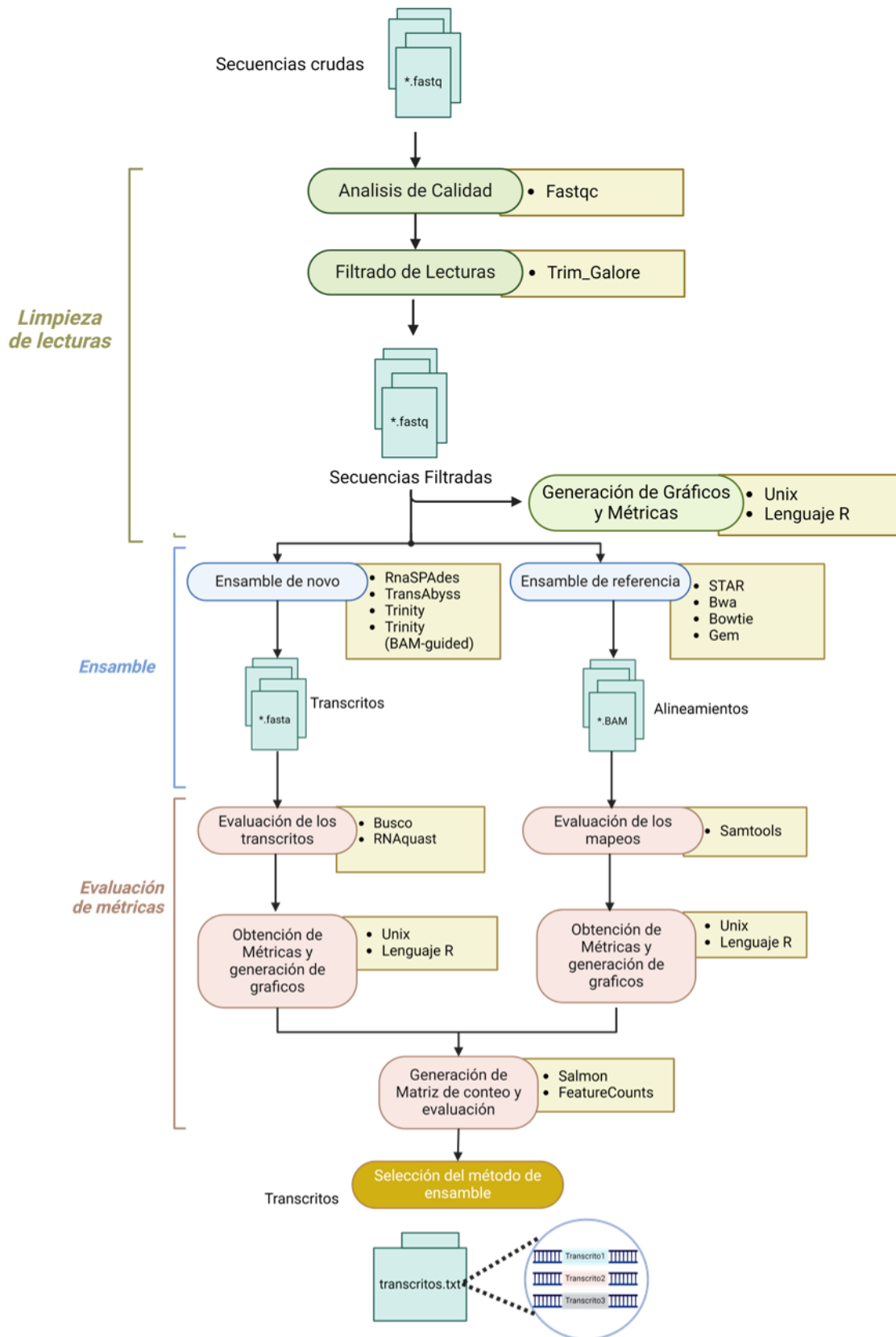


Figura 9.-Diagrama de flujo de los pasos elegidos para evaluar el mejor ensamble para el organismo

12.5 LIMPIEZA DE LECTURAS

Las lecturas generadas fueron sometidas a un filtrado de calidad utilizando los programas FastQC v0.11.9 y Trim_Galore v0.6.7. Se establecieron un umbral mínimo de calidad Phred de 25 y una longitud mínima de 40 pb para conservar las lecturas. Este paso garantizó la eliminación de secuencias de baja calidad y de adaptadores.

12.6 RECONSTRUCCIÓN DE LOS TRANSCRITOS PARA EL ANÁLISIS DIFERENCIAL

Distintas estrategias para el ensamblado de los transcritos fueron utilizadas; estas fueron *de novo* y guiadas por referencia. Para el ensamblado *de novo*, se utilizaron los siguientes programas con su configuración por defecto:

- Trinity-v2.13.2,
- SPAdes Genome Assembler v3.13,
- Trans-ABYSS v2.0.1

Adicionalmente, Trinity fue ejecutado también bajo un enfoque guiado por referencia, utilizando archivos BAM generados a partir del alineamiento de las lecturas contra el genoma de referencia *R. (B.) microplus* (GCA_013339725.1).

Para los ensamblados guiados por referencia, se utilizaron los mapeadores:

- STAR v2.7.10a,
- BWA V0.7.17-r1188,
- Bowtie 2 v2.4.4,
- GEM Mapper v3.0.

12.7 EVALUACIÓN DE MÉTRICAS DE ENSAMBLADO Y ALINEAMIENTO

Para comparar la calidad de los distintos ensamblados y mapeos, se consideraron las siguientes métricas:

Para ensamblados:

- Número de transcritos,
- Tasa de mapeo,
- Número de transcritos >1000 pb,
- Ensamblados erróneos,
- Discordancias por transcrito,
- Tamaño promedio de alineamiento,
- Porcentaje de isoformas >95%
- Tasa de duplicación,
- Tasa de alineamiento
- Contención de bases ambiguas (“N”),
- Genes BUSCO completos y busco faltantes.

Para mapeo:

- Lecturas mapeadas y pareadas, 1
- Lecturas no mapeadas,
- lecturas mapeadas con calidad MQ0,
- Porcentaje de lecturas correctamente pareadas
- Cases mapeadas y tasa de error

- Tamaño promedio del inserto,
- Desviación estándar del tamaño promedio del inserto.
- Porcentaje de duplicidad

Las métricas se obtuvieron utilizando los siguientes programas

- Samtools 1.19.2,
- BUSCO 5.7.1
- RnaQUAST v.2.2.3.

Todos los análisis se realizaron utilizando como referencia el genoma GCA_013339725.1.

12.8 COMPARACIÓN DE MÉTRICAS Y SELECCIÓN DEL MEJOR ENSAMBLADOR

Para comparar las métricas de calidad de los distintos ensamblados, se aplicó la metodología descrita por (Hölzer & Marz, 2019), que permite normalizar cada métrica en una escala de 0 al 1 mediante la fórmula:

$$normalización(m) = \frac{m - \min(m)}{\max(m) - \min(m)} = n$$

Donde “m” representa el valor observado de la métrica y “n” la métrica normalizada. Posteriormente, se calcularon los valores globales para cada ensamblador sumando las métricas normalizadas, lo cual permitió identificar el software con mejor desempeño. Los resultados fueron graficados empleando el lenguaje de programación R 4.3.2 con la paquetería “tidyverse” 2.0.0.

12.9 CUANTIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL

Una vez seleccionado el mejor ensamblador de *novo* y el mejor mapeo guiado por referencias, se procedió a la cuantificación de los transcritos:

- Para ensamblado *de novo*: Salmon v1.4.0
- Para el mapeo guiado por referencia: FeatureCounts v2.0.3

La robustez experimental se evaluó usando el análisis de componentes principales (PCA) empleando las funciones de la librería ggplot v4.0.1, también se usó el análisis de escalamiento multidimensional (MDS) utilizando la librería edgeR v4.0.16 y para los patrones de co-expresión se generó un mapa de calor con la librería “pheatmap” v1.0.12 seleccionando los 1000 transcritos con mayor varianza. El análisis de expresión diferencial se llevó a cabo con el paquete DESeq2 versión 1.42.1 (Love *et al.*, 2014), aplicando un valor ajustado de *p-adj* menor a 0.05 y un umbral de expresión diferencial de $\log_2$ fold change >1 y <1 .

12.10 ANOTACIÓN FUNCIONAL Y FUSIÓN DE DATOS

Los genes diferencialmente fueron anotados con Trinotate v.3.2.2 + galaxy0 mediante la plataforma Galaxy (Grabherr *et al.*, 2011). El porcentaje de genes anotados fue graficado en “R” con “tidyverse”. La integración de los resultados de la expresión y anotación se realizó utilizando herramientas de Unix como “paste”, creando listas consolidadas de genes anotados con sus niveles de expresión diferencial. A partir de estas listas, se elaboraron:

- Diagramas de expresión génica,
- Análisis de varianza (ANOVA)

- Análisis de componentes principales.

12.11 ANÁLISIS DIRIGIDO DE MECANISMOS DE RESISTENCIA

Búsquedas dirigidas mediante el comando “grep” de Unix, se realizaron para identificar los genes codificantes de enzimas previamente asociadas a mecanismos de resistencia (documentados en la literatura). Los genes fueron organizados por subfamilias y graficados usando R 4.3.2 y “tidyverse” 2.0.0.

12.12 ENSAMBLADO DE GENES BLANCO (MOLÉCULAS DIANA)

Las tres réplicas biológicas de cada cepa fueron concatenadas y sus lecturas se mapearon mediante Bwa mem V0.7.17-r1188 contra bases de datos personalizados de proteínas diana, integradas exclusivamente por secuencias de ácaros y garrapatas obtenidas del NCBI (descritas en las Tablas 31-34 del Anexos) Estas bases de datos comprenden:

- Acetilcolinesterasas,
- Canales de cloruro activados por ácido gama butírico (GABA)
- Receptores de octopamina
- Canales de sodio presináptico,

El procesamiento de lecturas mapeadas se realizó con Samtools v1.13, mientras que la recuperación de las secuencias se llevó a cabo mediante seqtk subseq 1.4-r130-dirty. En el caso de los receptores de octopamina y las acetilcolinesterasas se segregaron por subfamilias mediante herramientas de filtrado de texto (grep y awk). Posteriormente, se realizó un ensamblaje *de novo* independiente por subfamilia empleando Trinity-v2.13.2. Finalmente, la predicción de los marcos de lectura abiertos (ORFS) se ejecutó con el software TransDecoder.LongOrfs, seleccionando para análisis posteriores las traducciones peptídicas con una longitud superior a 300 aminoácidos.

12.13 ANÁLISIS DE VARIANTES Y ALINEAMIENTOS MÚLTIPLES

Las secuencias ensambladas se alinearon con referencias específicas utilizando MAFFT v. v7.490. La visualización se realizó con Geneious versión 2025.0.3.

Para los receptores de GABA se utilizaron las secuencias de referencia:

- ACV07675.1
- ACV07674.1
- AAA28556.1 (Hope *et al.*, 2010b)

12.14 FILOGENIA DE ACETILCOLINESTERASAS

Para la clasificar las enzimas AchE (1,2 y 3), se seleccionaron secuencias anotadas y se compararon con secuencias reportadas y tipificadas para saber discriminar entre *AchE1*, *AchE2* y *AchE3*, utilizando las secuencias de *R. (B.) microplus*:

- AchE1: AJ223965.1 y MH037059.1
- AchE2: AJ278343.1 y AF067771.1
- AchE3: KX670385.1 y AY267337.1

Como grupo externo se empleó la secuencia humana de Carboxilesterasa L07765.1

Los alineamientos se realizaron con el software MAFFT v7.490, y los árboles filogenéticos con el software Geneius, usando:

- Modelo de distancia: Jukes-Cantor,

- Método de construcción: Neighbor-Joining,
- Bootstrap: 1003 réplicas con semilla de 454,278

13. RESULTADOS

13.1 EXTRACCIÓN DE ARN

Los resultados de la extracción y de la cuantificación por espectrometría mostraron una variabilidad notable en la concentración de ácidos nucleicos entre diferentes las réplicas y las condiciones como se muestra en la Tabla 7. La mayoría de las muestras exhibieron relaciones de A_{260}/A_{280} cercanas a 1.8-1.9 lo cual indica una baja contaminación por proteínas.

Tabla 7.-Concentración de RNA total extraído del material biológico y cuantificado con el equipo NanoDrop™ 2000.

Cepa	Réplica	Ácido nucleico(ng/μL)	A260/A280	A260/A230
Rancho nuevo	Réplica 1	232.89	1.92	1.99
Rancho nuevo	Réplica 2	158.12	1.86	1.50
Rancho nuevo	Réplica 3	75.19	1.77	0.99
Vargas	Réplica 1	184.23	1.89	1.69
Vargas	Réplica 2	60.69	1.78	1.01
Vargas	Réplica 3	272.12	1.93	2.01
Zacatecas	Réplica 1	61.23	1.78	1.00
Zacatecas	Réplica 2	203.41	1.90	1.68
Zacatecas	Réplica 3	154.62	1.87	1.60

Los valores de pureza obtenidos (A_{260}/A_{280}) se encuentran en el rango aceptable de 1.8 a 2.0, lo que indica una buena calidad del ARN para su uso en análisis posteriores. No obstante, algunos valores de A_{260}/A_{230} estuvieron por debajo del ideal (2.0–2.2), esta disminución se asoció principalmente a muestras con bajos rendimientos de ARN, donde la reducida señal de absorbancia a 260 nm magnifica el impacto del ruido de fondo generado por las tazas residuales de sales caotrópicas provenientes del kit de extracción empleado.

Para proceder con la secuenciación del ARN mensajero, se siguieron los criterios técnicos establecidos por la Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva y Bioinformática (UUSMB) del Instituto de Biotecnología de la UNAM de acuerdo con estas especificaciones se requiere contar con una concentración mínima de 3 μg de ARN total por muestra, con un número de

integridad del ARN (RIN) igual o mayor a 8, lo cual garantiza una secuenciación de alta calidad. (UUSMB, 2022),

13.2 AJUSTE DE CARGA DE ARN TOTAL Y PREPARACIÓN DE ALÍCUOTAS

Para cumplir con los requerimientos de la UUSMB fue necesario ajustar las concentraciones de ARN total extraído para alcanzar una concentración mínima de 3 µg de ARN por muestra, diluido en agua libre de nucleasas. La Tabla 8 muestra los cálculos realizados para determinar el volumen necesario de cada muestra con base en su concentración individual.

Tabla 8.-cálculos de diluciones de ARN total para cumplir con las especificaciones mencionadas mínimas requeridas por la UUSMB para secuenciación por RNA-Seq.

Cepa	Réplica	µg/µL	µL para 3µg
Rancho Nuevo	Réplica 1	0.232892	12.9
Rancho Nuevo	Réplica 2	0.158123	19.0
Rancho Nuevo	Réplica 3	0.075194	39.9
Vargas	Réplica 1	0.184234	16.3
Vargas	Réplica 2	0.06069	49.4
Vargas	Réplica 3	0.272118	11.0
Zacatecas	Réplica 1	0.06123	49.0
Zacatecas	Réplica 2	0.203408	14.7
Zacatecas	Réplica 3	0.15462	19.4

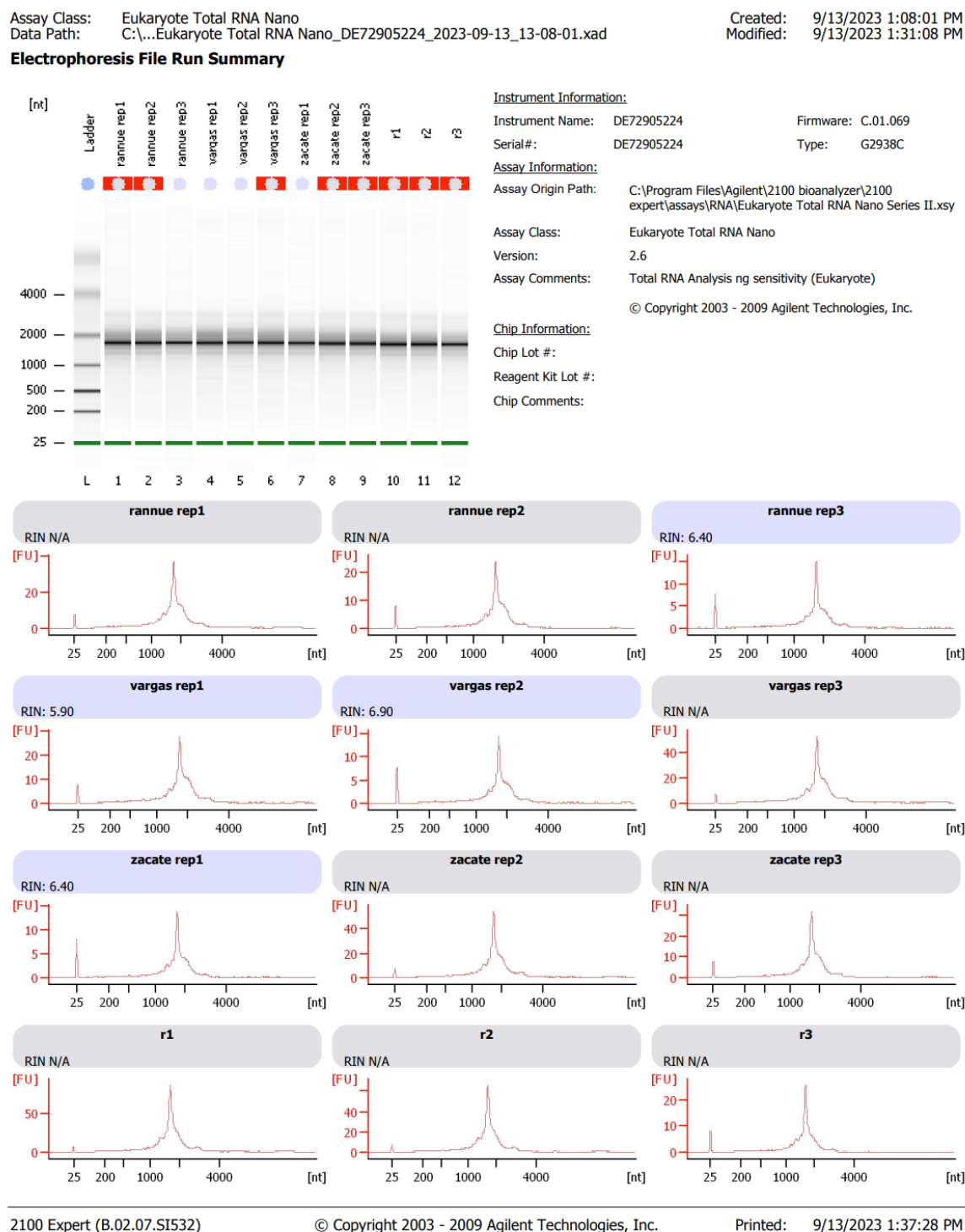
13.3 ANÁLISIS DE LA INTEGRIDAD DEL ARN

Una vez ajustadas las concentraciones, se evaluó la integridad del ARN mediante el sistema Bioanalyzer de Agilent Technologies siguiendo las recomendaciones del fabricante (Agilent Technologies, 2013). Se generaron los valores de RIN (por sus siglas en inglés: RNA Integrity Number) (RIN) para cada muestra, así como los electroferogramas y las simulaciones digitales de geles de electroforesis como se muestran en las Figuras 10 y 11.

Figura 10.- Cálculo del valor del RIN obtenido con el sistema Bioanalyzer (Agilent Technologies), para verificar la calidad e integridad del ARN total extraído.

Assay Class: Eukaryote Total RNA Nano		Created: 9/13/2023 1:08:01 PM
Data Path: C:\...\Eukaryote Total RNA Nano_DE72905224_2023-09-13_13-08-01.xad		Modified: 9/13/2023 1:31:08 PM
Electrophoresis File Run Summary (Chip Summary)		
Sample Name	Sample Comment	Status Result Label Result Color
rannue rep1		✓ RIN N/A
rannue rep2		✓ RIN N/A
rannue rep3		✓ RIN: 6.40
vargas rep1		✓ RIN: 5.90
vargas rep2		✓ RIN: 6.90
vargas rep3		✓ RIN N/A
zacate rep1		✓ RIN: 6.40
zacate rep2		✓ RIN N/A
zacate rep3		✓ RIN N/A
r1		✓ RIN N/A
r2		✓ RIN N/A
r3		✓ RIN N/A
Chip Lot #		Reagent Kit Lot #

Figura 11.-Electroferogramas y simulación digital de Gel de electroforesis obtenido con el sistema Bioanalyzer (Agilent Technologies), para verificar la calidad del ARN total extraído.



Aunque las muestras no cumplieron con los criterios mínimos de integridad requeridos ($RIN \geq 8$) presentaron una calidad electroforética óptima, la imposibilidad de calcular un RIN preciso de debió a la ausencia de la subunidad ribosomal 28S, lo cual generó una subestimación de esta métrica por parte del algoritmo, no obstante, dada la nula evidencia de degradación visible, se determinó proceder con la secuenciación de las muestras.

13.4 RECEPCIÓN Y ORGANIZACIÓN DE ARCHIVOS DE SECUENCIACIÓN

Una vez concluida la secuenciación mediante el sistema NEXTSEQ, se recibieron un total de 72 archivos “fastq.gz”, correspondientes a las lecturas pareadas generadas para cada réplica. Estos archivos fueron concatenados por cepa y réplica biológica, reduciendo el número total a 18 archivos (pares de R1 y R2 por muestra). La Tabla 9 muestra el desglose de los archivos recibidos, con sus respectivos nombres y tamaños

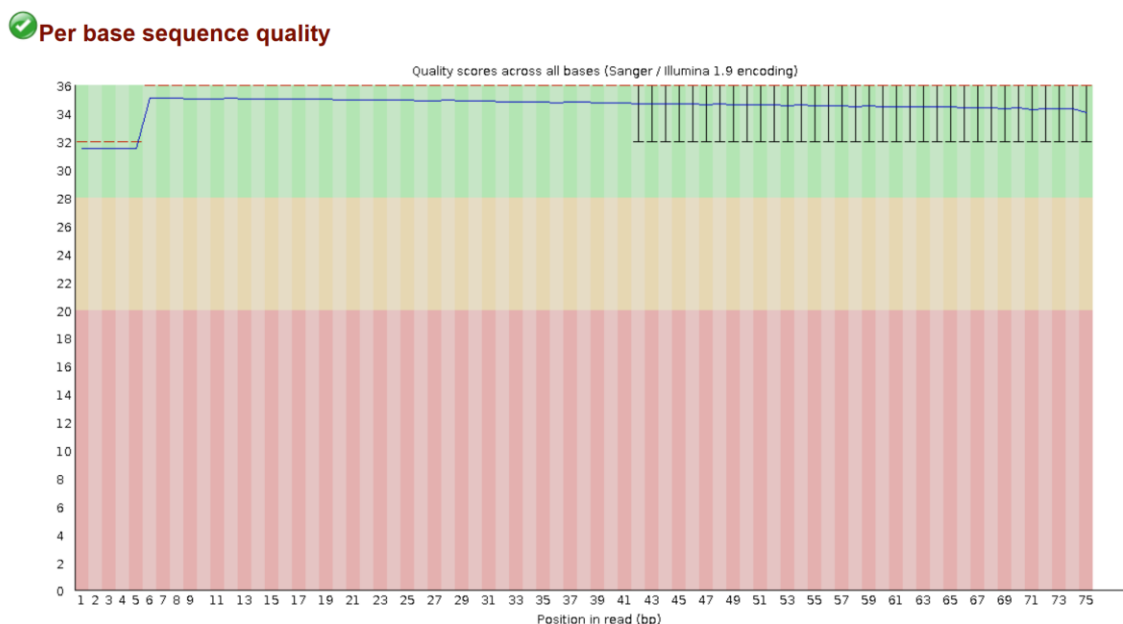
Tabla 9.-Archivos generados por la secuenciación de ARN total, organizados por réplica biológica y cepa.

No. archivo	Nombre del archivo.	Tamaño
1	rannue_r1_S2_L001-4_R1_001.fastq.gz	334M
2	rannue_r1_S2_L001-4_R2_001.fastq.gz	340M
3	rannue_r2_S2_L001-4_R1_001.fastq.gz	188M
4	rannue_r2_S2_L001-4_R2_001.fastq.gz	190M
5	rannue_r3_S16_L001-4_R1_001.fastq.gz	517M
6	rannue_r3_S16_L001-4_R2_001.fastq.gz	523M
7	vargas_r1_S5_L001-4_R1_001.fastq.gz	336M
8	vargas_r1_S5_L001-4_R2_001.fastq.gz	341M
9	vargas_r2_S31_L001-4_R1_001.fastq.gz	271M
10	vargas_r2_S31_L001-4_R2_001.fastq.gz	274M
11	vargas_r3_S26_L001-4_R1_001.fastq.gz	198M
12	vargas_r3_S26_L001-4_R2_001.fastq.gz	201M
13	zacate_r1_S32_L001-4_R1_001.fastq.gz	492M
14	zacate_r1_S32_L001-4_R2_001.fastq.gz	503M
15	zacate_r2_S1_L004_R1_001-4.fastq.gz	540M
16	zacate_r2_S1_L004_R2_001-4.fastq.gz	549M
17	zacate_r3_S24_L001-4_R1_001.fastq.gz	279M
18	zacate_r3_S24_L001-4_R2_001.fastq.gz	284M
Total		6.2G

13.5 EVALUACIÓN DE CALIDAD Y LIMPIEZA DE SECUENCIAS CRUDAS

Se evaluó la calidad general de las secuencias crudas utilizando el software FASTQ v0.11.9, el cual permitió generar reportes visuales de métricas clave, incluyendo distribución de calidad por posición de base como se muestra en la Figura 12, contenido de GC, presencia de adaptadores y duplicación de secuencias.

Figura 12.-Gráfica de calidad generada por FastQC a partir de las secuencias crudas concatenadas. El puntaje de calidad promedio (Phred score) se muestra en la gráfica, a lo largo de la longitud de las lecturas.



Con base en estos análisis, se identificaron regiones con presencia de adaptadores y extremos con caída en calidad, por lo que se procedió a la limpieza de las secuencias mediante el software trimalore (Krueger *et al.*, 2021). Este proceso incluyó:

- Recorte de adaptadores de Illumina.
- Eliminación de bases con calidad inferior a Phred 25.
- Filtrado de secuencias con longitud inferior a 40 pares de bases (pb).

Los resultados del procesamiento se resumen en la Tabla 10, donde se reporta el número total de lecturas por archivo, lecturas con adaptador, bases secuenciadas, bases descartadas y lecturas finales retenidas.

Tabla 10.- Resultados del análisis de limpieza de secuencias con TrimGalore!

No. Archivo	Lecturas Totales	Lecturas con adaptador	Bases secuenciadas	Bases descartadas	Lecturas escritas
1	7,371,268	782,342	549,664,096	2,023,027	7,226,019
2	7,371,268	910,374	549,424,218	10,128,507	7,226,019
3	4,107,828	457,286	306,291,131	1,096,440	3,992,818
4	4,107,828	498,786	306,273,883	8,072,787	3,992,818
5	11,469,261	1,396,799	854,957,822	3,424,467	11,239,179
6	11,469,261	1,402,523	855,050,686	15,728,933	11,239,179
7	7,422,464	823,724	553,374,811	2,312,285	7,199,725
8	7,422,464	919,074	553,217,287	15,286,034	7,199,725
9	5,999,216	644,449	447,326,472	1,578,686	5,886,735
10	5,999,216	762,795	447,140,211	7,724,804	5,886,735
11	4,364,231	473,323	325,397,010	1,372,467	4,251,789
12	4,364,231	537,182	325,282,409	7,639,637	4,251,789
13	10,943,260	1,181,427	816,077,805	2,513,495	10,737,198
14	10,943,260	1,402,107	815,675,215	14,476,367	10,737,198
15	11,985,088	1,252,843	893,767,923	2,849,684	11,731,833
16	11,985,088	1,507,981	893,292,464	17,523,324	11,731,833
17	6,160,348	593,801	459,506,262	1,337,734	6,053,068
18	6,160,348	769,006	459,184,896	7,553,072	6,053,068

En la Figura 12 se muestran los resultados obtenidos de esta limpieza la cantidad total de lecturas con y sin adaptadores observada en cada una de las réplicas biológicas que se analizaron para las tres cepas estudiadas: Rancho Nuevo, Vargas y Zacatecas.

Cada uno de los paneles refleja la proporción de lecturas limpias (sin adaptador) en color azul respecto a aquellas contaminadas (con adaptador) color salmón, tras realizar el pretratamiento correspondiente. En las tres cepas estudiadas, la inmensa mayoría de las lecturas parece corresponder con secuencias limpias (sin adaptador) con porcentajes entre el 86.3 % y el 88.9 % según la réplica y la cepa. Esto implica que la calidad de las librerías es suficientemente adecuada y que la cantidad de lecturas con adaptadores (o residuos de adaptadores) parece ser relativamente baja. Por el contrario, el porcentaje de lecturas con adaptador es homogéneo entre réplica dentro de las cepas, con valores ubicados entre el 11.0 % y el 12.2 %. Este problema de contaminación tiene unas tasas relativamente moderadas, pero se encuentra dentro de los márgenes esperables para librerías de secuenciaciones obtenidas por amplicones o genomas bacterianos, en donde pueden esperarse variaciones según la calidad del trimming.

En términos de comparativa: 1. Rancho Nuevo muestra tasas de contaminación ligeramente más elevadas en Rep2 y Rep3 (11.48 %–12.20 %). Mientras, que la cepa Vargas presenta una media estable entre repeticiones (11.73 %–11.85 %). Finalmente, Zacatecas muestra los niveles de contaminación homogéneos (11.06 %–11.80 %) donde no se aprecian diferencias de distribución entre réplicas.

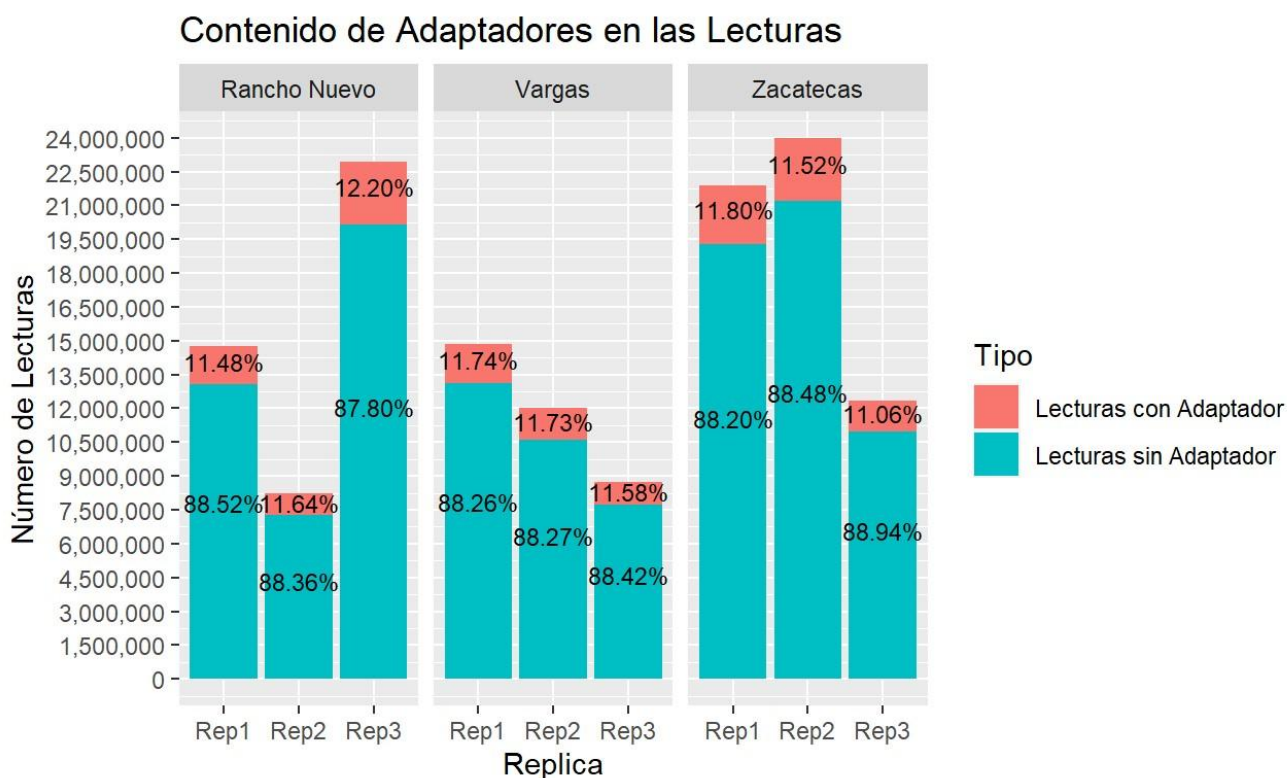


Figura 12.-Gráfico de barras que muestra el número de lecturas con y sin adaptador por réplicas biológicas y cepa.

En la Figura 13 se detalla la composición de la corrida de secuenciación desglosada por cepa (Rancho Nuevo, Vargas, Zacatecas) y por sus respectivas réplicas biológicas. Mediante un gráfico de doble anillo, se observa en el anillo interno presenta la contribución global de cada una de las cepas respecto del total de lecturas obtenidas, mientras que el anillo externo ilustra la distribución porcentual de las lecturas que cada réplica añade a su respectiva cepa.

En el nivel de réplicas, la distribución resulta heterogénea dentro de cada cepa:

- En el caso de Rancho Nuevo, la Réplica 3 fue la más abundante (50.01%); por detrás las Réplicas 1 y 2 fueron responsables de un 32.15 % y 17.84 %, respectivamente.
- Las lecturas de Vargas fueron más o menos equilibradas, de forma que la Réplica 1 fue responsable de un 41.63 %, la Réplica 2 un 33.84 % y la Réplica 3 un 24.53 %.
- Por último, la cepa Zacatecas se fijó en la Réplica 2 como la más abundante (41.17 %), seguida por la Réplica 1 y la Réplica 3 con un 37.63 % y un 21.20 % respectivamente.

Composición de la corrida de secuenciación

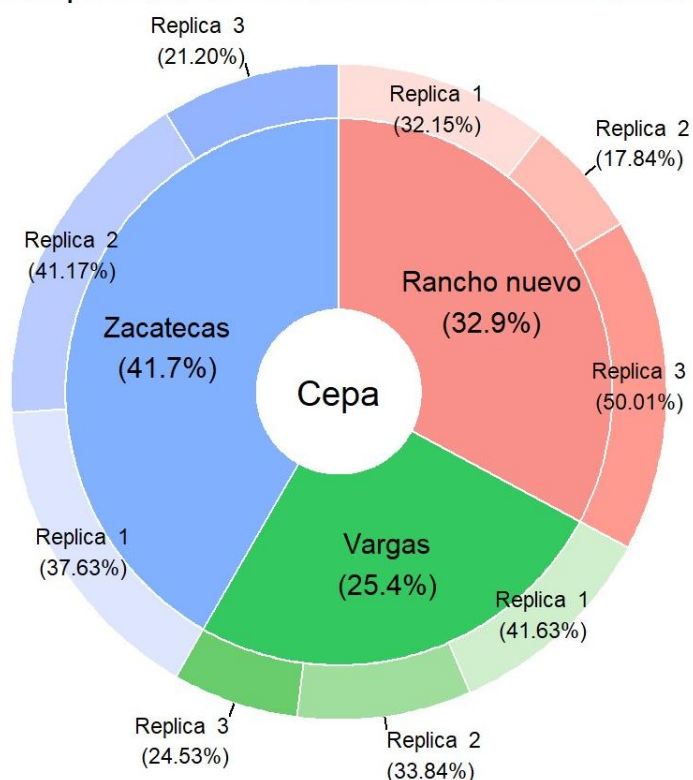


Figura 13.-Gráfico de anillo doble que muestra los porcentajes de la distribución de las lecturas de acuerdo con la cepa y a la réplica biológica obtenida.

Una vez aplicados los filtros de calidad se realizó una gráfica que ilustra el número de lecturas tras pasar los filtros de calidad en cada una de las réplicas biológicas de las tres cepas analizadas (Rancho Nuevo, Vargas y Zacatecas) como se muestra en la Figura 14; donde el gran porcentaje de las lecturas se conservaron tras el filtrado, con valores superiores al 98.60%, en ocasiones superando el 99.18%. Este resultado refleja una buena calidad de la corrida de secuenciación.

Las lecturas que fueron descartadas representan un porcentaje muy pequeño, que va del 0.82% al 1.44% dependiendo de la réplica y la cepa. La menor pérdida se obtuvo en la réplica 3 de Zacatecas (0.82%) y la pérdida más alta en la réplica 1 de Vargas (1.44%). Sin embargo, el porcentaje de lecturas removidas ha resultado bajo, lo que indica que el preprocesamiento de la calidad fue eficiente y que las librerías se secuenciaron con calidad suficiente para ser sometidas al ensamblado y a otros procesos de cuantificación transcriptómica posteriores.

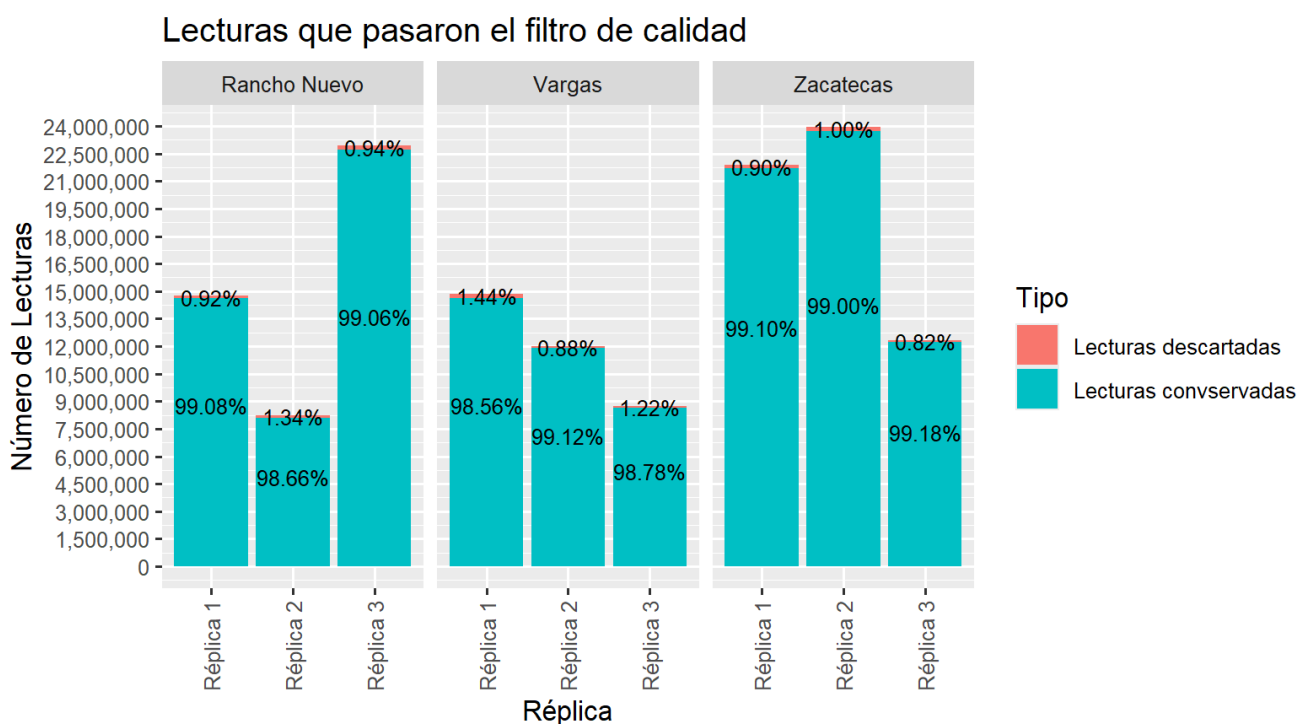


Figura 14.-Gráfica de barras apiladas que muestra el porcentaje de las lecturas que pasaron el filtro de calidad y las lecturas conservadas

La Tabla 11 resume las estadísticas generales del proceso de secuenciación, comparando las métricas antes y después del filtrado.

Tabla 11.- Estadísticas globales de calidad antes y después del filtrado con TrimGalore!

Parámetro	Antes del filtrado	Después del filtrado
Lecturas secuenciadas	139,645,928	138,217,916
Bases secuenciadas	10,410,904,601	10,253,879,911
Tamaño promedio	74.55	74.19
Calidad promedio	34.5516	34.7473

Porcentaje de G+C	50.67%	50.61%
-------------------	--------	--------

Posterior al filtrado de calidad, se visualizó la relación entre las bases y las lecturas conservadas y descartadas en el proceso de filtrado de calidad como se muestra en la Figura 15. El alto porcentaje de conservación observado indica que el algoritmo de filtrado cumplió con su objetivo y que la corrida de secuenciación fue de alta calidad, asegurando la robustez de los análisis posteriores de ensamblaje y cuantificación transcriptómica.

Distribución de bases y de lecturas conservadas durante el filtrado de calidad

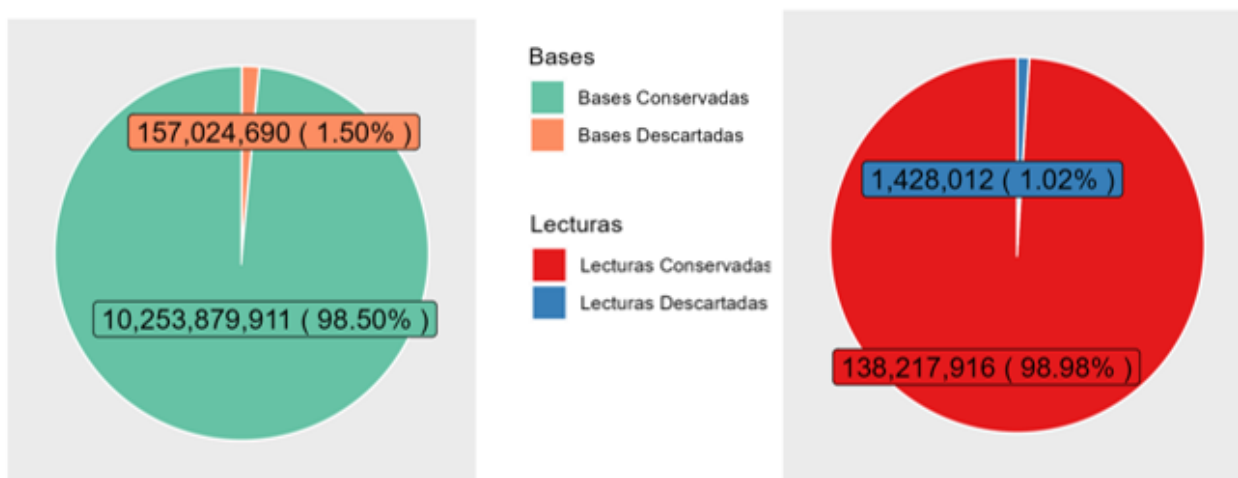


Figura 15.- En la izquierda tenemos el gráfico de pastel que representa la cantidad de bases conservadas y desechadas antes y después de realizar el filtro de calidad, mientras que a la derecha se tiene el gráfico de pastel de las lecturas y bases conservadas y desechadas después de aplicar el filtro de calidad con `trim_galore!`, gráfico realizado con el software `ggplot` y el lenguaje `R`.

13.6 RECONSTRUCCIÓN DE LOS TRANSCRITOS

El ensamblaje transcriptómico *de novo* se realizó utilizando cuatro algoritmos diferentes: Trinity, Trinity Bam-Guided, RnaSPADES y Trans-Abyss, todos con parámetros de defecto. Para comparar el rendimiento de cada ensamblador se utilizaron las BWA-MEM, RnaQuast y BUSCO, las cuales generaron métricas relevantes sobre la calidad de ensamblado. Los resultados de las métricas de los ensambles se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12.- Tabla de resultados de los diferentes ensambles transcriptómico de Novo y de las métricas obtenidas con RnaQuast, bwa-mem y Busco.

Métrica	RnaSPADES	Transabyss	Trinity	Trinity-BG
Transcritos	163,945	402,524	150,065	170,948
Tasa de mapeo	96.8	92.9	95.3	91.7
Transcritos >1000 pb	34590	24999	45740	49302
Ensamblados erróneamente	1001	338	885	180
Discordancias por transcrito	12.634	6.138	16.766	11.324
Tamaño promedio de alineamiento	769.627	368.368	1009.088	871.761
Ensamble de isoformas	2966	2731	2880	2935
Tasa de duplicación	1.6	2.689	2.384	2.73
Tasa de alineamiento	0.838	0.9191	0.8894	0.99
Contenido de "N"	4525	0	0	0
Buscos Completo	2615	2514	2563	2498
Buscos Faltantes	229	319	258	318

Posteriormente, estas métricas fueron normalizadas, con el fin de realizar una comparación estandarizada entre los ensambladores. Los valores de 0 a 1 a cada métrica fueron asignados para evaluar el rendimiento, siendo 1 el mejor desempeño relativo para cada categoría, y el valor de 0 el de peor rendimiento, en dicha categoría. Los resultados se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13.-Métricas de calidad del ensamblado para su comparación y selección del mejor software.

Métrica.	RnaSPAdes	Trans-ABYSS	Trinity	Trinity-BG
Transcritos	0.05	1.00	0.00	0.08
Tasa de mapeo	1.00	0.24	0.71	0.00
Transcritos >1000 pb	0.39	0.00	0.85	1.00
Ensamblados erróneamente	0.00	0.81	0.14	1.00
Discordancias por transcrito	0.39	1.00	0.00	0.51
Tamaño promedio de alineamiento	0.63	0.00	1.00	0.79
95-Ensamble de isoformas	1.00	0.00	0.63	0.87
Tasa de duplicación	0.00	0.96	0.69	1.00
Tasa de alineamiento	0.00	0.50	0.31	1.00
Contenido de "N"	0.00	1.00	1.00	1.00
Buscos Completo	1.00	0.14	0.56	0.00

Buscos Faltantes	1.00	0.00	0.68	0.01
-------------------------	------	------	------	------

Con el objetivo de visualizar los datos, se generó un mapa de calor (Figura 16) con base en los resultados obtenidos de rendimiento donde se visualizan los puntajes normalizados por métrica y la calificación global de cada ensamblador con base en la suma de todos los valores. En este mapa, los valores más altos son los que se encuentran en los tonos amarillos, estos son representativos de un mejor rendimiento relativo por métrica y los números más bajos son los que se encuentran en los tonos rojos, estos son representativos de un peor rendimiento.

El patrón más general muestra diferencias claras entre los programas; en términos generales, Trinity-BG es el que presenta el mejor rendimiento, en especial en las métricas más importantes, tales como el número de transcritos largos, la tasa de alineamiento, el ensamblaje correcto, el ensamblaje de isoformas, lo que se observa incluso en su calificación final, que es la más alta del conjunto, 7.2. Trinity también presenta un rendimiento competitivo, pero algo más inferior, concretamente en tamaño medio de alineamiento, tasa de duplicación y consistencia en el ensamblaje, alcanzando una calificación de 6.5.

Por el contrario, Trans-ABYSS y RnaSPAdes obtienen puntuaciones más bajas en especial las métricas que tienen que ver con la integridad del ensamblaje, el número de transcritos completos y la precisión en la reconstrucción de isoformas, lo que acaba reflejándose en las calificaciones finales de 5.6 y 5.4, respectivamente.

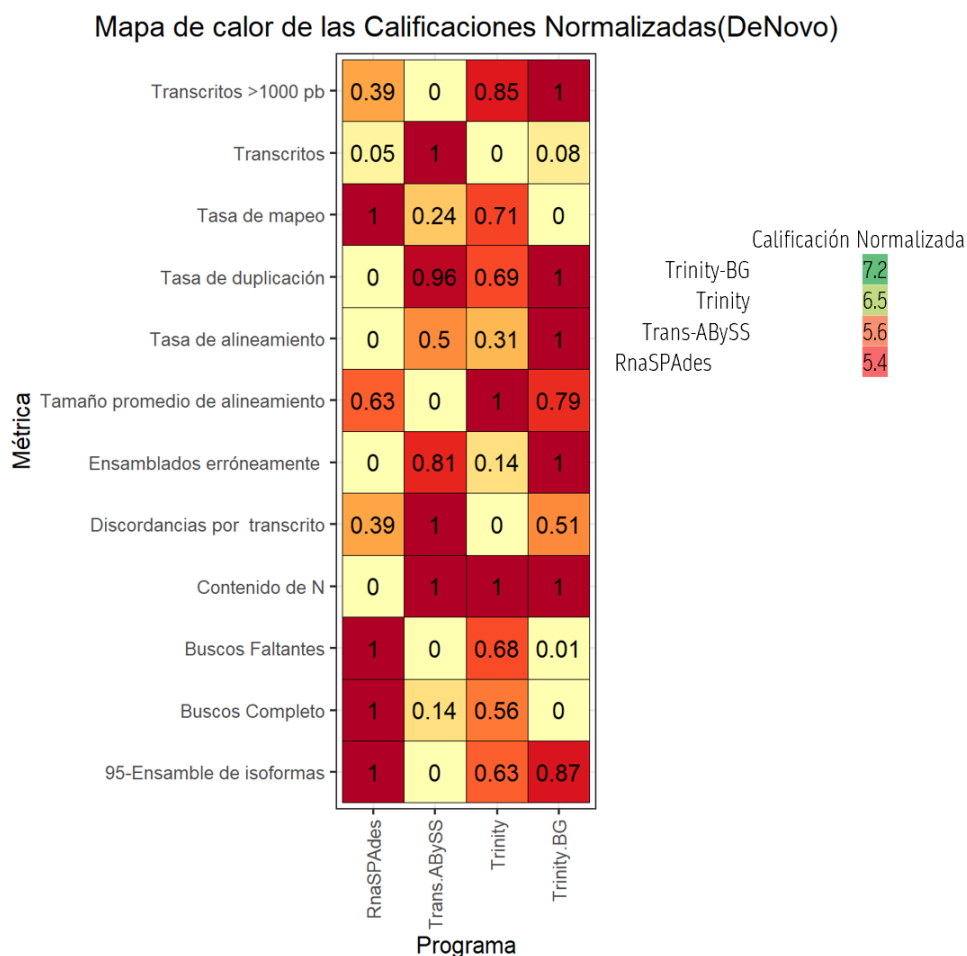


Figura 16.- Mapa de calor generado a partir de las métricas normalizadas para su comparación, del lado derecho se observa la sumatoria de las métricas normalizadas como la calificación normalizada.

13.7 EVALUACIÓN DE MAPEOS CONTRA EL GENOMA DE REFERENCIA.

Para evaluar el desempeño de los diferentes algoritmos de mapeo, se utilizaron los programas STAR, BWA-MEM, Bowtie2 y GEM-mapper. La Tabla 14 muestra los resultados obtenidos con Samtools.

Tabla 14.-Resultados obtenidos con Samtools tras el mapeo de lecturas de RNA-seq al genoma de referencia mediante distintos algoritmos.

Métrica	STAR	Bwa-mem	Bowtie2	gem_mapper
Lecturas mapeadas	124,326,445	130,145,692	108,464,541	126,490,795

Lecturas mapeadas y pareadas		124,326,410	129,202,156	95,554,186	122,831,804
Lecturas mapeadas no		12,310,283	6,491,036	28,172,187	10,145,933
Lecturas correctamente pareadas		124,326,410	103,289,872	83,416,374	118,203,366
Lecturas con MQ0		864,966	5,849,015	3,356,346	7,643,763
Bases mapeadas		9,230,683,969	9,660,769,284	8,050,694,191	9,390,742,716
Discordancias		0	151,296,426	178,275,693	202,981,351
Tasa de error		0.00E+00	1.63E-02	2.21E-02	2.25E-02
Porcentaje de lecturas correctamente pareadas		91	75.6	61	86.5
Tamaño promedio del inserto		1372.8	915.7	582.7	665.6
Desviación estándar del tamaño promedio del inserto		2345.2	1935.6	1474.2	1438.9

Para facilitar la comparación entre herramientas, se normalizaron las métricas en una escala relativa de 0 a 1, donde 1 representa el mejor valor observado por parámetro entre los algoritmos evaluados. La Tabla 15 resume estos resultados normalizados.

Tabla 15.-Normalización de las métricas de calidad de mapeo para la comparación entre herramientas.

Métrica	STAR	Bwa	Bowtie2	Gem_mapper
Lecturas mapeadas	0.73	1.00	0.00	0.83
Lecturas mapeadas y pareadas	0.86	1.00	0.00	0.81

Lecturas no mapeadas	0.27	0.00	1.00	0.17
Lecturas correctamente pareadas	1.00	0.49	0.00	0.85
Lecturas con MQ0	1.00	0.26	0.63	0.00
Bases mapeadas	0.73	1.00	0.00	0.83
Discordancias	1.00	0.25	0.12	0.00
Tasa de error	1.00	0.27	0.02	0.00
Porcentaje de lecturas correctamente pareadas	1.00	0.49	0.00	0.85
Tamaño promedio del inserto	1.00	0.42	0.00	0.10
Desviación estándar del tamaño promedio del inserto	1.00	0.55	0.04	0.00

En la Figura 17, se presenta un mapa de calor que representa las métricas de rendimiento obtenidas con los cuatro programas evaluados (Bowtie2, BWA-MEM, GEM-mapper y STAR) durante el mapeo de lecturas. Cada celda representa la puntuación normalizada de cada métrica en cada uno de los programas siendo las puntuaciones altas (tonos amarillos) las que mejor rendimiento reflejan y las bajas (tonos rojos) el peor rendimiento.

Mapa de calor de las Calificaciones Normalizadas(Mapeo)

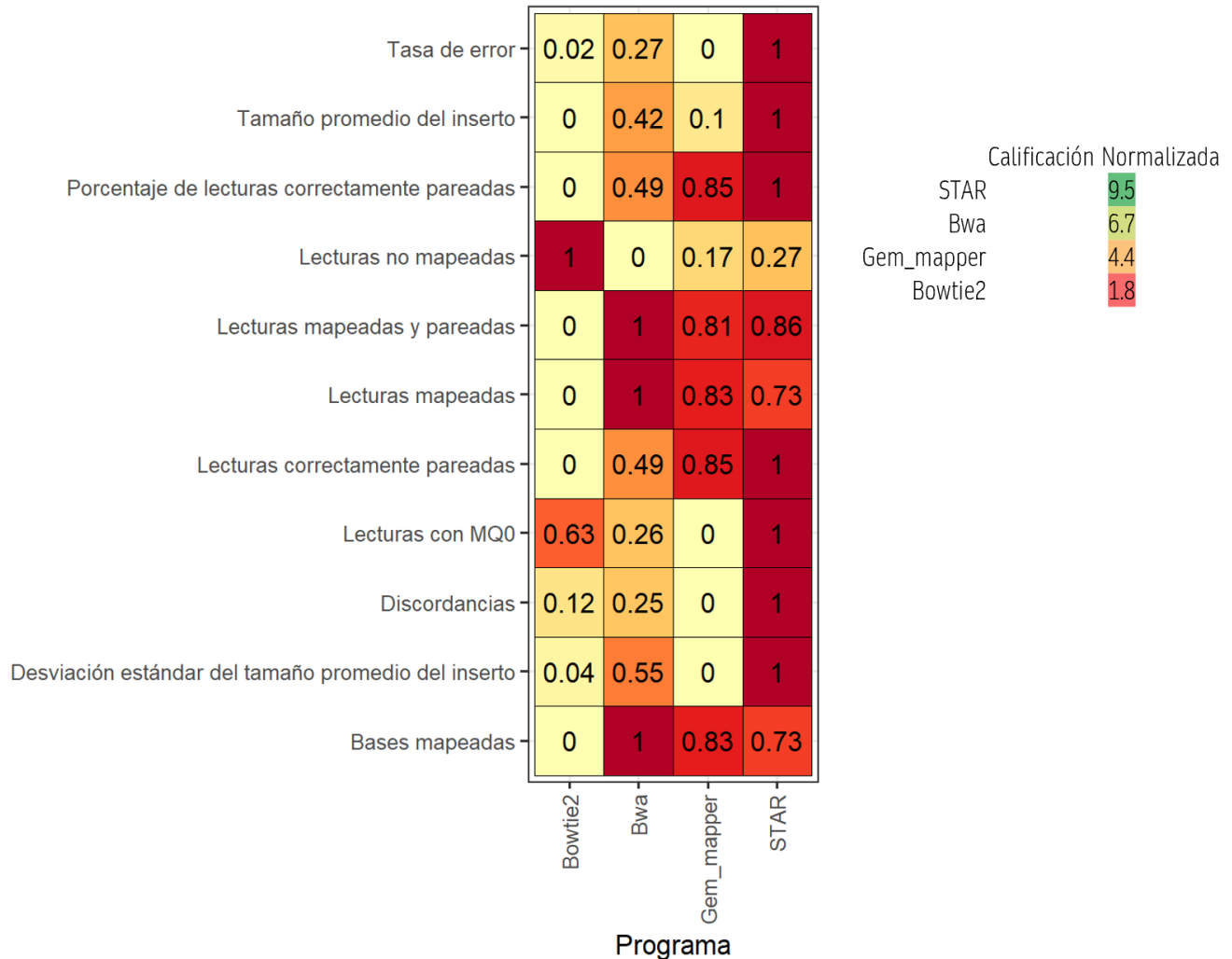


Figura 17.- Mapa de calor de las métricas de mapeo normalizada, a la derecha se observa una tabla con los valores de la calificación normalizada de dichos parámetros por cada software.

Como se puede observar, el patrón es claro y consistente entre algoritmos. STAR destaca en la mayoría de las métricas, con un trabajo de mapeo de lecturas que presenta porcentajes muy altos en lecturas correctamente pareadas, lecturas mapeadas, bases mapeadas y baja tasa de error, algo que da cuenta de su puntuación global más alta (9.5). BWA-MEM se mostró como un programa con un rendimiento intermedio, donde llegó a sobresalir en métricas como lecturas correctamente pareadas y bases mapeadas, logrando así una puntuación total de 6.7.

Por otro lado, GEM-mapper mostró un rendimiento limitado al tener valores normalizados moderados en algunas métricas, pero muy inferiores en otras, lo que se tradujo en una puntuación global de 4.4. Finalmente, Bowtie2 mostró los valores más bajos en la mayoría de los parámetros evaluados, mostrando buenos resultados solamente en la tasa de error, algo que lo sitúa como el mapeador con peor rendimiento global (puntuación total de 1.8).

13.8 CUANTIFICACIÓN DE TRANSCRITOS

Posteriormente, la cuantificación de transcritos se realizó mediante el uso de dos estrategias la primera Salmon, mediante el ensamblaje *de novo* producido con Trinity-BG, y la segunda *FeatureCounts*, usando las lecturas alineadas a partir del genoma de referencia mediante STAR.

En la Tabla 16 presenta los porcentajes de asignación obtenidos para cada réplica y cepa. En todos los casos, Salmon presentó unos valores mucho más altos, de un 91 % como mínimo y alcanzando cifras hasta del 93,7 % de tasas de asignación, lo que reflejaba la alta eficiencia de recuperación de las lecturas por parte del ensamblaje *de novo*. Por otro lado, los porcentajes de asignación obtenidos mediante *FeatureCounts* fueron mucho menores, con porcentajes que variaron entre un 24.5 % y un 38.2 %, lo que es coherente con la escasez de anotaciones completas disponibles para *R. (B.) microplus* y la ausencia de un genoma de referencia totalmente curado para esta especie.

Tabla 16.- Porcentaje de lecturas asignadas por cepa y réplica utilizando Salmon (ensamble *de novo*) y *FeatureCounts* (mapeo a referencia).

Cepa	Réplica	Asignadas STAR (FeatureCount)	Asignadas (Trinity/Salmon)
Rancho Nuevo	Réplica 1	33.4	93.23
Rancho Nuevo	Réplica 2	26.1	92.6
Rancho Nuevo	Réplica 3	24.5	91.8
Vargas	Réplica 1	29.7	92.1
Vargas	Réplica 2	32.5	93.1
Vargas	Réplica 3	31	92.4
Zacatecas	Réplica 1	33.6	92.8
Zacatecas	Réplica 2	31.9	91.8
Zacatecas	Réplica 3	38.2	93.7

De manera ilustrativa en la Figura 18 se resume la clara diferencia entre metodologías, mostrando de forma comparativa las proporciones que obtiene la asignación transcriptómica para cada réplica con *STAR/FeatureCounts* y con *Trinity/Salmon*. El contraste entre un tipo de aproximación y el otro, por lo tanto, el ensamblaje *de novo* es el que mejor refleja la diversidad transcriptómica presente en las muestras, mientras que el enfoque de mapeo tiene una gran dependencia de la calidad y de la completitud del genoma de la referencia que se haya utilizado. Esta constatación da sentido a la elección de Salmon + Trinity-BG como la estrategia elegida para la cuantificación final de las lecturas que se utilizará en los análisis posteriores.

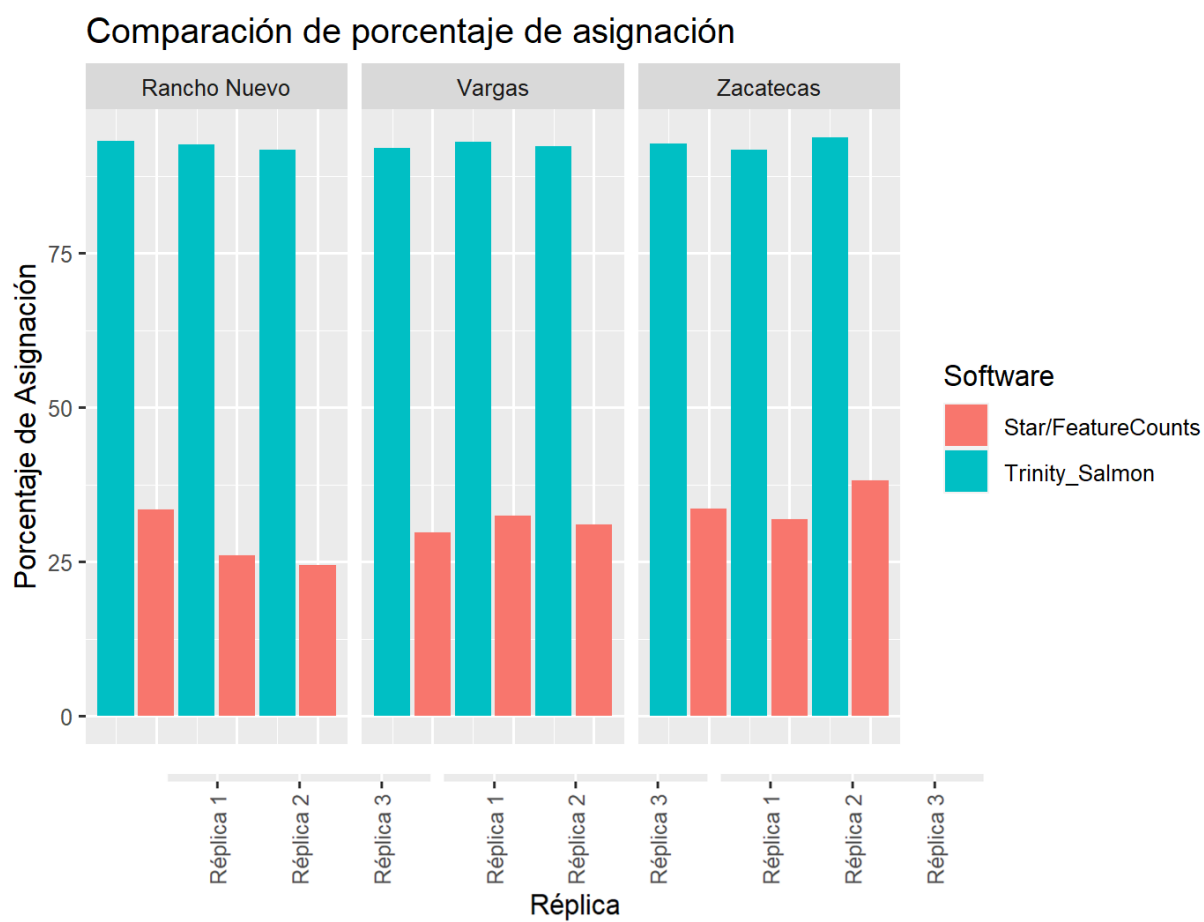


Figura 18.- Gráfico comparativo de los resultados de los porcentajes de Asignación de las cuentas transcriptómicas para los softwares STAR/FeatureCounts y Trinity/Salmon.

13.9 ANOTACIÓN FUNCIONAL

La anotación funcional se llevó a cabo con Trinotate, lo que permitió conocer el número de genes e isoformas con asignación biológica por comparación de cepas. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 17 y se representan de manera visual a través de la Figura 19. En el caso de los genes, la anotación variaba entre el 73.6% y el 84.7%, siendo la comparación con mayor grado de asignación Rancho Nuevo vs. Vargas (2,852 genes anotados frente a 515 no anotados). Las comparaciones Rancho Nuevo vs. Zacatecas y Vargas vs. Zacatecas presentaron porcentajes un poco más bajos (entre un 24.5% y un 26.3% de genes no asignados), algo esperable para organismos no modelo.

Respecto a las isoformas, el comportamiento era algo similar: entre un 59.3% y un 61.1% fueron anotadas funcionalmente y el porcentaje de isoformas que no coincidía con ninguna base de datos fue de un 38%–40%, lo que refleja isoformas novedosas, fragmentos parciales o transcritos altamente divergentes. La comparación con mayor número de isoformas anotadas fue Rancho Nuevo vs. Zacatecas (8,005 isoformas anotadas) y la comparación con la mayor proporción de isoformas no asignadas fue Vargas vs. Zacatecas (5,761; 40.64%).

Tabla 17.-Datos obtenidos de la asignación de genes y transcritos contra las diferentes bases de datos del pipeline Trinotate.

Cepa	Isoformas/Gen	No Asignado	Asignado
Rancho Nuevo vs Vargas	Genes	2,852	515
Rancho Nuevo vs Zacatecas	Genes	4,556	1,630
Vargas vs Zacatecas	Genes	3,966	1,287
Rancho Nuevo vs Vargas	Isoformas	6,700	4,263
Rancho Nuevo vs Zacatecas	Isoformas	8,005	5,305
Vargas vs Zacatecas	Isoformas	8,414	5,761

La Figura 19 muestra las proporciones de los transcritos anotados, a partir de gráficos de barras apiladas, lo que permite visualizar con facilidad las diferencias entre comparaciones tanto a nivel de genes como de isoformas. En general, los resultados indican que, si bien una parte relevante de los transcritos pudo ser anotada, existe un porcentaje relevante de genes e isoformas que no dispone de información funcional, lo cual es característico de transcriptomas *de novo* en organismos no modelo como *R. (B.) microplus*. Este grupo de transcritos no anotados representa un recurso interesante para estudios futuros de caracterización funcional y de nueva identificación de genes relacionados con la resistencia a acaricidas.

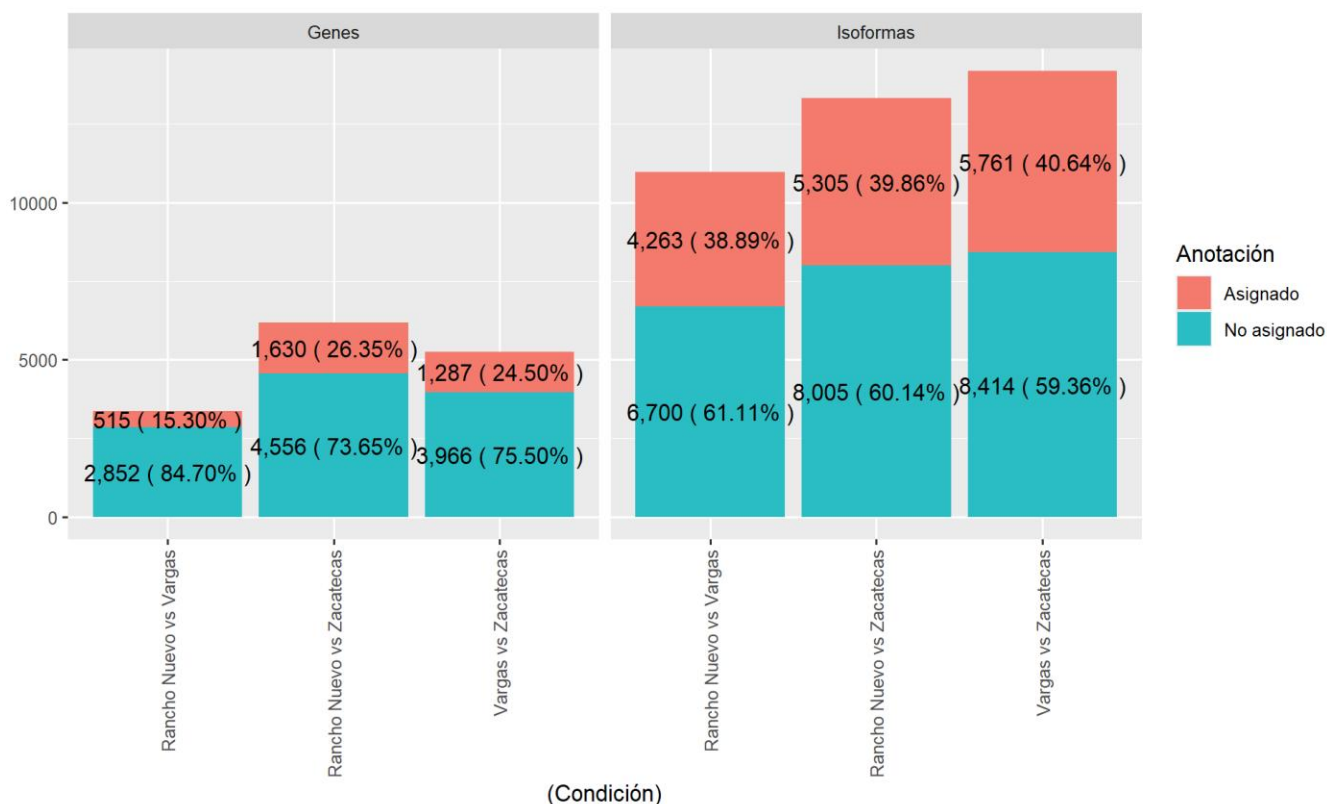


Figura 19.-Gráfico de barras con porcentajes de los transcritos que pudieron ser anotados con el software Trinotate.

13.10 ENSAMBLES DIRIGIDOS PARA MOLÉCULAS DIANA DE ACARICIDAS

Los transcritos correspondientes a: *acetilcolinesterasas* (*AchE1*, *AchE2*, *AchE3*), *canales de cloro GABA*, *canales de sodio voltaje-dependientes*, *receptores beta adrenérgicos de octopamina* y *receptores de octopamina/tiramina* fueron identificados y los resultados se resumen en la Tabla 18, donde se incluyen el tamaño del transcrito ensamblado, la cantidad de lecturas usadas y la profundidad de cobertura para cada isoforma identificada en las distintas cepas.

En la Tabla 18 se muestran los resultados de la identificación de los principales genes que son diana de acaricidas. Los genes *AChE1* y *AChE2* fueron ensamblados, exitosamente, en las tres cepas, con múltiples isoformas y con coberturas moderadas ($51 < x < 79$), sin embargo, el *AChE3* no pudo ser ensamblado debido a la falta de expresión de estos.

El GABA presentó transcritos completos en todas las cepas, aunque su expresión mostró coberturas muy altas en Rancho Nuevo, indicando, por tanto, una mayor abundancia relativa. El canal de sodio voltaje-dependiente y el receptor de octopamina/tiramina no pudieron ser ensamblados en ninguna de las cepas analizadas, lo que sugiere que su expresión es muy baja o que no se detectaron transcritos *de novo*.

Los receptores β -adrenérgicos de octopamina fueron ensamblados en las tres cepas, con coberturas variables, aunque suficientes para su análisis. En general, los resultados indican que algunas de las moléculas diana obtenidas presentan transcritos completos y expresados, mientras que otras muestran, por el contrario, expresiones muy bajas como para ser recuperadas mediante ensamblaje *de novo*.

Tabla 18.- Resultados obtenidos del ensamble dirigido de transcritos relacionados con resistencia a acaricidas (diana), por cepa.

Gene/Mecanismo de resistencia	Cepa	ID de transcrito identificado	Tamaño (pb)	Lecturas	Profundidad (x)
<i>AchE1</i>	Rancho Nuevo	TRINITY_DN12_c0_g1_i1	1976	266	10.14
		TRINITY_DN12_c0_g1_i13	1247	235	14.30
		TRINITY_DN12_c0_g1_i12	821	143	14.01
		TRINITY_DN12_c0_g1_i14	1976	296	11.39
		TRINITY_DN12_c0_g1_i16	1976	350	13.47
	Zacatecas	TRINITY_DN2_c0_g1_i1	1512	196	9.83
		TRINITY_DN2_c0_g1_i10	666	65	7.23
		TRINITY_DN2_c0_g1_i11	1357	143	7.89
		TRINITY_DN2_c0_g1_i12	1771	245	10.46
		TRINITY_DN2_c0_g1_i13	1828	317	12.87
		TRINITY_DN2_c0_g1_i3	1964	407	15.85
	Vargas	TRINITY_DN11_c0_g2_i1	1785	348	14.39
		TRINITY_DN11_c0_g2_i3	1830	310	12.54
		TRINITY_DN11_c0_g2_i4	1308	257	14.49
<i>AchE2</i>	Rancho Nuevo	TRINITY_DN15_c0_g1_i2	2611	586	17.26
		TRINITY_DN15_c0_g1_i3	2611	725	20.82
	Zacatecas	TRINITY_DN15_c0_g1_i3	2307	456	14.17
		TRINITY_DN15_c0_g1_i6	1281	110	6.39
	Vargas	TRINITY_DN13_c0_g1_i2	2290	508	16.41
		TRINITY_DN13_c0_g1_i3	2290	408	13.45
<i>AchE3</i>	Rancho Nuevo	N/A	N/A	49	N/A
	Zacatecas	N/A	N/A	8	N/A
	Vargas	N/A	N/A	64	N/A
Canal de cloruro activado por ácido Gama butírico	Rancho Nuevo	TRINITY_DN5_c0_g1_i1	3883	14643	240.07
	Zacatecas	TRINITY_DN1_c0_g1_i2	3785	1607	25.84
		TRINITY_DN1_c0_g1_i3	3036	537	13.06
		TRINITY_DN1_c0_g1_i4	3785	1561	24.78
		TRINITY_DN1_c0_g1_i6	2195	344	11.56
	Vargas	TRINITY_DN9_c0_g1_i1	466	38	5.77
		TRINITY_DN9_c0_g2_i1	535	42	5.84
Canal de voltaje activado por sodio	Rancho Nuevo	N/A	N/A	75	N/A
	Zacatecas	N/A	N/A	63	N/A
	Vargas	N/A	N/A	6	N/A
Receptor Beta androgén	Rancho Nuevo	TRINITY_DN54_c0_g1_i1	1455	356	18.15
	Nuevo	TRINITY_DN54_c0_g1_i2	1509	325	16.24
	Zacatecas	TRINITY_DN82_c0_g1_i1	1468	1010	50.59

ico de Octopamina	Vargas	TRINITY_DN54_c0_g1_i1	1445	397	20.42
Receptor de Octopamina/tiramina	Rancho Nuevo	N/A	N/A	35	N/A
	Zacatecas	N/A	N/A	8	N/A
	Vargas	N/A	N/A	44	N/A

En varios casos, especialmente para *AchE3* y los *receptores de octopamina/tiramina*, no fue posible recuperar isoformas completas, lo cual podría deberse a bajo nivel de expresión, fragmentación del ensamble o ausencia de estas variantes en algunas cepas.

13.10.1 BÚSQUEDA DE MUTACIONES ASOCIADAS A RESISTENCIA EN GENES BLANCO DE ACARICIDAS

A partir de los alineamientos múltiples de los transcritos ensamblados se realizó una búsqueda rigurosa de mutaciones puntuales previamente vinculadas a resistencia a acaricidas. El análisis se llevó a cabo en los genes diana más importantes: acetilcolinesterasa 1 (*AchE1*), acetilcolinesterasa 2 (*AchE2*), receptor β -adrenérgico de octopamina y los canales de cloruros dependientes de GABA. En este sentido, se presentan los resultados más sobresalientes por gen de acuerdo con la información de las Tablas 19-22.

AchE1

En el gen *AchE1* se pudieron identificar distintas mutaciones previamente relacionadas con resistencia con unos patrones de presencia muy diferentes entre las cepas: En la cepa susceptible Zacatecas: Se detectaron mutaciones de tipo P157S, T362M, Q488R, W571R, T576A y N583D, sólo en 1 de 5 contigs o menos, lo que sugiere que podrían corresponder a polimorfismos naturales, baja cobertura o variantes no fijadas las cuales podrían no estar relacionadas con resistencia.

Las cepas de Rancho Nuevo y Vargas que son multirresistentes presentaron unas variantes clave más consistentes, con las mutaciones Q488R, W571R y N583D apareciendo todas ellas en todos los contigs o en la mayor parte de ellos, lo que indicaría posible fijación y un posible papel en la resistencia a organofosforados y carbamatos. Por su parte, las mutaciones A360T y T362M también estuvieron presentes, pero con baja frecuencia como se muestra en la Tabla 19.

*Tabla 19.-Mutaciones asociadas a resistencia detectadas en el gen AchE1, aquellas que están marcadas con un * son mutaciones encontradas en este estudio.*

Mutaciones reportadas	Descripción de las mutaciones.
-----------------------	--------------------------------

<i>AchE1</i>	P157S	Presente en 4/5 contigs de Zacatecas y 2/3 de Vargas
	D188G	No se encontraron las mutaciones
	E195G	
	E196G	
	Y230C	
	S282G	
	V331A	
	*A360T	Presente en 1/5 contigs de Zacatecas y 1/4 de Rancho Nuevo
	T362A	No se encontraron las mutaciones
	*T362M	Se encontró en 1/5 contigs de la cepa Zacatecas y 1 /5 contigs de la cepa Rancho Nuevo .
	F390S L417P	No se encontraron las mutaciones
	Q488R	Se encontró en 2 /5 contigs de la cepa Zacatecas , y 5/5 Rancho Nuevo y 3/3 Vargas
	I493T N566D	No se encontraron las mutaciones
	W571R	Detectada en 1/5 de la cepa Zacatecas , y en los 5 contigs de Rancho Nuevo ,
	W571F	No se encontró la mutación
	*T576A	Presente en 1 /5 contigs de la cepa Zacatecas y en los 3 contigs de Vargas .
	*N583D	Presente en 1 /5 contigs de Zacatecas y en los 3 contigs de la cepa Vargas
	P590A	No se encontró la mutación

AchE2

En el gen *AchE2* se encontraron variantes relevantes como se muestra en la Tabla 20, que pueden corresponder a algunas de las mutaciones previamente descritas en organismos resistentes: A10T (Rancho Nuevo); E22K (Zacatecas y Rancho Nuevo); S396P (Zacatecas); K558Q (Rancho Nuevo); otras variantes como A10T y K558Q las que solo se han presentado en las cepas resistentes y son, por lo tanto, las que con más rigor podrían desempeñar un papel funcional en la resistencia toxicodinámica, por la estabilidad que mantienen entre los contigs analizados.

Las mutaciones detectadas en Zacatecas son infrecuentes y no muestran mucha representación entre los contigs. Podrían corresponder a variación natural en lugar de mecanismos implicados en la resistencia. *AchE2* representa uno de los genes con mayor señal de diversificación adaptativa, sobre todo en Rancho Nuevo.

*Tabla 20.- Mutaciones asociadas a resistencia detectadas en el gen AchE2, aquellas marcadas con un * muestran aquellas mutaciones que se encontraron dentro de este estudio.*

Mutaciones buscadas	Descripción
----------------------------	--------------------

<i>AchE2</i>	F9L	No se encontró la mutación
	*A10T	Detectada en 1/2 contigs de Rancho Nuevo .
	*E22K	Detectada en 2/2 contigs de Zacatecas y en 1 /2 contigs de Rancho Nuevo
	A26T	No se encontraron las mutaciones
	E75G	
	W114R	
	L141F	
	K208R	
	I210V	
	P343S	
	M349V	
	*S396P	Detectada en 2/2 contigs de la cepa Zacatecas
	M406V	No se encontraron las mutaciones
	H476	
	G477	
	D478	
	K555M	
	K558Q	Detectada en 2/2 contigs de la cepa Rancho Nuevo

Receptor β -adrenérgico de octopamina

Adicionalmente, se revisaron mutaciones típicamente asociadas a resistencia a amidinas: I61F, Y215H, Y337F como se muestra en la Tabla 21. Ninguna de estas variantes fue detectada en ninguna de las tres cepas. Esto indica que, en este caso, la resistencia a amidinas no está mediada por modificaciones en este receptor, lo que coincide con que este gen tampoco estuvo diferencialmente expresado.

Tabla 21.-Receptor β -adrenérgico de octopamina

	Mutaciones buscadas	Descripción
Receptor Beta adrenérgico de octopamina	I61F Y215H Y337F	No se encontraron las mutaciones

Canales de cloruro activados por ácido gama-aminobutírico

Las mutaciones clásicas asociadas a resistencia a fipronil (A286S, A302S, A302G, A302N), fueron buscadas, pero no se detectó la presencia de ninguna de ellas. La ausencia de estas mutaciones indicaría que para fipronil los mecanismos presentes en dichas cepas no serían del

tipo toxicodinámico, lo cual también refuerza los resultados transcriptómicos de sobreexpresión compensatoria del receptor, pero no de mutaciones estructurales.

Tabla 22.- Canales de cloruro activados por ácido gama-aminobutírico

	Mutaciones buscadas	Descripción
Canales de cloruro activados por ácido gama butírico	A286S	No se encontraron las mutaciones
	A286L	
	A302S	
	A302G	
	A302N	

En general de acuerdo con los análisis de alineamientos múltiples realizados sobre los transcritos ensamblados, se identificaron mutaciones previamente descritas en la literatura como asociadas con resistencia a acaricidas en los genes blanco. A continuación, se presentan los hallazgos por gen y cepa, destacando que la cepa Zacatecas corresponde a la referencia susceptible, mientras que Rancho Nuevo y Vargas son cepas con fenotipo multirresistente.

13.11 ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES PCA Y MAPAS DE CALOR

El análisis de componentes principales muestra una clara diferenciación entre las cepas estudiadas tanto a nivel global (PCA tradicional) como en los genes con mayor expresión diferencial (Leading logFC). Esta separación es coherente con los perfiles fenotípicos de susceptibilidad y resistencia observados, sugiriendo que existen firmas transcriptómicas distintivas asociadas a cada cepa como se muestra en la Figura 20. Estos hallazgos se ven confirmados por el análisis de agrupamiento jerárquico presente en el mapa de calor de la Figura 21. En particular, la cepa Vargas, la cual muestra presenta un agrupamiento más compacto, lo que sugiere una regulación transcriptómica más homogénea en comparación con las demás cepas.

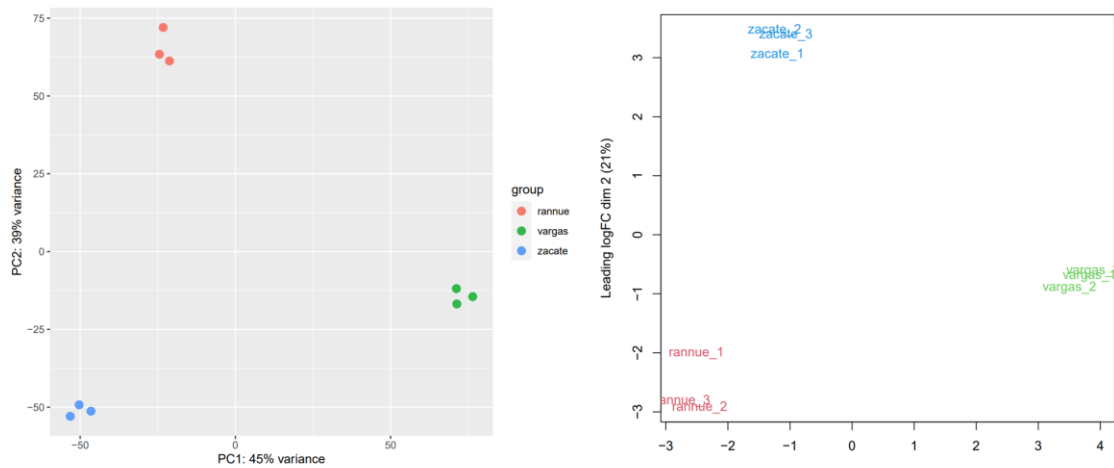


Figura 20.- Gráficos de componentes principales, el de la izquierda muestra la varianza entre los componentes principales PC1 y PC2 mientras que el gráfico de la derecha es el gráfico de dispersión de PCA con $\log_2$ FC.

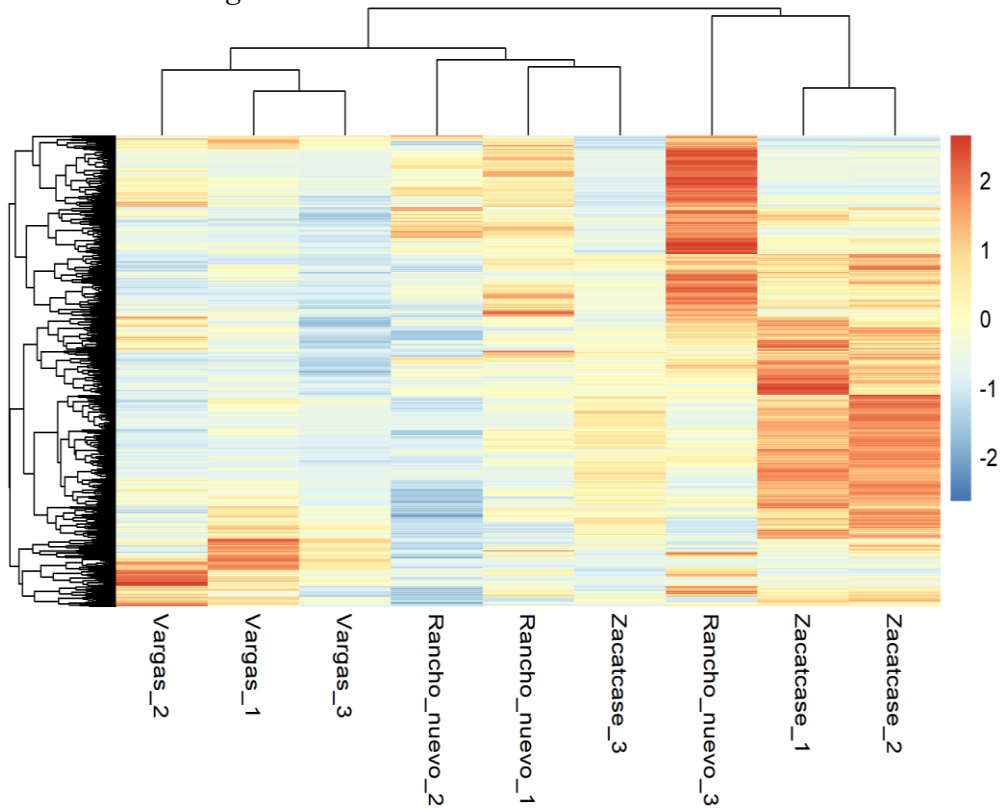


Figura 21.—Mapa de calor con agrupamiento jerárquico de las cepas con sus respectivas réplicas biológicas. La gama cromática que transita del rojo al azul indica la magnitud de cambio en términos de puntuación estándar (Z-score), reflejando la desviación de los 1000 transcritos con mayor varianza inter-muestral. El dendrograma superior ilustra la relación de similitud entre muestras.

13.12 RESULTADOS DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE LA COMPARACIÓN ENTRE RANCHO NUEVO VS ZACATECAS (CEPA SUSCEPTIBLE).

La comparación entre la cepa multirresistente Rancho Nuevo y la cepa susceptible Zacatecas, permitió identificar 13,310 transcritos diferencialmente expresados (DETs), 7,092 (53.28%) regulados positivamente y 6,218 (46.72%) regulados negativamente como se muestra en la Figura 22. De este conjunto se lograron anotar 5,305 transcritos lo que representó el 39.86% del total de los DETS, entre los cuales 3,250 (61.26%) presentaron una expresión positiva y 2055 (38.74%) fueron regulados negativamente.

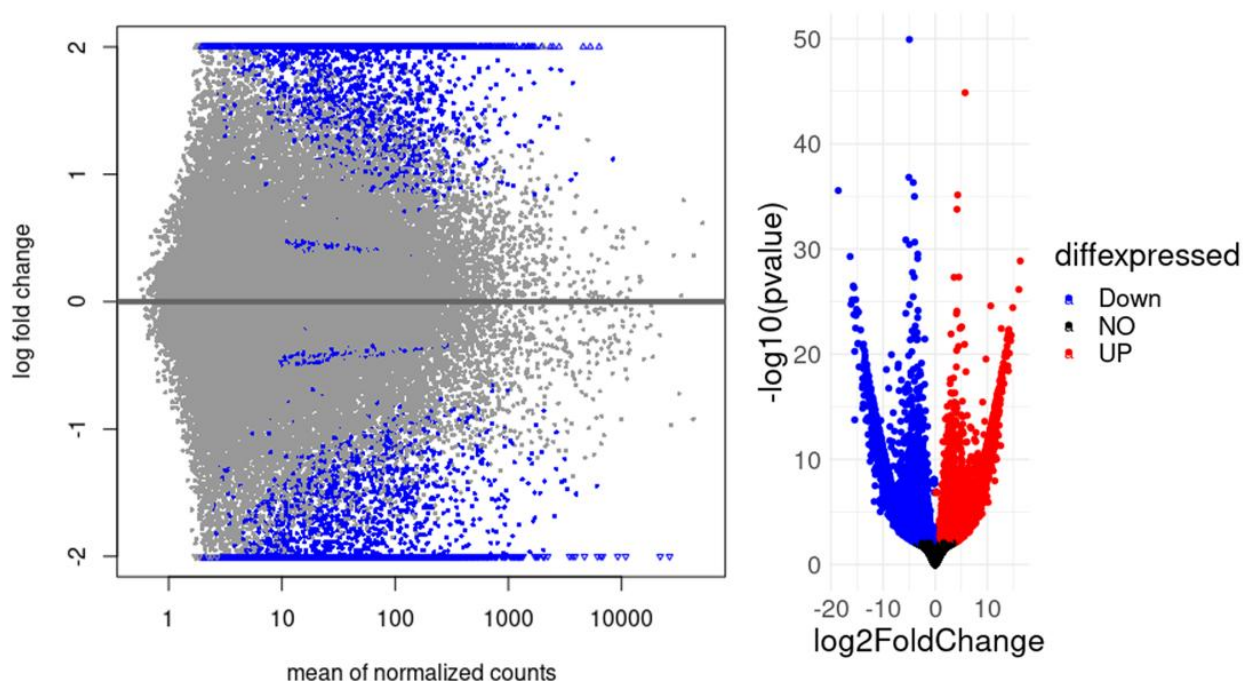


Figura 22.- Análisis de expresión diferencial entre la cepa Rancho Nuevo y la cepa susceptible Zacatecas de *R. (B.) microplus*. A la izquierda se presenta el gráfico MA, que muestra en el eje *x* la media de los recuentos normalizados y en el eje *y* los valores de $\log_2$ fold change ($\log_2FC$). Cada punto representa un transcrito; los que se alejan del eje horizontal corresponden a transcritos con mayor o menor expresión. A la derecha se presenta el volcano plot, que representa en el eje *x* los valores de $\log_2FC$ y en el eje *y* el valor transformado de $-\log_{10}(p\text{-valor})$. Los transcritos más significativos estadísticamente se encuentran en la parte superior del gráfico. Ambas gráficas fueron generadas en R utilizando la paquetería ggplot2.

El análisis de expresión diferencial reveló una clara separación en los perfiles transcriptómicos entre la cepa multirresistente Rancho Nuevo y la cepa susceptible Zacatecas, lo que indica diferencias sustanciales en la regulación génica. El gráfico MA muestra una gran cantidad de transcritos con cambios significativos en la expresión, tanto hacia arriba como hacia abajo, lo cual sugiere una reprogramación transcriptómica asociada al fenotipo de resistencia.

El diagrama de volcán confirma esta tendencia, con numerosos transcritos significativamente sobreexpresados (en rojo) o subexpresados (en azul) en la cepa Rancho Nuevo. Estos cambios podrían estar relacionados con rutas metabólicas asociadas a mecanismos de detoxificación, modificación del sitio blanco o regulación de transportadores. Este patrón sugiere que la resistencia acaricida implica una respuesta multigénica compleja que merece ser explorada en mayor profundidad mediante anotaciones funcionales y enriquecimiento de rutas.

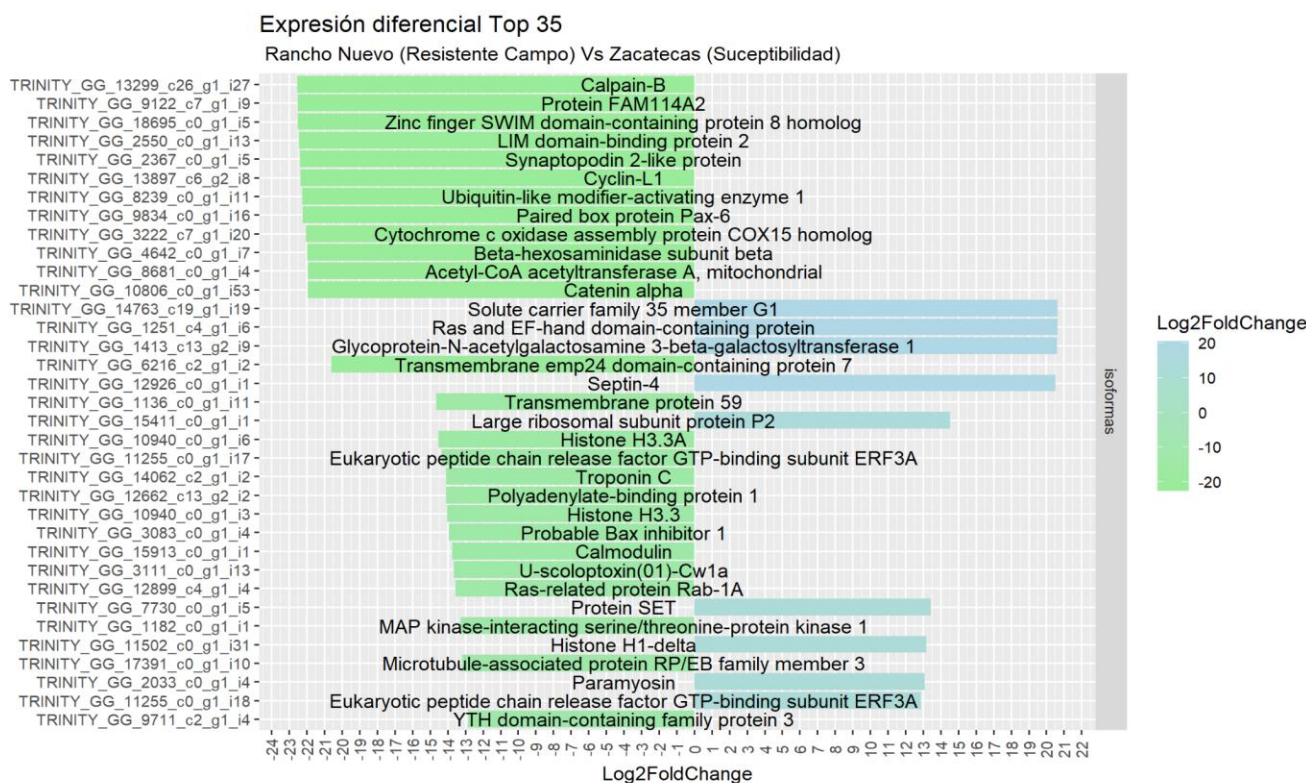


Figura 23.-Gráfico del top 35 de los genes expresados diferencialmente, donde en el eje de las x, se tienen los valores de $\log_2FC$ mientras que en el eje de las y se tiene el nombre del transcrito, dentro de la barra se encuentra la anotación del transcrito, diagrama realizado con R y la paquetería de ggplot.

El análisis de expresión diferencial entre la cepa multirresistente *Rancho Nuevo* y la cepa susceptible *Zacatecas* reveló un perfil transcriptómico complejo, con más de 13,000 transcritos diferenciales, de los cuales el 39.86% pudieron ser anotados. A modo de análisis exploratorio, se seleccionaron los 35 transcritos con mayor magnitud de cambio (Figura 23), esta grafica muestra una clara tendencia hacia la sobreexpresión de genes asociados a procesos metabólicos, transporte y respuesta a estrés, lo cual puede estar implicado en mecanismos adaptativos de resistencia.

El análisis dirigido permitió identificar numerosos genes previamente asociados a resistencia en artrópodos, clasificados en mecanismos de tipo sitio diana, penetración, metabolismo de xenobióticos y transporte/excreción (Tabla 26). Por ejemplo:

- **Acetilcolinesterasas:** 24 transcritos, con un patrón de regulación mixta, predominantemente negativa. Se destaca la expresión diferencial de isoformas específicas (*AchE3*) que podrían estar relacionadas con resistencia a organofosforados o carbamatos.
- **CYP450s:** 61 transcritos distribuidos en 12 subfamilias, con múltiples genes sobreexpresados como *CYP3A*, *CYP6A*, y *CYP17A*, conocidos por metabolizar acaricidas.
- **Glutación-S-transferasas (GSTs) y monoxigenasas dependientes de flavina (FMOs)** también mostraron expresión diferencial, apoyando el papel del metabolismo de fase II en la resistencia.
- **Proteínas de cutícula y quitinasas**, que participan en el mecanismo de penetración, mostraron cambios expresionales compatibles con una posible remodelación de la cutícula que limita la entrada de compuestos tóxicos.
- En cuanto al **transporte de xenobióticos**, destacan miembros de las familias ABC transportadores y MFSD, muchos de ellos regulados positivamente, lo cual sugiere un aumento en la capacidad de excreción de acaricidas.

Finalmente, se detectó la expresión diferencial de genes de defensa oxidativa como superóxido dismutasa, catalasas, tioredoxina y peroxiredoxina, que pueden contribuir a la detoxificación de compuestos y a la homeostasis celular frente al estrés generado por exposición a acaricidas.

Estos hallazgos permiten establecer una base molecular para la resistencia múltiple observada en la cepa Rancho Nuevo y sustentan la hipótesis de que dicha resistencia no está mediada por un solo mecanismo, sino por una respuesta integrada que involucra múltiples rutas moleculares y adaptativas.

Los análisis de expresión llevados a cabo entre la cepa multirresistente Rancho Nuevo y la cepa susceptible Zacatecas corroboran que la resistencia a acaricidas en *R. (B.) microplus* es un proceso multifactorial. También se detectaron modificaciones en genes del sitio diana (acetilcolinesterasas y receptores GABA principalmente), aunque en su mayor parte fueron de regulación negativa. Los mecanismos de penetración también se vieron involucrados, con regulación mixta para las proteínas de cutícula y quitinasas; el metabolismo de xenobióticos se reveló como el más destacado, ya que fueron detectadas gran cantidad de citocromos *P450*, *GSTs*, *FMOs*, lipasas y carboxilesterasas diferencialmente expresadas, lo que indicaba una aceptación del potencial detoxificante. Además, los mecanismos de excreción, como por ejemplo los transportadores *ABC* o *MFSD*, mostraron sobreexpresión en varias isoformas y los genes de defensa oxidativa también fueron reprogramados (*SOD*, catalasa, tioredoxinas).

En conjunto, los resultados obtenidos confirman que la resistencia a acaricidas no depende de un solo gen o de una única vía, sino de una respuesta integrada que vincula cambios en el sitio diana, la penetración, la protección Tabla 23, y en materiales suplementarios se muestra la tabla a detalle de las isoformas de los transcritos.

Tabla 23.- Búsqueda específica de los transcritos expresados diferencialmente para las enzimas reportadas en la literatura acerca relacionadas con la resistencia a acaricidas/insecticidas

Mecanismo	Categoría	Hallazgos
Sitio diana	Receptores <i>OCT/TYR</i>	No detectados.
	Receptor β -adrenérgico	No detectado.
	Acetilcolinesterasas (<i>AChE</i>)	24 transcritos; predomina la represión (20/24). Solo 4 inducidos ($\log_2FC$ +4.23 a +9.28). <i>AChE3</i> reprimida.
	Canal de sodio presináptico	No detectado.
	Receptor <i>GABA</i>	2 transcritos sobreexpresados ($\log_2FC$ +8.43 y +4.94).
Penetración	Proteínas de cutícula	10 transcritos; mayoría reprimida. Proteínas 16.8, 10.9 y 14A con $\log_2FC$ negativos.
	Quitina sintasa	No detectada.
	Quitinasas	12 transcritos; regulación mixta. TRINITY_GG_4762 mayormente reprimido; otras isoformas altamente inducidas (+5.32 a +9.05).
Metabolismo de xenobióticos	Citocromos <i>P450</i>	61 transcritos en 12 subfamilias; regulación mixta. <i>CYP3A</i> (mayoritaria) reprimida; <i>CYP17A</i> y <i>CYP4C</i> con varios inducidos.
	<i>FMO/MAO</i>	3 transcritos; mayoría inducidos.
	Glutación S-transferasas (GST)	15 transcritos; regulación mixta, pero predominio negativo en clases <i>GTS1</i> , <i>GTS4</i> , Zeta.
	Esterasas/Lipasas	20+ transcritos; fosfolipasas mayormente inducidas; carboxilesterasas variación mixta.
Detoxificación específica	Colinesterasas	5 transcritos; mayoría reprimidos.
	<i>SDR</i> (oxidoreductasas)	7 transcritos; mezcla de reprimidos e inducidos.
	Galactosiltransferasas / <i>ALDH</i>	Regulación mixta; varias isoformas ampliamente inducidas.
	Sulfotransferasas (<i>ST</i>)	11 transcritos; predominio de represión, aunque carbohidrato-ST y heparán-ST inducidas.
Transporte – Excreción	Transportadores <i>ABC</i>	12 transcritos; mayoría inducidos (sobre todo subfamilias A y C).
	MFSD (transportadores secundarios)	11 transcritos; regulación mixta, pero tendencia general a inducción.
Defensas oxidativas	Catalasa	1 transcrito inducido.
	Superóxido dismutasa (<i>SOD</i>)	11 transcritos; predominio de represión, con algunas <i>Cu/Zn-SOD</i> inducidas.

	<i>Trx/Prx</i> (tioredoxina/peroxiredoxina)	Regulación mixta; peroxiredoxinas mayormente inducidas.
Regulación	Receptor nuclear <i>AhR</i>	2 transcritos inducidos (hasta +9.97).

En la Tabla 24 se muestra un resumen de los más importantes grupos génicos diferencialmente expresados vinculados a mecanismos de resistencia en *R. (B.) microplus*, al comparar la cepa multirresistente Rancho Nuevo con la cepa susceptible Zacatecas. En los genes de sitio diana se detectaron receptores de octopamina sin cambios, hasta las acetilcolinesterasas presentaron un importante predominio de transcritos reprimidos (20/24), lo que indica una posible pérdida o disminución funcional de estas isoformas de proteínas. En contraparte, el receptor *GABA* mostró una clara sobreexpresión.

La categoría de los mecanismos de penetración mostró represión de las proteínas de cutícula, junto con una regulación mixta de quitinasas. El metabolismo de xenobióticos mostró el mayor número de genes regulados, pero la caracterización se centró en la variabilidad en citocromos *P450*, *GSTs* y esterasas, lo que muestra la existencia de una respuesta detoxificadora variada.

Los sistemas de transporte mostraron una tendencia general hacia la inducción, particularmente los transportadores *ABC* sugirieron un aumento de la capacidad de excreción de acaricidas. Por otro lado, las enzimas de defensa oxidativa mostraron una regulación mixta, siendo algunas peroxirredoxina y catalasas sobreexpresadas, sugiriendo un fortalecimiento de la capacidad de control del estrés oxidativo en la cepa resistente.

Tabla 24.- Expresión diferencial de genes relacionados con mecanismos de resistencia a acaricidas en R. (B.) microplus (Cepa Rancho Nuevo vs Zacatecas)

Mecanismo	Subfamilia / Gen	Nº Transcritos	Regulación diferencial (log₂FC)	Observaciones técnicas
Sitio diana	Receptor octopamina / tiramina (<i>OCT/TYR</i>)	N/A	N/A	No se detectó expresión diferencial significativa
	Receptor octopamina tipo β-adrenérgico (<i>βAOR</i>)	N/A	N/A	No se detectó expresión diferencial significativa
	Acetilcolinesterasas (<i>AchE</i>)	24	4 inducidos (+4.23 a +9.28); 20 reprimidos (-1.44 a -9.49)	Predominó represión. Subtipo AchE3 suprimido (log ₂ FC -3.02); mayoría son TRINITY_GG_5715
	Canal de sodio presináptico	N/A	N/A	No detectado

	Receptor <i>GABA</i>	2	Inducidos (+8.43 y +4.94)	Sobreexpresión clara
Penetración	Proteínas de cutícula	10	Mixta (-10.75 a +4.20)	Predominio de represión en proteína 16.8 y 10.9
	Quitina sintasa	N/A	N/A	No detectado
	Quitinasas (endoquitinasas)	12	7 inducidos (+1.78 a +9.05); 5 reprimidos (-9.17 a -3.92)	Mayoría en TRINITY_GG_476 2 (6/8 reprimidos); regulación mixta general
Metabolismo de xenobióticos	Citocromos <i>P450</i>	61	Regulación mixta (-10.0 a +9.38)	12 subfamilias; más abundante <i>CYP3A</i> (26), mayoría reprimidos
	<i>FMO / MAO</i>	3	2 inducidos, 1 reprimido	<i>FMO3</i> y <i>MAO-B</i> inducidos
	Glutación S-transferasa (<i>GST</i>)	15	Regulación mixta (-9.81 a +6.13)	5 clases de <i>GST</i> . Mayoría reprimidos (<i>GTS Zeta</i> , <i>GTS D1</i> , <i>GTS 4</i> , etc.)
	Lipasas / Esterasas	30+	Mixta	Incluye lipasas gástricas, fosfolipasas y carboxilesterasas. Variabilidad elevada
	Colinesterasas	5	Mayoría reprimida (-9.27 a +7.77)	Promedio log ₂ FC = -1.03
	<i>SDR</i> (Deshidrogenasas)	7	Mixta (-8.62 a +5.98)	Mayoría reprimidos (retinol <i>SDR</i> 7 y 2)
Transporte / excreción		13	Mixta (-9.14 a +20.62)	Destaca un <i>GalT</i> con log ₂ FC de +20.62 y <i>ALDH</i> familia 8 inducida
	Sulfotransferasas (<i>ST</i>)	11	Mixta (-8.12 a +7.59)	Predominio de represión en <i>ST-1A1</i> , <i>ST-1B1</i>
	Transportadores <i>ABC</i>	12	Mayoría inducidos	Subfamilias A, C y F; sobreexpresión

			(-11.14 a +9.18)	clara en subfamilia C miembro 1
	Superfamilia de facilitadores (<i>MFSD</i>)	11	Mixta (-4.85 a +9.10)	Prots. 1, 6, 11, 12, 14A regulados en ambas direcciones
Defensas oxidativas	Catalasa	1	Inducido (+2.77)	Sobreexpresión clara
	Superóxido dismutasa (<i>SOD</i>)	11	Mixta (-6.80 a +8.22)	<i>SOD [Cu-Zn]</i> y <i>[Mn]</i> ; predominio de represión
	<i>Trx / Prx</i>	20	Mixta (-9.46 a +8.87)	Peroxiredoxina 3 y Nucleoredoxina 2 mayormente inducidas
Otros	Receptor nuclear <i>AhR</i>	2	Inducidos (+9.97 y +2.99)	Potencial implicación en mecanismos regulatorios

Tabla 25.-Resumen de genes expresados diferencialmente asociados a mecanismo de resistencia en *R. (B.) microplus*

Mecanismo	Categoría	Resumen
Sitio diana	Acetilcolinesterasas	24 transcritos. 4 inducidos (log ₂ FC: +4.23 a +9.28), 20 reprimidos (log ₂ FC: -1.44 a -9.49). Predomina la regulación negativa (~81%).
Sitio diana	Receptor <i>GABA</i>	2 transcritos sobreexpresados con log ₂ FC de +8.43 y +4.94.
Penetración	Proteínas de cutícula	10 transcritos; mayoría reprimidos. Proteínas 16.8, 10.9 y 14 isoforma a con log ₂ FC de -10.75 a +4.20, promedio de -3.31.
Penetración	Quitinasa	12 transcritos; regulación mixta. Mayoría negativa (6/8 del gen TRINITY_GG_4762), log ₂ FC promedio de -2.16.
Metabolismo	Citocromos <i>P450</i>	61 transcritos en 12 subfamilias. Regulación mixta. Subfamilias como <i>CYP3A</i> (26 transcritos) predominantemente reprimidas.
Metabolismo	Glutación S-transferasa	15 transcritos en 5 tipos. Regulación mixta con valores

		log ₂ FC de -9.81 a +6.13. Predominio de regulación negativa.
Metabolismo	Esterasas y Lipasas	Varios tipos con regulación mixta. Fosfolipasas mayormente inducidas, log ₂ FC hasta +8.65. Carboxilesterasas: mixtas.
Excreción	Transportadores <i>ABC</i>	12 transcritos. Predomina la regulación positiva, con valores log ₂ FC de -11.14 a +9.18.
Excreción	<i>MFSD</i>	11 transcritos. Predominio de regulación positiva. log ₂ FC de -4.85 a +9.10.
Defensas oxidativas	<i>SOD</i> , Catalasa, Tioredoxina	Regulación mixta. Varias isoformas de <i>SOD</i> (mayoría reprimidas), Peroxiredoxinas mayormente inducidas, log ₂ FC de -9.46 a +8.87.

13.13 RESULTADO DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE LA COMPARACIÓN ENTRE LAS CEPAS VARGAS VS ZACATECAS (CEPA SUSCEPTIBLE)

El análisis transcriptómico comparativo entre la cepa Vargas y la susceptible Zacatecas reveló una expresión diferencial robusta con un total de 14,174 transcritos DETs. Se observó una tendencia hacia la sobreexpresión, con 8,297 (58.53%) transcritos regulados positivamente, lo que sugiere la activación de respuestas adaptativas específicas como la desintoxicación metabólica, aumento de los sensores químicos y/o mecanismos compensatorios. En contraste se identificaron 5,877 (41.46%) transcritos regulados negativamente, esta represión sugiere posibles mecanismos de silenciamiento génico, supresión de funciones no esenciales o adaptación a presión acaricida crónica, la expresión diferencial se logra apreciar en los diagramas presentados en la Figura 24. De este conjunto solo fueron anotados 5,761 lo cual representa un 40.64% de los DETs, entre los cuales 3,563 (61.84%) fueron genes regulados positivamente, mientras que 2,198 (38.15%) se regularon negativamente. Debido a la cantidad de cambios en los perfiles transcripcionales, se realizó un análisis detallado por mecanismos (sitio diana, metabolismo, excreción, etc.) el cual se presenta detalladamente en las Tablas 26 y 28.

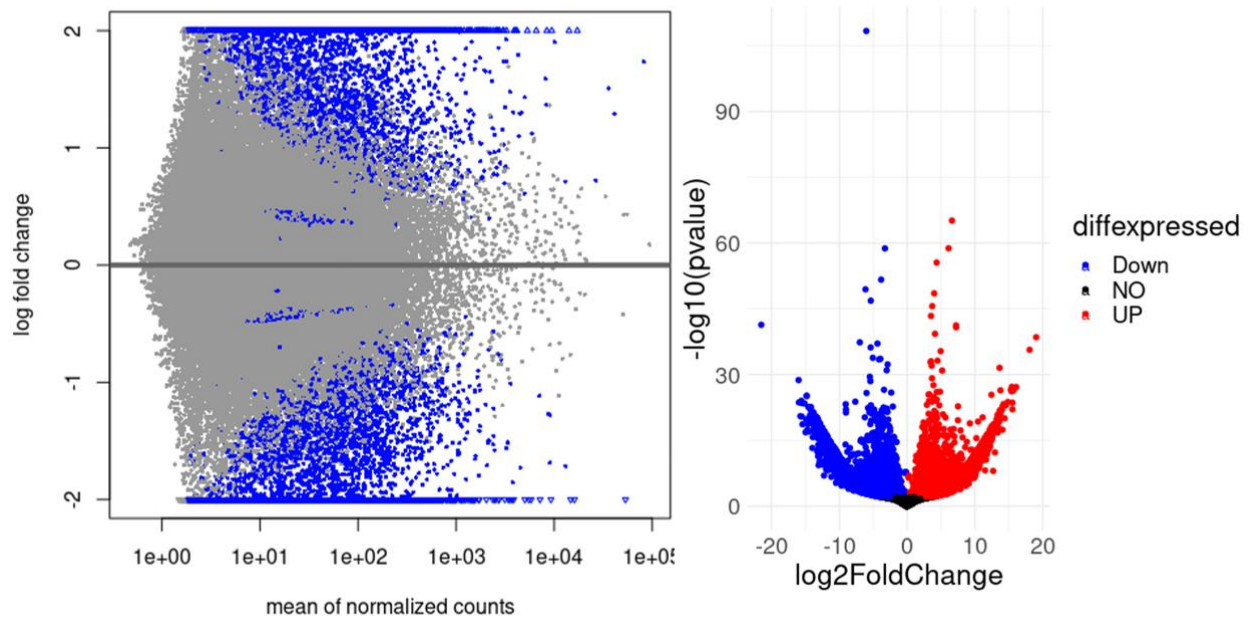


Figura 24.-Análisis de expresión diferencial entre la cepa Vargas y la cepa susceptible Zacatecas de *R. (B.) microplus*. A la izquierda se muestra el gráfico MA, donde cada punto representa un transcrito; el eje X indica la media de los recuentos normalizados y el eje Y el cambio de expresión ($\log_2FC$). Este gráfico permite visualizar cómo varía la expresión génica en función de su abundancia. A la derecha, el diagrama de volcán muestra el $\log_2FC$ en el eje X y el valor de significancia estadística transformado ($-\log_{10} p\text{-valor}$) en el eje Y. Los puntos rojos corresponden a transcritos sobreexpresados de forma significativa, mientras que los azules indican transcritos reprimidos. Este análisis evidencia un patrón claro de genes diferencialmente expresados entre la cepa Vargas (potencialmente resistente) y la cepa susceptible Zacatecas.

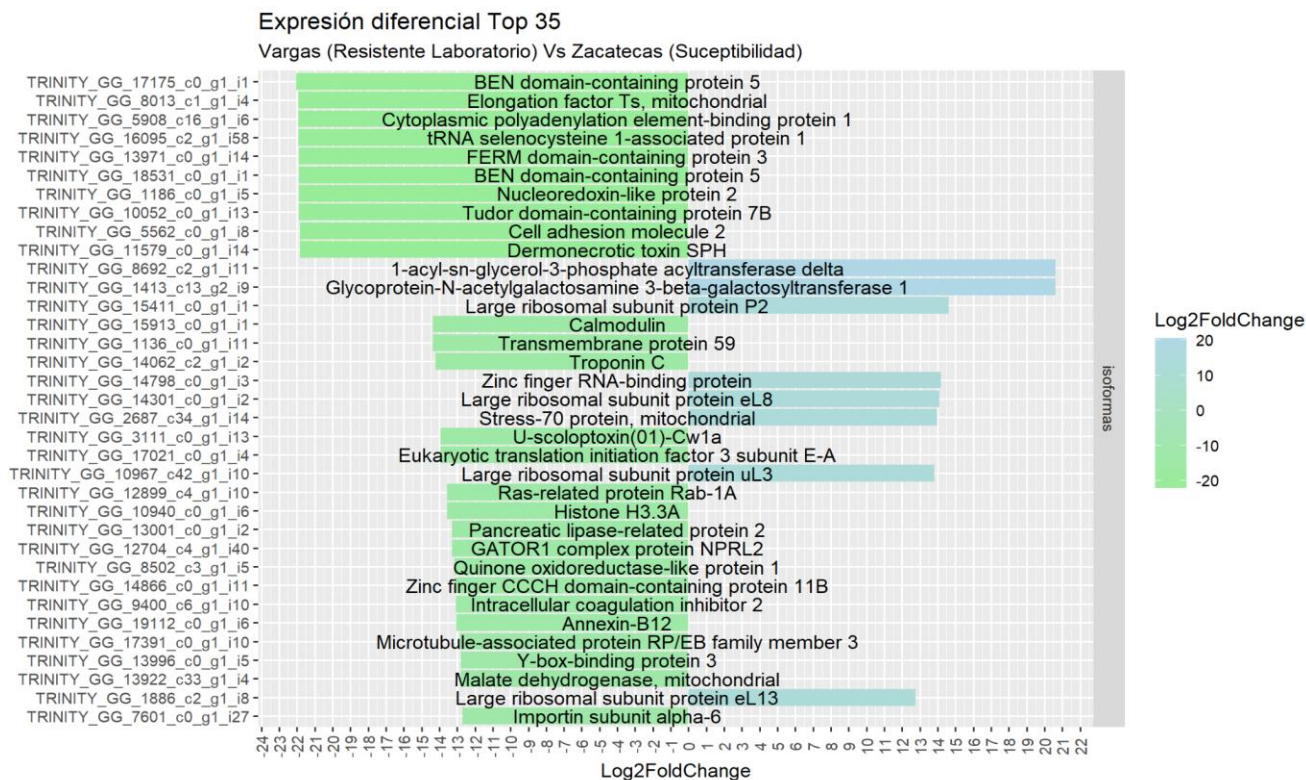


Figura 25.-Se muestran 35 transcritos con una gran magnitud de cambio en la ($\log_2FC$) expresión, donde las barras verdes representan transcritos sobre expresados en la cepa vargas y las barras azuladas son transcritos represores. tanto a la izquierda como a la derecha.

La expresión diferencial entre la cepa multirresistente Vargas y la cepa susceptible Zacatecas evidencia una profunda reorganización transcripcional asociada a mecanismos de resistencia. El gráfico MA muestra una amplia distribución de transcritos con valores extremos de $\log_2FC$, principalmente hacia la sobreexpresión génica (valores positivos), mientras que el diagrama de volcán indica un alto número de transcritos diferencialmente expresados con significancia estadística robusta ($-\log_{10} p\text{-value} > 20$).

En términos funcionales, destacan genes vinculados al metabolismo de xenobióticos (como monooxigenasas, transferasas y esterasas), así como componentes del sistema antioxidante (SOD, catalasas), los cuales presentan patrones mixtos de regulación. Sin embargo, en este contraste Vargas vs Zacatecas, sobresale especialmente la represión de genes relacionados con síntesis y remodelación de cutícula, lo que sugiere un ajuste en la vía de penetración como estrategia de resistencia. Esta modulación podría reflejar una adaptación estructural para disminuir la absorción de acaricidas como se muestra en la Tabla 26.

Tabla 26.- Expresión diferencial de genes asociados a resistencia a acaricidas - Cepa Vargas

Mecanismo	Categoría	Nº de transcritos	Patrón de regulación ($\log_2FC$)	Hallazgos
Sitio diana	Receptores OCT/TYR	N/A	—	No se detectó expresión diferencial.

	Receptor β -adrenérgico	N/A	—	No se detectó expresión diferencial.
	Acetilcolinesterasas (<i>AChE</i>)	42	9 inducidos; 33 reprimidos	Predominio de represión (78%). <i>AChE2</i> y <i>AChE3</i> reprimidas; mayoría de isoformas corresponden a TRINITY_GG_5715.
	Canal de sodio presináptico	N/A	—	No detectado.
	Receptor GABA	2	Ambos inducidos (+8.49, +3.38)	Evidente sobreexpresión; posible participación en resistencia.
Penetración	Proteínas de cutícula	16	Mayoría reprimida	Proteínas 16.8, 10.9 y 14A con regulación predominantemente negativa.
	Quitina sintasa	N/A	—	No detectada.
	Quitinasas	7	Mixto	Endoquitinasas mayormente inducidas; TRINITY_GG_12807 y GG_302 altamente inducidas.
Metabolismo de xenobióticos	Citocromos <i>P450</i>	99	Mixto; predominio de represión	13 familias; <i>CYP3A</i> (51 transcritos) principalmente reprimida; <i>CYP20A</i> y <i>CYP4C</i> inducidas.
	<i>FMO</i> / <i>MAO</i>	6	Mayoría inducida	<i>FMO3</i> y <i>MAO-B</i> inducidos; regulación compatible con detoxificación.
	Glutación S-transferasas (<i>GST</i>)	19	Mixto; mayoría reprimida	Clases Mu, Omega, Zeta; predominio de represión en <i>GTS1</i> y <i>GTS4</i> .
	Esterasas / Lipasas	25+	Mixto	Fosfolipasas mayormente inducidas; carboxilesterasas mayormente reprimidas.
	<i>SDR</i> (deshidrogenasas)	9	Mixto	Retinal <i>SDR</i> mayormente inducidas; <i>SDR7</i> y <i>SDR2</i> reprimidas.
Otras enzimas	Galactosyltransferasas	7	Mixto; varias inducidas	Destaca un transcrito con log ₂ FC +20.64.

	Aldehído deshidrogenasa	9	Mayoría inducida	<i>ALDH</i> familias 5–8 inducidas.
	Sulfotransferasas (<i>ST</i>)	12	Mayoría reprimida	<i>ST-1A1</i> y <i>ST-1B1</i> fuertemente reprimidas; carbohidrato- <i>ST</i> inducidas.
Transporte / excreción	<i>ABC</i> transportadores	10	Mayoría inducida	Subfamilias A, C y F; <i>ABC-C1</i> fuertemente inducidos.
	<i>MFSD</i>	10	Mayoría inducida	<i>MFSD1</i> , <i>4B</i> , <i>6</i> y <i>14A</i> con fuerte inducción.
Defensas oxidativas	Catalasa	3	Mixto, tendencia a inducción	Una isoforma altamente inducida (+9.12).
	Superóxido dismutasa (<i>SOD</i>)	11	Mixto; mayoría reprimida	<i>Cu/Zn-SOD</i> mayormente reprimidas; chaperonas <i>SOD</i> inducidas.
	Tiorredoxina / Peroxirredoxina	15+	Mixto	Peroxirredoxina 3 inducida; tiorredoxina variables.
Regulación	Receptor nuclear <i>AhR/ARNT</i>	1	Inducido (+10.04)	Potencial rol regulador maestro en detoxificación.

En la tabla 27, se presenta el análisis detallado de los transcritos diferencialmente expresados en la cepa multirresistente Vargas frente a la cepa susceptible Zacatecas, agrupados por mecanismo de resistencia: sitio diana, penetración, metabolismo de xenobióticos, excreción y defensas antioxidantes.

Tabla 27.- Resumen estructurado por mecanismo

Mecanismo	Total, de transcritos	Tipo de regulación	Rango log ₂ FC	Observaciones
Sitio diana: Acetilcolinesterasa (<i>AchE</i>)	42	Mayoría reprimida (33/42)	-10.16 a +7.15	Predominio de transcritos reprimidos; <i>AchE3</i> y <i>AchE2</i> con fuerte regulación negativa
Sitio diana: Receptor ácido <i>GABA</i>	2	Sobreexpresados (2/2)	+3.38 a +8.49	Sobreexpresión clara de ambos transcritos <i>GABA-R</i>

Penetración: Proteínas de cutícula	16	Mayoría reprimida	-10.16 +6.79	a	Proteínas de cutícula mayoritariamente e reprimidas, tres tipos representados
Penetración: Quitinasas	7	Mayoría inducida	-8.46 a +9.10		Quitinasas expresadas con tendencia positiva en su mayoría
Metabolismo: Citocromos P450	99	Mixta, mayoría reprimida	-12.26 +9.82	a	13 familias identificadas, mayoría <i>CYP3A</i> , <i>CYP4V</i> y <i>CYP20A</i> inducidas
Metabolismo: Glutación S transferasas (GSTs)	19	Mixta, mayoría reprimida	-9.91 a +6.78		Diversidad de clases <i>GST</i> ; regulaciones variables
Metabolismo: Esterasas y lipasas	55	Mixta, mayoría reprimida	-9.71 a +8.20		Abundantes transcritos de esterasa/lipasa, en su mayoría reprimidos
Metabolismo: Deshidrogenasas SDR	9	Mixta	-10.22 +5.89	a	<i>SDR</i> con regulación mixta, destacando retinal y retinol <i>SDR</i>
Metabolismo: Sulfotransferasas (ST)	12	Mixta, mayoría reprimida	-4.62 a +6.42		Predominio de regulación negativa, <i>ST-1A1</i> y <i>ST-1B1</i> suprimidas
Excreción: Transportadores ABC	10	Mayoría inducida	-7.11 a +9.22		<i>ABC</i> tipo A y C altamente sobreexpresados
Excreción: <i>MFSD</i>	10	Mayoría inducida	-8.59 a +9.16		<i>MFSD</i> tipo 1, 4B, 6 y 14 mayormente sobreexpresados
Defensas oxidativas: <i>SOD</i>, catalasa,	39	Mixta	-8.97 a +9.12		Defensas mixtas; <i>Cu/Zn-SOD</i> principalmente reprimidas;

tiorredoxinas, peroxiredoxinas				catalasa y tiorredoxinas mayormente inducidas
Otros: Receptor de hidrocarburos de arilo (AHR)	1	Inducida	+10.0 4	Único transcrito fuertemente sobreexpresado (log ₂ FC +10.04)

El análisis de expresión diferencial de genes asociados con resistencia a acaricidas en la cepa Vargas reveló una participación destacada de múltiples mecanismos moleculares, con predominancia del metabolismo de xenobióticos y defensas antioxidantes. El grupo de los citocromos P450 (*CYPs*) fue el más representado, con 99 transcritos distribuidos en 13 familias, destacando *CYP3A*, *CYP4V* y *CYP20A*. Asimismo, se observó una abundante presencia de esterasa/lipasa, aunque la mayoría de sus transcritos estuvieron reprimidos.

El sistema de excreción también presentó una fuerte activación en la cepa Vargas, evidenciado por la sobreexpresión de transportadores *ABC* de tipo *A* y *C*, así como miembros de la superfamilia *MFS*D. Las defensas antioxidantes mostraron una regulación mixta, con transcritos de superóxido dismutasa (*SOD*) predominantemente reprimidos, pero con catalasa y tiorredoxina mayormente inducidas. Por otro lado, se identificó un transcrito del receptor de hidrocarburos de arilo con una notable sobreexpresión (log₂FC +10.04), que podría participar en la respuesta a compuestos tóxicos o xenobióticos.

En el caso de los mecanismos de tipo “sitio diana”, destaca la expresión de múltiples variantes de acetilcolinesterasa, de las cuales más del 75% fueron reprimidas, con algunos transcritos fuertemente inhibidos (log₂FC hasta -10.16), lo que sugiere un posible silenciamiento funcional de esta vía como estrategia adaptativa. Finalmente, las proteínas de cutícula, quitinasas y quitinas sintasas relacionadas con la penetración también mostraron patrones mixtos, siendo la mayoría de los transcritos reprimidos, aunque algunas quitinasas se sobreexpresaron de manera considerable.

Posteriormente se muestra en la Tabla 28 un resumen de los genes asociados a la resistencia la cepa Vargas.

Tabla 28.- Transcritos asociados a resistencia en cepa Vargas

Mecanismo	Familia/Molécula	Total, transcritos	Tipo de regulación	log ₂ FC
Sitio diana	Receptores de octopamina/tiramina (<i>OCT/TYR</i>)	0	N/A	N/A
Sitio diana	Receptores de octopamina tipo β -adrenérgico (<i>βAOR</i>)	0	N/A	N/A
Sitio diana	Acetilcolinesterasa (<i>AchE</i>)	42	9 inducidos (21.4%), 33	+2.96 a +7.15 / -

			reprimidos (78.6%)	1.59 a - 10.16
Sitio diana	Canal de sodio presináptico	0	N/A	N/A
Sitio diana	Receptor <i>GABA</i>	2	2 inducidos	+3.38 a +8.49
Penetración	Proteínas de cutícula	16	Mayoría reprimida	-10.16 a +6.79
Penetración	Quitina sintasa	0	N/A	N/A
Penetración	Quitinasa (endoquitinasa, <i>QAM</i>)	7	5 inducidos, 2 reprimidos	-8.46 a +9.10
Metabolismo	Citocromos <i>P450</i>	99	Regulación mixta (≈54% reprimidos)	-12.26 a +9.82
Metabolismo	Monoxigenasas (<i>FMO/MAO</i>)	6	Mayoría inducida	-3.87 a +5.17
Metabolismo	Glutación S-transferasa (<i>GST</i>)	19	Mayoría reprimida	-9.91 a +6.78
Metabolismo	Esterasas y lipasas	29	Mixta, tendencia a la represión	-9.71 a +8.20
Metabolismo	Carboxilesterasas	26	Mixta, tendencia a represión	-10.37 a +7.41
Metabolismo	Deshidrogenasas de cadena corta (<i>SDR</i>)	9	Mixta	-10.22 a +5.89
Metabolismo	Aldehído deshidrogenasa (<i>ALDH</i>)	9	Mayoría inducida	-4.39 a +9.90
Metabolismo	Sulfotransferasas (<i>ST</i>)	12	Mixta	-4.62 a +6.42
Metabolismo	Galactosiltransferasa	7	Mayoría inducida	-8.76 a +20.64
Excreción	Transportadores <i>ABC</i>	10	Mayoría inducida	+1.27 a +9.22
Excreción	Transportadores <i>MFSD</i>	10	Mayoría inducida	-8.59 a +9.16
Defensas ROS	Catalasa	3	2 inducidos, 1 reprimido	-8.82 a +9.12
Defensas ROS	Superóxido dismutasa (<i>SOD</i>)	11	Mixta	-7.14 a +6.50
Defensas ROS	Tiorredoxina y peroxirredoxina	21	Mixta	-21.87 a +8.99
Otros	Receptor nuclear <i>AHR</i>	1	Inducido	10.04

13.14 ÁRBOL FILOGENÉTICO PARA CLASIFICACIÓN DE ACETILCOLINESTERASAS

A partir de los ensambles *de novo* específicos para las secuencias anotadas como acetilcolinesterasas, se llevó a cabo el análisis filogenético para poder clasificar las secuencias de *AChE* obtenidas. Las secuencias TRINITY ensambladas se agrupan con las diferentes referencias

13.15 ANÁLISIS DE PERFIL DE RESISTENCIA Y MECANISMOS INVOLUCRADOS EN LA RESISTENCIA MÚLTIPLE A ACARICIDAS.

Para poder establecer los mecanismos de la resistencia detoxificadora que observamos en *R. (B.) microplus*, se llevó a cabo una comparación profunda entre las cepas Rancho Nuevo, Vargas y Zacatecas, analizando tanto las mutaciones puntuales de los genes blanco de acaricidas, como el patrón de expresión diferencial de los mismos. La Tabla 29 representa un compendio de los resultados más relevantes para cada tipo de insecticida, resumiendo la presencia o ausencia de mutaciones, los cambios transcripcionales, y la posible contribución funcional de cada gen o familia génica. Dicha síntesis permite reconocer los puntos de diferenciación de los mecanismos de la resistencia que se pudo o no identificar entre cepas resistentes y susceptibles, siendo los mecanismos relacionados con acetilcolinesterasas y receptores *GABA*, aquellos que probablemente explican la resistencia observada.

Múltiples mutaciones en los genes de acetilcolinesterasa (*AChE1*, *AChE2* y *AChE3*) fueron detectadas en las tres cepas analizadas (Rancho Nuevo, Vargas y Zacatecas), lo que sugiere la existencia de un mecanismo de resistencia por sitio blanco a organofosforados y carbamatos como un mecanismo compartido, aunque diferentes entre cepas. No obstante, las cepas resistentes (Rancho Nuevo y Vargas) presentan represión consistente de *AChE3* y expresión diferencial compleja en transcritos de *AChE* no clasificada (donde incluimos probablemente splicing alternativo), lo que sugiere un papel central de la regulación de la expresión a nivel transcripcional y post-transcripcional en la resistencia.

Para otros blancos (*OCT/TYR*, β *AOR*, canales de sodio) no se observaron mutaciones ni expresión diferencial, lo que hace poco probable la resistencia por sitio blanco a piretroides o amidinas. En contrapartida, el receptor *GABA* estaba sobreexpresado en las cepas resistentes y podría contribuir a resistencia a fipronil, aun en ausencia de mutaciones.

En su conjunto, la resistencia toxicodinámica parece depender de:

Represión y variaciones estructurales en *AChE3*, cambios transcripcionales en *AChE* no clasificada, y sobreexpresión en el receptor *GABA* en cepas resistentes.

Tabla 29.- Tabla comparativa de los mecanismos relacionados a la toxicocinética de resistencia presentes en las cepas

Resistencia toxicodinámica					
	Sitio de acción		Rancho Nuevo	Vargas	Zacatecas
Amidinas	Receptores octopamina/tiramina (<i>OCT/TYR</i>)	de	Mutaciones: n.d. Expresión diferencial: n/a	Mutaciones: Expresión diferencial: n/a	Mutaciones: n.d. Expresión diferencial: n/a
	Receptores de octopamina de tipo β -adrenérgico (<i>βAOR</i>)	de	Mutaciones: n/a Expresión diferencial: n/a	Mutaciones: n/a Expresión diferencial: n/a	Mutaciones: n/a Expresión diferencial: Expresión basal
Carbamatos y Organofosforados	Acetilcolinesterasa 1		Mutaciones: - *A360T *T362M - Q488R - W571R - - Expresión diferencial: n/a	Mutaciones: - P157S - - - Q488R - *T576A *N583D Expresión diferencial: n/a	Mutaciones: - P157S *A360T *T362M - Q488R - W571R *T576A *N583D Expresión diferencial: Expresión basal
	Acetilcolinesterasa 2		Mutaciones: *A10T *E22K - - K558Q Expresión diferencial: n/a	Mutaciones: - - - - Expresión diferencial: Represión	Mutaciones: - *E22K *S396P - Expresión diferencial: Expresión basal
	Acetilcolinesterasa 3		Mutaciones: n.d. Expresión diferencial: Represión	Mutaciones: n.d. Expresión diferencial: Represión	Mutaciones: n.d. Expresión diferencial: Expresión basal
	Acetilcolinesterasa clasificar	sin	Mutaciones: n.d. Expresión diferencial: Expresión diferencial mixta, mayormente reprimida (20/24 transcritos) Probable splicing alternativo	Mutaciones: n.d. Expresión diferencial: Expresión diferencial mixta, mayormente reprimida (33/42 transcritos)	Mutaciones: n.d. Expresión diferencial: Expresión basal

			Probable alternativo	splicing
Piretroides	Canal de para sodio sináptico	Mutaciones: n.d. Expresión diferencial: n/a	Mutaciones: n.d. Expresión diferencial: n/a	Mutaciones: n.d. Expresión diferencial: n/a
Fipronil	Receptor de ácido Gama butírico.	Mutaciones: n/a Expresión diferencial: Sobreexpresión igual a la de Vargas	Mutaciones: n/a Expresión diferencial: Sobreexpresión igual a la de rancho nuevo	Mutaciones: n/a Expresión diferencial: Expresión basal

Tabla 30.- Tabla comparativa de los mecanismos de resistencia toxicodinámica encontrados en las cepas Vargas y Cepa rancho Nuevo.

Mecanismo de acción	Proteínas relacionadas	Vargas vs Susceptible	Rancho Nuevo vs Susceptible
Penetración	Proteínas de cutícula	10 transcritos	16 transcritos
	• Proteína de cutícula 16.8	Regulación mixta, mayormente reprimido (4/6 transcritos)	Regulación mixta, mayormente reprimido (5/6 transcritos)
	• Proteína de cutícula 10.9	Regulación mixta, mayormente reprimida (2/3)	Regulación negativa
	• Proteína de cutícula 14 isoforma a	Regulación negativa	Regulación mixta, mayormente reprimido (4/5 transcritos)
	Quitina sintasa	-	-
	Quitinasa	12 transcritos	7 transcritos
	• Endoquitinasa	Regulación mixta, mayormente reprimida (7/12)	Regulación mixta, mayormente Inducida (4/6)
	• Quitinasa acida de mamíferos	-	Regulado positivamente (1/1)
Metabolismo de xenobióticos (monooxigenasas)			
	Citocromo <i>p450</i> (12 clanes expresados)	61 transcritos totales	99 transcritos totales
	• Clan <i>CYP 3A</i>	Regulación mixta, mayormente reprimida (14/26)	Regulación mixta, mayormente reprimida (37/51)
	• Clan <i>CYP 5A</i>	Regulación mixta, mayormente reprimida (2/3)	Regulación Negativa (1/1)

	• Clan <i>CYP 6A</i>	Regulación mixta, mayormente Inducida (4/6)	Regulación mixta, mayormente Inducida (4/6)
	• Clan <i>CYP 17A</i>	Regulación mixta, mayormente Inducida (2/3)	Regulación mixta, mayormente Inducida (2/3)
	• Clan <i>CYP 4C</i>	Regulación mixta, mayormente Inducida (4/6)	Regulación mixta, mayormente Inducida (3/4)
	• Clan <i>CYP 4V</i>	Regulación mixta, mayormente reprimida (6/9)	Regulación mixta, mayormente Inducida (12/21)
	Monoxigenasas dependientes de flavina	3 transcritos	6 transcritos
	• <i>FMO 3</i>	Regulación positiva (1/1)	Regulación positiva (1/1)
	• <i>FMO 5</i>	Regulación Negativa (1/1)	Regulación mixta, mayormente Inducida (2/3)
	• <i>MAO</i>	-	Regulación positiva (1/1)
	• <i>MAO-B</i>	Regulación positiva (1/1)	Regulación positiva (1/1)
Glutación transferasa	s glutación S transferasa	15 transcritos	19 transcritos
	• <i>GTS</i>	-	Regulación Negativa (1/1)
	• <i>GTS 1</i>	Regulación Negativa (1/1)	Regulación Negativa (4/4)
	• <i>GTS 4</i>	Regulación Negativa (2/2)	Regulación Negativa (1/1)
	• <i>GTS D</i>	Regulación Negativa (1/1)	-
	• <i>GTS D5</i>	-	Regulación Negativa (1/1)
	• <i>GTS Mu1</i>	-	Regulación mixta (1/2) mayormente inducido
	• <i>GTS Mu2</i>	Regulación positiva (1/1)	-
	• <i>GTS Mu3</i>	Regulación Negativa (1/1)	Regulación Negativa (1/1)
	• <i>GTS Mu4</i>	Regulación Mixta, mayormente reprimido (2/4)	Regulación positiva (1/1)
	• <i>GTS Mu5</i>	Regulación Negativa (1/1)	Regulación Negativa (1/1)
	• <i>GTS Omega-1</i>	Regulación positiva (2/2)	Regulación positiva (1/1)
	• <i>GTS Zeta 1</i>	Regulación Negativa (1/1)	Regulación Mixta, mayormente reprimido (3/4)
	• <i>GTS Zeta 2</i>	Regulación Negativa (1/1)	Regulación Negativa (1/1)
	• <i>GTS C-terminal</i>	-	Regulación Negativa (1/1)
(Esterasas)	Lipasas	19 transcritos	25 transcritos

	• Lipasa triacilglicerol gástrica 2	Regulación Mixta, mayormente Inducida (1/2)	Regulación negativa (3/3)
	• Fosfolipasa A2	Regulación Positiva (1/1)	Regulación Positiva (2/2)
	• Fosfolipasa B1	-	Regulación Mixta, mayormente reprimida (8/11)
	• Fosfolipasa B2 putativa	Regulación Mixta, mayormente Inducida (6/12)	-
	• Fosfoinosito fosfolipasa C	Regulación Positiva (3/3)	Regulación Negativa (1/1)
	• Fosfolipasas, D1, D3	-	Regulación Negativa (2/2)
	• Fosfolipasas D (<i>GDPD1</i>)	Regulación Positiva (1/1)	-
	• Monoacilglicerol lipasa (<i>LIPE</i>)	Regulación Mixta, mayormente Inducida (1/2)	Regulación Positiva (1/1)
	• Monoacilglicerol lipasa	-	Regulación negativa (4/4)
	• Monoacilglicerol lipasa (<i>ABHD12</i>)	-	Regulación Negativa (1/1)
	Carboxilesterasas		
	• 3s-malil-CoA-tioesterasa	Regulación Positiva (2/2)	Regulación Positiva (2/2)
	• Acil-CoA-tioesterasa 9	Regulación Positiva (2/2)	Regulación Negativa (9/9)
	• Acil-proteína tioesterasa	-	Regulación Negativa (1/1)
	• Hot dog fold tioesterasa	-	Regulación Negativa (1/1)
	• Ubiquitin tioesterasas (10, 48, 34, 46, 36, 25, 35, <i>CYLD</i> , <i>ZRANB1</i> , <i>L5</i>),	Regulación Mixta, mayormente reprimida (6/12)	Regulación Mixta, mayormente reprimida (7/13)
	• Colinesterasas	Regulación Mixta, mayormente reprimida (3/5)	Regulación Mixta, mayormente reprimida (2/3)
(Deshidrogenasas)	Deshidrogenasas de cadena corta	7 transcritos	9 transcritos
	• Retinal <i>SDR 4</i>	Regulación Negativa (1/1)	Regulación Mixta, mayormente Positiva (3/5)
	• Retinol <i>SDR 7</i>	Regulación Mixta, mayormente Reprimida (3/4)	Regulación Negativa (3/3)
	• Retinol <i>SDR 11</i>	Regulación Positiva (1/1)	-
	• Retinol <i>SDR 2</i>	Regulación Negativa (1/1)	Regulación Negativa (1/1)
	Galactosiltransferasas (<i>GalTase</i>)		
	• Core_1_beta1,3- GalTase_1	Regulación Mixta, mayormente Inducida (2/3)	Regulación Mixta, mayormente Inducida (2/3)

	• Beta-1,4-GalTase_1	Regulación Mixta, mayormente reprimida (1/2)	Regulación Positiva (2/2)
	• Beta1,3- GalTase bre2	-	Regulación Positiva (1/1)
	• Procolageno GalTase	-	Regulación Negativa (1/1)
	Aldehído Deshidrogenasa (<i>ALDH</i>)	8 transcritos	9 transcritos
	• <i>ALDH</i> Familia 4 Miembro 1A	Regulación Negativa (1/1)	-
	• <i>ALDH</i> Familia 5 Miembro 1A	-	Regulación Positiva (3/3)
	• <i>ALDH</i> Familia 7 Miembro 1A	Regulación Mixta, mayormente Inducida (1/2)	Regulación Positiva (2/2)
	• <i>ALDH</i> Familia 8 Miembro 1A	Regulación Positiva (3/3)	Regulación Mixta, mayormente Inducida (3/4)
	Sulfotransferasas (<i>ST</i>)	11 transcritos	12 transcritos
	• <i>ST-1A1</i>	Regulación Negativa (1/1)	Regulación Negativa (3/3)
	• <i>ST-1B1</i>	Regulación Mixta, mayormente reprimida (3/4)	Regulación Negativa (4/4)
	• <i>ST-2B1</i>	Regulación Positiva (1/1)	-
	• <i>ST-3A1</i>	-	Regulación Negativa (1/1)
	• carbohidrato- <i>ST I</i>	Regulación Negativa (1/1)	Regulación Positiva (2/2)
	• carbohidrato- <i>ST II</i>	Regulación Positiva (1/1)	-
	• Heparán sulfato 2-O-ST_1	Regulación Positiva (1/1)	-
	• Heparán sulfato glucosamina 3-O	Regulación Positiva (1/1)	Regulación Positiva (1/1)
	• Hidroxiesteroide-ST 2	Regulación Negativa (1/1)	-
Transporte/excreción	Cassete <i>ABC</i>		
	• <i>ABC</i> Subfamilia A Miembro 1	Regulación Mixta, mayormente Inducida (1/2)	Regulación Positiva (1/1)
	• <i>ABC</i> Subfamilia A Miembro 3	Regulación Mixta, mayormente Inducida (2/3)	Regulación Positiva (2/2)
	• <i>ABC</i> Subfamilia C Miembro 1	Regulación Mixta, mayormente Inducida (4/5)	Regulación Positiva (4/4)
	• <i>ABC</i> Subfamilia C Miembro 4	Regulación Positiva (1/1)	-
	• <i>ABC</i> Sub-familia F Miembro 2	-	Regulación Mixta, mayormente Inducida (2/3)
	Superfamilia de Facilitadores mayores		

	• <i>MFSD prot 1</i>	Regulación Mixta, mayormente Inducida (2/4)	Regulación Positiva (2/2)
	• <i>MFSD prot 4B</i>	-	Regulación Positiva (1/1)
	• <i>MFSD prot 6</i>	Regulación Positiva (2/2)	Regulación Positiva (1/1)
	• <i>MFSD prot 11</i>	Regulación Mixta, mayormente Inducida (1/2)	Regulación Mixta, mayormente Inducida (1/2)
	• <i>MFSD prot 12</i>	Regulación Negativa (1/1)	-
	• <i>MFSD prot 14A</i>	Regulación Mixta, mayormente Inducida (1/2)	Regulación Mixta, mayormente Inducida (2/3)
Respuesta de estrés oxidativo	Catalasa	Regulación Positiva (1/1)	Regulación Mixta, mayormente Inducida (2/3)
	Super oxido dismutasa		
	• <i>SOD [Cu-Zn]</i>	Regulación Mixta, mayormente Reprimida (5/6)	Regulación Mixta, mayormente Reprimida (4/5)
	• <i>SOD [Cu-Zn] 1</i>	Regulación Positiva (1/1)	-
	• <i>SOD [Cu-Zn] 2</i>	Regulación Mixta, mayormente Inducida (1/2)	Regulación Negativa (1/1)
	• <i>SOD [Mn]</i>	Regulación Negativa (1/1)	Regulación Negativa (1/1)
	• Chaperona <i>SOD Cu</i>	Regulación Positiva (1/1)	Regulación Mixta, mayormente Inducida (3/4)
	Sistema tiorredoxina-peroxirredoxina	30 transcritos	25 transcritos
	Nucleorredoxina y tiorredoxina reductasa	7 transcritos	9 transcritos
	• Tiorredoxina reductasas 2	Regulación Mixta, mayormente Reprimida (2/3)	Regulación Mixta, mayormente Reprimida (3/4)
	• Proteína tipo Nucleorredoxina 2	Regulación Mixta, mayormente Inducida (2/4)	Regulación Mixta, mayormente Inducida (3/5)
	• Probable Nucleorredoxina 1	Regulación Negativa (1/1)	-
	Peroxirredoxina	13 transcritos	3 transcritos
	• Peroxirredoxina 2	Regulación Negativa (3/3)	-
	• Peroxirredoxina 3	Regulación Mixta, mayormente Inducida (4/7)	Regulación Positiva (1/1)
	• Peroxirredoxina 4	Regulación Mixta, mayormente Reprimida (2/3)	Regulación Negativa (2/2)
	Tiorredoxina	10 transcritos	13 transcritos

• proteína tipo tiorredoxina 1	Regulación Positiva (1/1)	Regulación Positiva (1/1)
• proteína tipo tiorredoxina 2	Regulación Positiva (1/1)	-
• proteína tipo tiorredoxina 4A	Regulación Negativa (1/1)	Regulación Negativa (1/1)
• Tiorredoxina	-	Regulación Mixta, mayormente Reprimida (2/3)
• proteína con dominio tiorredoxina	Regulación Positiva (1/1)	Regulación Mixta, mayormente Inducida (2/3)
• proteína con dominio tiorredoxina 9	Regulación Mixta, mayormente Inducida (2/3)	Regulación Mixta, mayormente Inducida (3/4)
• proteína con dominio tiorredoxina 15	Regulación Positiva (1/1)	-
• proteína con dominio tiorredoxina 17	Regulación Mixta, mayormente Inducida (1/2)	Regulación Positiva (1/1)
Reguladores transcripcionales		
• Receptor nuclear de hidrocarburos de translocador	Regulación Positiva (2/2)	Regulación Positiva (1/1)

La Figura 27 muestra la expresión diferencial de genes, así como también las mutaciones asociadas a la resistencia toxicológica para los individuos muestreados. En el panel izquierdo se muestran los conteos de transcritos implicados en los mecanismos de desintoxicación, como los receptores neuronales, los canales iónicos y las diversas variantes de las proteínas *Ache1* y *Ache2*, mientras que en el panel de la derecha se producen los cambios en la expresión que son representados por los valores de log₂ fold change (LFC) referidos en relación con la situación control. De manera que se puede observar, en comparativa, la tipicidad de expresión del conjunto de genes en cada una de las poblaciones analizadas. Se proporciona un panorama integral de los componentes moleculares implicados en la respuesta a insecticidas. Al comparar patrones de sobreexpresión, represión y presencia de mutaciones específicas, es posible identificar rutas metabólicas y blancos moleculares que podrían estar modulando los niveles de resistencia entre las tres cepas evaluadas.

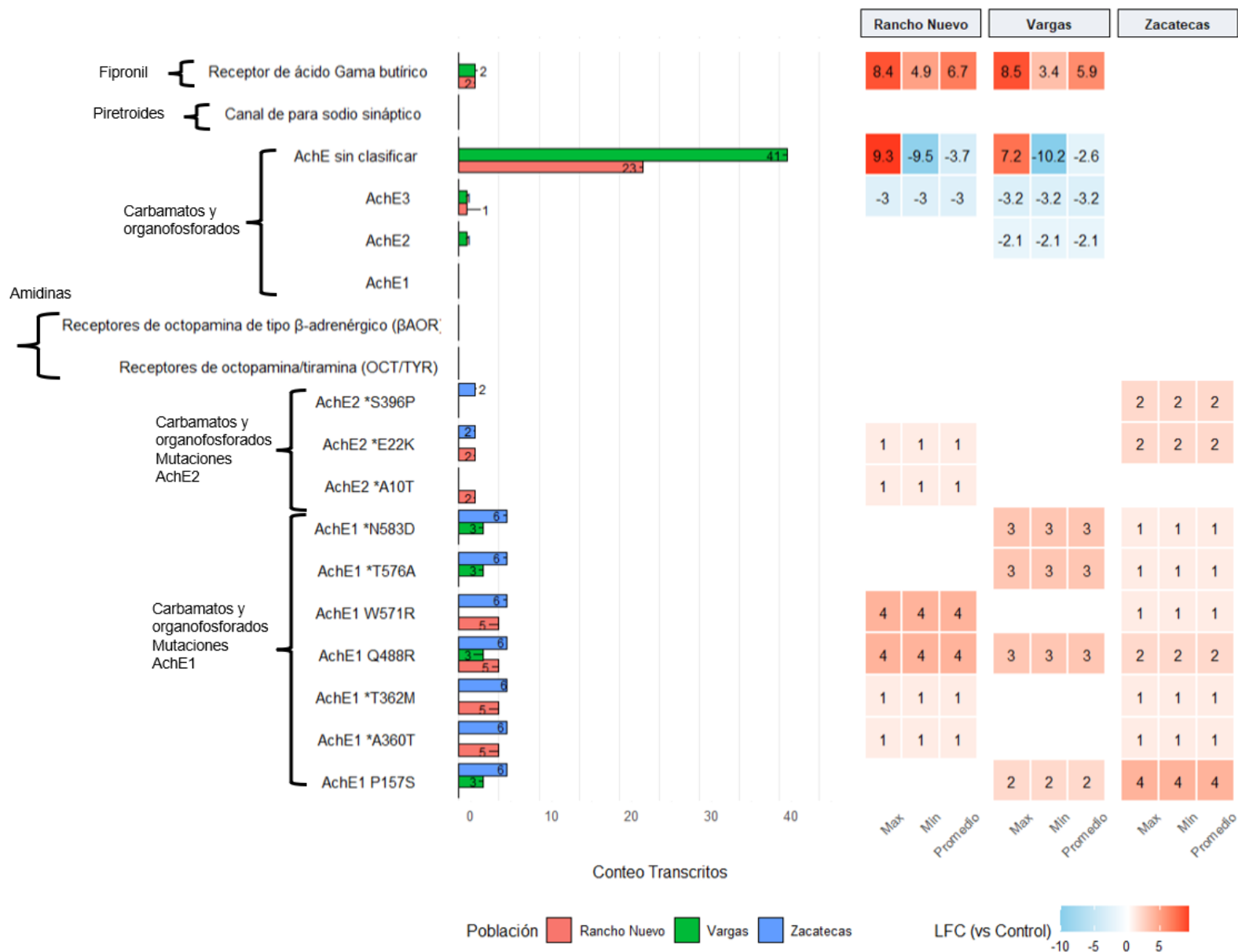
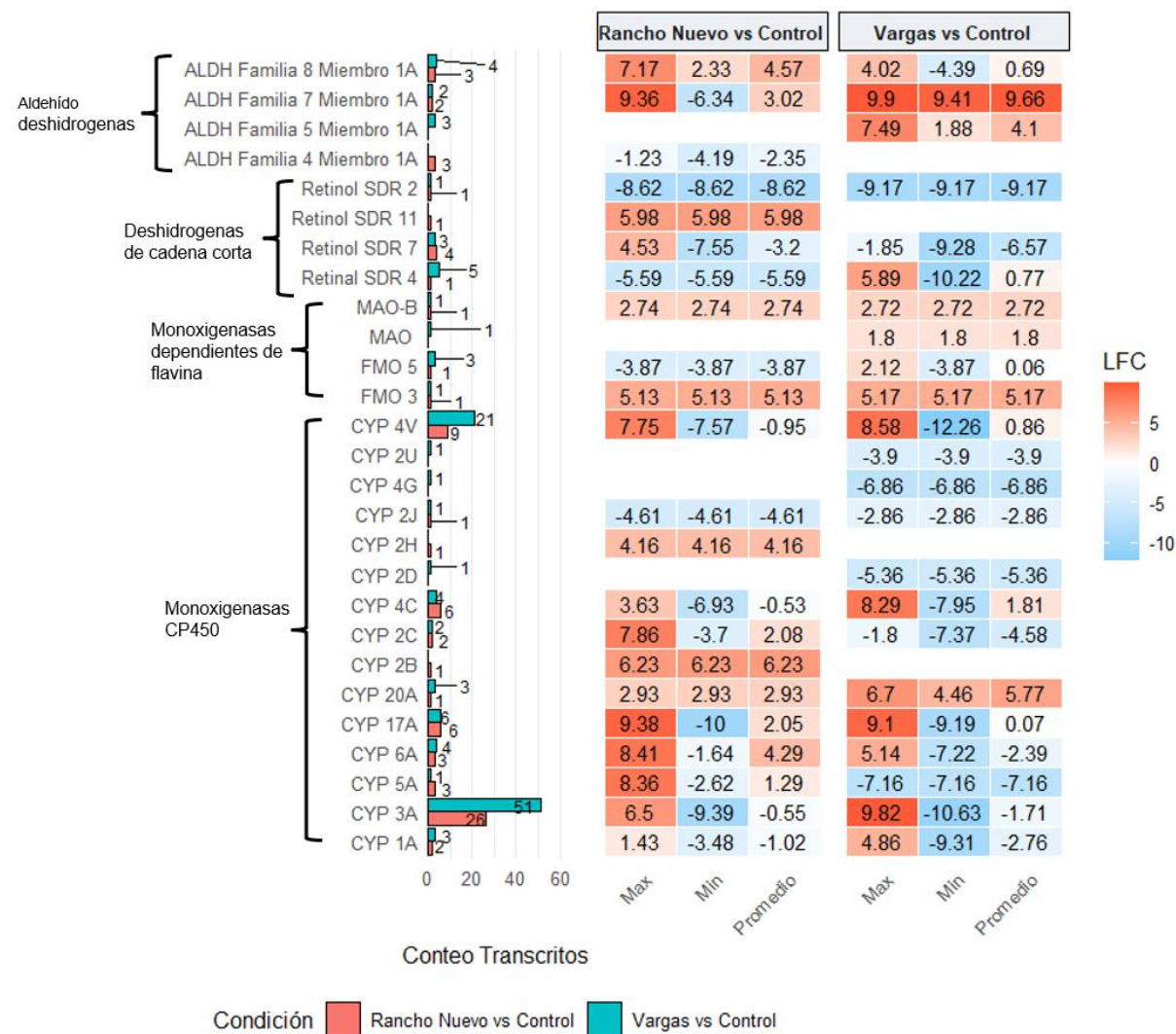


Figura 27.-Gráfico de calor que describe la expresión diferencial de moléculas relacionadas con la resistencia toxicodinámica y las mutaciones que se encontraron en las proteínas de AchE1 y AchE, gráfico realizado con lenguaje R y paquetería ggplot

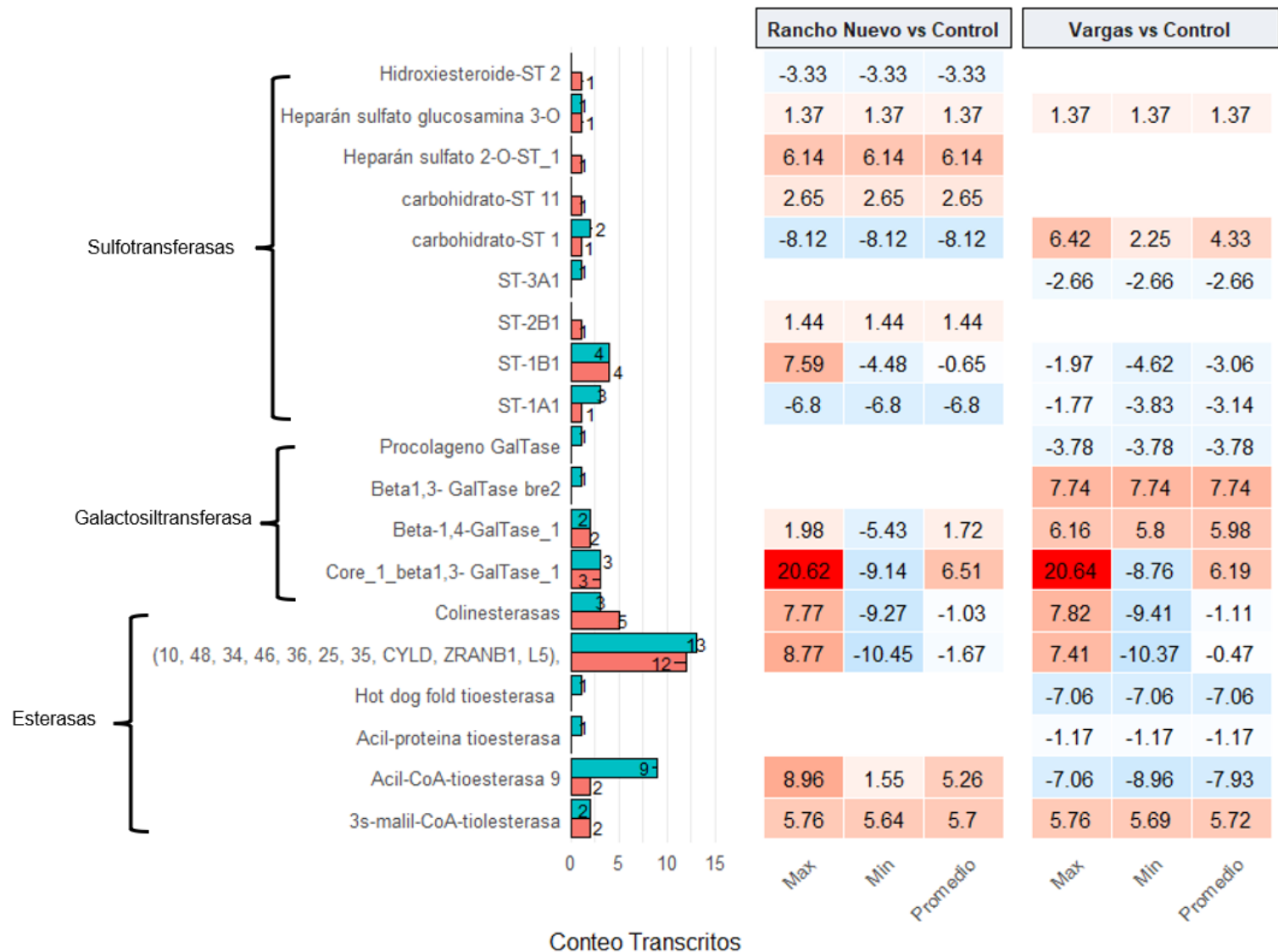
En la Figura 28 se muestra una comparación en la respuesta de la expresión diferencial en enzimas envoltantes desde un punto de vista de la desintoxicación metabólica en las dos cepas multirresistentes de ácaros (Rancho Nuevo y Vargas) respecto al grupo control; gráficamente se presentan tanto los conteos de transcritos (panel de la izquierda) como los valores de cambio de la expresión (LFC) asociados a cada condición (panel de la derecha) y presenta una visualización simultánea de la abundancia y regulación de genes candidatos desde el punto de vista de las rutas de detoxificación. En la Figura 28 se distinguen claramente cuatro grandes familias enzimáticas involucradas en la biotransformación de xenobióticos: aldehído deshidrogenasas (*ALDHs*), deshidrogenasas de cadena corta (*SDRs*), monoxigenasas dependientes de flavina (*FMO*) y monoxigenasas del citocromo P450 (*CYP450*). Estas enzimas participan en procesos críticos como la oxidación, reducción y detoxificación de compuestos tóxicos, y suelen estar implicadas en mecanismos de resistencia metabólica.

Figura 28.-Gráfico de mapa de calor que hace la comparativa entre ambas cepas multirresistentes a acaricidas (Rancho Nuevo y Vargas) y su expresión diferencial de enzimas involucradas en la desintoxicación metabólica, donde se encuentran las Aldehído deshidrogenasas, deshidrogenasas de cadena corta, monoxigenasas dependientes de flavina y monoxigenasas CYP450, gráfico creado con lenguaje R y paquetería ggplot.



En la Figura 29 se muestra una comparación de la expresión diferencial de tres familias enzimáticas clave responsables de la desintoxicación metabólica, sulfotransferasas, galactosiltransferasas y esterasas, en las dos cepas multirresistentes (Rancho Nuevo y Vargas) frente al grupo control. En el panel izquierdo se muestran los conteos de transcritos de cada gen y en el panel derecho los patrones de regulación, a través de los valores de log₂ fold change (LFC). La sobreexpresión de varias esterasas y la regulación diferencial de sulfotransferasas sugieren una activación selectiva de rutas de detoxificación, lo que podría contribuir a los fenotipos de resistencia observados

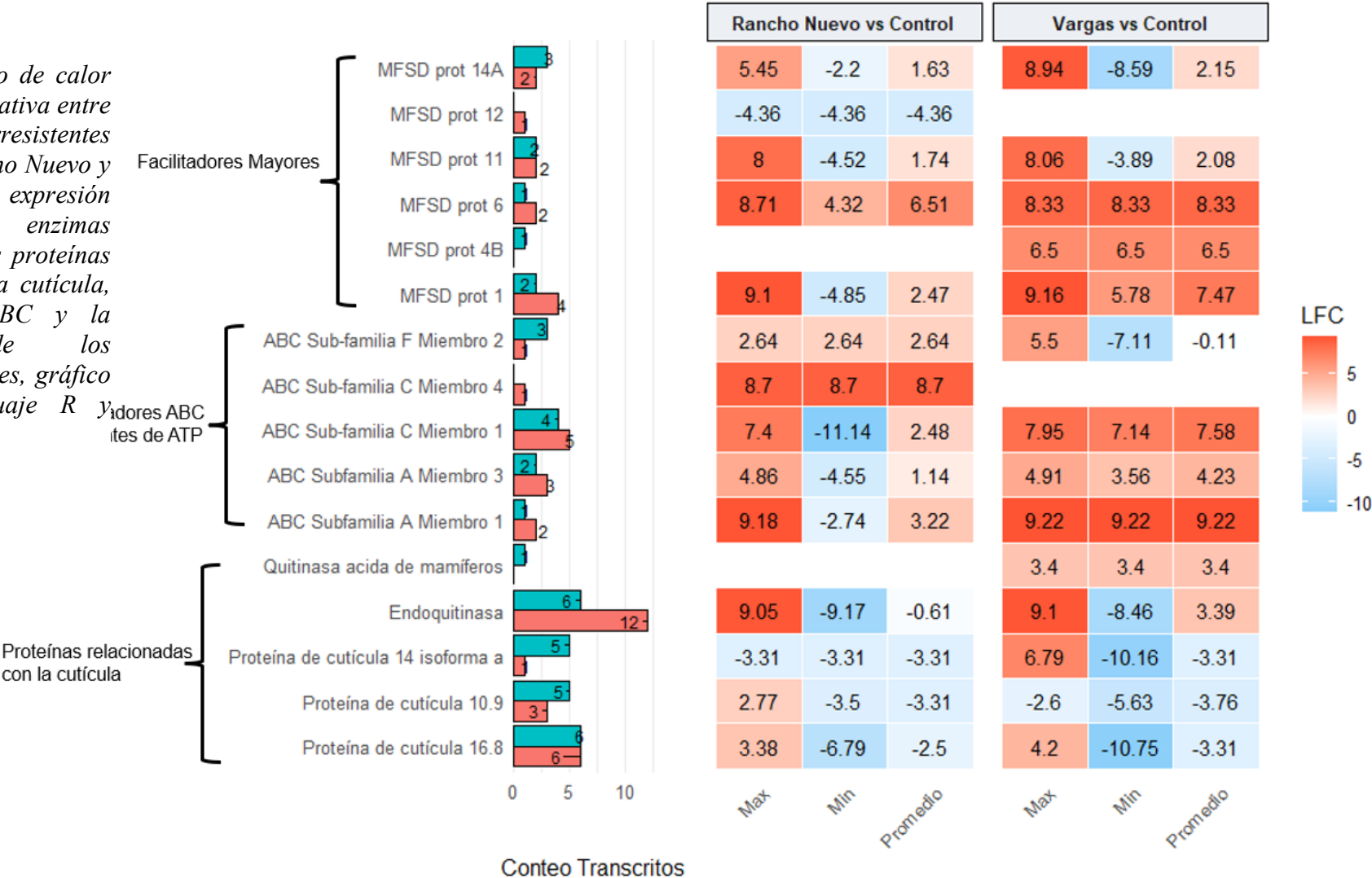
Figura 29.-Gráfico de mapa de calor que hace la comparativa entre ambas cepas multirresistentes a acaricidas (Rancho Nuevo y Vargas) y su expresión diferencial de enzimas involucradas en la desintoxicación metabólica, donde se encuentran las Sulfotransferasas, Galactosiltransferasas y Esterasas, gráfico creado con lenguaje R y paquetería ggplot.



En la Figura 30 se muestran los facilitadores mayores (MFSD), con familia de transportadores involucrados en el movimiento transmembranal de metabolitos y compuestos tóxicos. Transportadores ABC dependientes de ATP, responsables del mecanismo de expulsión activa de xenobióticos, y que mudan en resistencia metabólica. Proteínas de la cutícula, entre ellas quitinasas y proteínas específicas de cutícula que pueden estar involucradas en procesos de rigidización, remodelación estructural o como barreras protectoras de compuestos químicos.

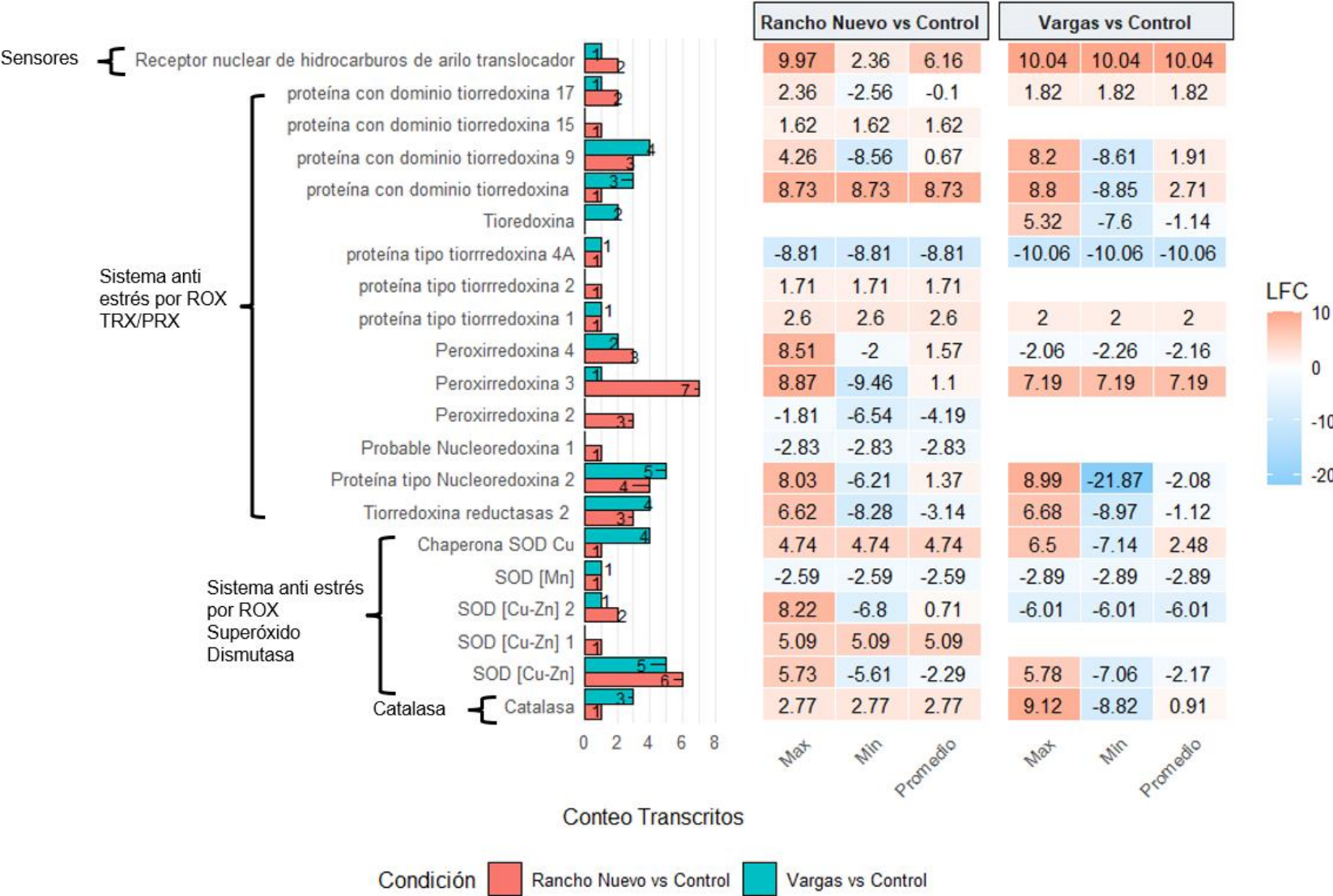
En conjunto se puede ver diferencias evidentes entre ambas cepas de resistencia, como la sobreexpresión de varios genes, así como la diversidad de las proteínas de la cutícula que podrían tener un papel modulador en la permeabilidad y protección de los acaricidas. Estos patrones sugieren sinergia en el transporte/expulsión de tóxicos y modificación de la cutícula que contribuyen al fenotipo que se observa en las poblaciones resistentes.

Figura 30.- Gráfico de calor que hace la comparativa entre ambas cepas multirresistentes a acaricidas (Rancho Nuevo y Vargas) y su expresión diferencial de enzimas involucradas en las proteínas relacionadas con la cutícula, transportadores ABC y la superfamilia de los facilitadores mayores, gráfico creado con lenguaje R y paquetería ggplot.



En el gráfico 31 se muestran patrones diferenciados de regulación entre las dos cepas resistentes, con variaciones notables tanto en tioredoxina y peroxirredoxina como en enzimas detoxificantes clásicas como *SOD* y catalasa. La sobreexpresión de ciertos genes y la represión marcada de otros sugieren que cada cepa emplea estrategias antioxidantes particulares para contrarrestar el estrés oxidativo inducido químicamente. Estos perfiles diferenciales pueden contribuir al fenotipo de resistencia y a la tolerancia celular frente a compuestos generadores de ROS.

Figura 31.-Gráfico de calor que hace la comparativa entre ambas cepas multirresistentes a acaricidas (Rancho Nuevo y Vargas) y su expresión diferencial de enzimas involucradas en la respuesta a especies reactivas de oxígeno ROS, donde se encuentra la catalasa, sistema tioredoxina peroxirredoxina, superóxido dismutasa y del sensor nuclear de hidrocarburos de arilo translocador, gráfico creado con lenguaje R y paquetería ggplot.



14. DISCUSIÓN

14.1 EXTRACCIÓN Y SECUENCIACIÓN

La extracción de ARN total de las tres cepas analizadas cumplió con los criterios establecidos por la Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva y Bioinformática), superando los $>3\mu\text{g}$ por 50 μl requeridos. Sin embargo, el número de integridad del ARN (RIN por sus siglas en inglés), que idealmente debe ser ≥ 8 según Illumina, (2017), no se pudo determinar correctamente debido a que la señal correspondiente a la subunidad ribosomal 28S fue igual a cero en los electroferogramas.

Este patrón coincide con lo reportado por Mueller *et al.*, (2016), quienes concluye que el colapso o desnaturalización de las subunidades ribosomales 18s y 28s, es un fenómeno común en los artrópodos, dando lugar a una única banda en el análisis por electroforesis capilar. En este estudio no se observaron signos de degradación, por lo que se atribuye a la pérdida de esta señal a dicho fenómeno, por lo tanto, las muestras presentaron una óptima integridad y calidad de la extracción, siendo aptas para la secuenciación masiva.

La corrida de secuenciación generó un total de 139,645,928 lecturas, correspondientes a 10.410 Gb (Giga bases) de datos, con una longitud promedio de lectura de 74.5 pb y una calidad promedio Phred de 34.55. Tras aplicar los filtros de calidad, se conservaron 138,217,916 lecturas (98,98%), descartando únicamente el 1.02% por debajo del umbral de calidad, lo cual indica una corrida de alta calidad y adecuada para ensamble y análisis transcriptómico.

14.2 RECONSTRUCCIÓN DE LOS TRANSCRITOS

Varios programas de ensamblaje *de novo* y mapeo a referencia, fueron evaluados, las puntuaciones normalizadas obtenidas fueron: Trinity-BG (Trinity bam guided) 7.2; Trinity 6.5, Trans-ABYSS 5.6 y RnaSPAdes 5.4. Para alineadores de referencia, Star obtuvo 9.5; Bwa 6.7; Gem_mapper 4.4 y Bowtie2 1.8.

A pesar de que STAAR presentó mayor puntuación de mapeo de referencia, la tasa de lecturas asignadas fue significativamente menor en comparación con el ensamblado *de novo*: usando STAR, solo el 31.21% de las lecturas se asignaron a transcritos, mientras que Salmon en combinación con el ensamblaje Trinity Bam-guided se logró asignar del 92.6% de lecturas. Esta diferencia de 61.4% indica que Trinity Bam-guided combinado con Salmon fue el enfoque más eficiente y adecuado para la reconstrucción de transcritos en este estudio.

Respecto a los genes blanco de acaricidas, se logró ensamblar 4 de 7 moléculas diana buscadas: acetilcolinesterasa 1 (*AchE1*), acetilcolinesterasa 2 (*AchE2*), el receptor de ácido gama aminobutírico (*GABA-R*) y el receptor beta adrenérgico/octopaminérgico. En contraste, no se logró ensamblar acetilcolinesterasa 1 (*AchE3*), el receptor tiramina/octopamina ni el canal sodio presináptico, presumiblemente por baja expresión y escasa cobertura de lectura en estas regiones.

El ensamblaje produjo diversas isoformas por transcrito, con un rango de 1 a 6 por cepa. Lo que refleja la existencia de splicing alternativo y una compleja regulación post-transcripcional en estas moléculas clave.

14.3 EXPRESIÓN DIFERENCIAL

Los resultados del análisis de expresión diferencial sugieren una respuesta transcriptómica robusta y específica al fenotipo de resistencia observado en las cepas bajo estudio. La consistencia

de estos datos se evidencia inicialmente en el análisis de componentes principales (PCA), donde los dos primeros componentes explicaron el 84% de la varianza total, la alta cohesión observada entre replicas biológicas valida la metodología de obtención de muestras y el proceso de extracción de ARN de organismos completos.

La clara segregación de la cepa Vargas a lo largo del PC1 (45%) sugiere una firma transcriptómica única en sus mecanismos de respuesta a resistencia a acaricidas, complementariamente el análisis de escalamiento multidimensional (MDS) permitió visualizar la agrupación en términos de distancia transcriptómica ($\log_2FC$), mostrando congruencia con la agrupación triple entre replicas biológicas.

Por otro lado, el análisis del agrupamiento jerárquico (mapa de calor) confirmó el patrón distintivo entre las réplicas de la cepa Vargas, sin embargo se observaron divergencias puntuales en las réplicas de la cepa Rancho nuevo y Vargas, donde la réplica Rancho nuevo superó los 20 millones de lecturas, proporcionando a la muestra una mayor resolución técnica que permitió capturar los transcritos de baja abundancia compartidos con la cepa resistente, los cuales no fueron detectados con las réplicas de menor profundidad, por el contrario la menor profundidad de la réplica Zacatecas 3 pudo haber limitado la detección molecular de estos detalles, influyendo su posición dentro del dendrograma.

Esta homogeneidad entre replicas, así como la segregación por cepas confirman diferentes firmas moleculares del fenotipo resistente, esto refuerza lo planteado por Feyereisen *et al.* (2015a) quien señala que la resistencia es un fenómeno multifactorial que involucra diferentes mecanismos y niveles de regulación molecular.

La magnitud de la respuesta diferencial de transcritos en la comparación de cepas, con 13,310 DETs en la cepa rancho nuevo y 14,174 DETs en la cepa Vargas con respecto a la cepa susceptible, evidencian una reprogramación transcriptómica del organismo consistente en poblaciones resistentes. En ambos casos el predominio de la regulación positiva (53.28% y 58.53%) sugiere que, a pesar de la diferencia geográfica de las cepas, estas comparten una estrategia biológica basada en la activación coordinada de diferentes mecanismos de resistencia y defensa para contrarrestar la presión selectiva de los acaricidas.

A pesar de la robustez del ensamble, se observó una proporción de transcritos sin anotación funcional (60.14% y 59.36%), este fenómeno es atribuible en organismos no modelos y a la probable presencia de genes específicos del taxón, no obstante, este grupo de transcritos DETs sin caracterizar muestra la complejidad del genoma de *R. (B.) microplus*, así como una oportunidad para el descubrimiento de nuevos mecanismos moleculares involucrados en la resistencia a acaricidas. A partir de la identificación de estos transcritos anotados, se procedió a realizar análisis funcionales específicos. Estos permitieron correlacionar la firma molecular de cada cepa con los mecanismos de resistencia observados y reportados en la literatura.

14.4 RESISTENCIA TOXICODINÁMICA (INTERACCIÓN CON EL SITIO DE ACCIÓN)

La resistencia toxicodinámica se define como los cambios en la interacción entre un acaricida y su sitio de acción (molécula diana). Generalmente, este fenómeno es provocado por dos tipos de mecanismos principales: modificaciones estructurales debido a mutaciones puntuales en regiones sensibles del gen/proteína y cambios en la abundancia de dichas moléculas, ya sea por sobreexpresión. En este estudio se observaron mutaciones reportadas en la literatura, así como la sobreexpresión en moléculas diana, estos hallazgos se discuten detalladamente a continuación:

14.4.1 ACETILCOLINESTERASAS – RESISTENCIA A ORGANOFOSFORADOS Y CARBAMATOS

Con el objetivo de evaluar la resistencia toxicodinámica a organofosforados y carbamatos, se analizaron los transcritos ensamblados anotados como *AChE1*, *AChE2*, *AChE3* y *AchE*, los cuales representan las principales moléculas diana de estos acaricidas, el análisis se centró en la identificación de polimorfismos y en la cuantificación de sus niveles de expresión como se muestra a continuación:

Acetil colinesterasa 1 (*AChE1*):

Un total de 7 mutaciones se identificaron, de las cuales tres ya habían sido reportadas previamente (P157S, Q488R y W571R) (Temeyer *et al.*, 2019), mientras que las 4 mutaciones restantes se describen por primera vez en este estudio (A360T, T362M T576A y N583D). Sin embargo, la presencia de estas mutaciones en la cepa susceptible Zacatecas, sugiere que corresponden polimorfismos neutros, derivados de la variabilidad de la población y no a mecanismos de resistencia. Por lo tanto, no puede considerarse marcadores confiables de resistencia toxicodinámica. Así mismo la ausencia de transcritos expresados diferencialmente refuerzan que la participación de esta enzima en poblaciones resistentes es nula.

Acetil colinesterasa 2 (*AChE2*):

Cuatro polimorfismos se encontraron, destacando la variante K558Q (Temeyer *et al.*, 2019), la cual estuvo presente exclusivamente en la cepa Rancho Nuevo, al igual que la mutación A10T, descubierta en este estudio. Ambas variantes son las candidatas sólidas a conferir resistencia toxicodinámica, no obstante, su papel funcional requiere validación experimental, tal como sugieren Guest *et al.*, (2019). Por otro lado, las mutaciones E22K y S396P encontradas en este estudio, mostraron ser mutaciones neutras, por lo cual no hay evidencia que relacione estas mutaciones con fenómenos de resistencia. En cuanto la expresión diferencial, la cepa Vargas mostró regulación negativa contrario a lo reportado por Cossio-Bayugar *et al.*, (2024) quienes hallaron una sobreexpresión en cepas resistentes a organofosforados, la cepa Rancho nuevo no presentó ningún tipo de regulación para esta molécula.

Acetil colinesterasa 3 (*AChE3*):

Debido a los bajos niveles de expresión de esta molécula, no fue posible realizar el ensamble *de novo* para detectar polimorfismos reportados en literatura (Temeyer *et al.*, 2006, 2007), sin embargo, estas moléculas presentaron una regulación negativa en ambas cepas con respecto a la cepa control, lo cual sugiere un mecanismo de resistencia enfocado regular negativamente transcritos de genes parálogos específicos (como *AChE3*) que podrían ser más susceptibles al efecto antagonista, permitiendo que la función específica de la enzima sea realizada por variantes con menor afinidad al acaricida.

Acetil colinesterasas sin clasificar (*AchE*)

Adicionalmente, en ambas cepas resistentes se detectó un número elevado de transcritos anotados como acetilcolinesterasas (41 DETs para la cepa Vargas y 23 DETs para rancho nuevo) con baja similitud a *AChE1*, *AChE2* y *AChE3* de acuerdo el análisis filogenético del ensamble *de novo* de estas moléculas, esta divergencia sugiere la presencia de una familia extendida de estas enzimas, cuya relevancia en el fenotipo de resistencia a insecticidas merece mayor exploración.

Este patrón sugiere:

- La existencia de isoformas no caracterizadas,
- La participación de esterasas divergentes, y
- Posibles eventos de splicing alternativo como mecanismo regulatorio.

La validación funcional de estos transcritos es necesaria para determinar si representan nuevas acetilcolinesterasas adaptativas o enzimas accesorias en la resistencia a OPs y carbamatos.

En cuanto el perfil de expresión, la cepa Rancho nuevo tuvo 4 (16.66%) transcritos regulados positivamente, con valores altos de $\log_2FC$ de 9.28 a 4.22; los 20 transcritos restantes 20 (83.33%) presentaron una regulación negativa. Mientras que Vargas tuvo 9 (21.95%) transcritos regulados positivamente y 32 (78.05%) con regulación negativa. Estos genes sobreexpresados se perfilan como candidatos robustos para ser biomarcadores de resistencia funcionando como mecanismo de resistencia compensatorio consistente con lo propuesto por Kwon *et al.*, (2012), En contraste, los transcritos regulados negativamente podrían presentar un mecanismo compensatorio, donde las isoformas más sensibles al acaricida son silenciadas para minimizar la susceptibilidad toxicodinámica del organismo, como lo menciona

14.4.2 RECEPTOR GABA – RESISTENCIA A FIPRONIL

Los estudios previos han identificado mutaciones clave asociadas a resistencia al fipronil en el receptor GABA, tal como A285S, en el gen *Rdl*, asociadas con la insensibilidad del sitio diana (Castro-Janer *et al.*, 2021; Guest *et al.*, 2019; Hope *et al.*, 2010b). Sin embargo, en este estudio no se detectaron dichas variantes polimórficas en las cepas resistentes. En contraste, el perfil transcriptómico mostró la sobreexpresión de canales de cloruro activados por ácido gamma aminobutírico (GABA-Cl) en ambas cepas resistentes, dicha sobreexpresión de estos canales. Este hallazgo descarta el mecanismo de insensibilidad del sitio activo y confirma el mecanismo de resistencia toxicodinámica de sobreexpresión del sitio diana (De Rouck *et al.*, 2023; Feyereisen *et al.*, 2015a; Kwon *et al.*, 2012), el cual, al incrementar la densidad de receptores en la membrana presináptica, el organismo eleva el umbral crítico necesario para que el acaricida logre una inhibición de su sitio diana, del mismo modo, Estos resultados confirman la coexistencia de múltiples estrategias adaptativas, sustentando el modelo de resistencia multifactorial descrito por Feyereisen *et al.*, (2015), La validación funcional mediante sistemas expresión heteróloga, ensayos de unión (biding) y cinética de inhibición será necesaria para cuantificar la contribución específica al fenotipo de resistencia en las cepas analizadas.

14.4.3 RECEPTORES DE OCTOPAMINA/TIRAMINA Y RECEPTORES B-ADRENÉRGICOS – (AMIDINAS) Y CANALES DE SODIO DEPENDIENTES DE VOLTAJE (PIRETROIDES)

Para las amidinas, como el amitraz, los mecanismos toxicodinámicos descritos incluyen mutaciones en el receptor de octopamina/tiramina (*OCT/TYR*) y en el receptor β -adrenérgico de octopamina (*β AOR*) (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2022; Rinkevich *et al.*, 2023; Takata *et al.*, 2020).

En este estudio el análisis de variantes en el receptor β -adrenérgico:

- No se encontraron mutaciones conocidas.
- No se detectaron nuevas mutaciones

Complementariamente, el análisis de expresión diferencial no mostró cambios significativos en los niveles de los transcritos relacionados con esta molécula diana en ninguna de las poblaciones analizadas. Estos resultados indican que la resistencia a amidinas en las cepas no está vinculada a mecanismos toxicodinámicos descritos en la literatura, por el contrario, la resistencia sería mejor explicada por los mecanismos toxicocinéticos. Estos permitirían una mayor capacidad de detoxificación o degradación de las amidinas otorgando así la supervivencia de la cepa frente a la exposición al acaricida.

Para las amidinas y los piretroides, las moléculas diana receptor de octopamina/tiramina (*OCT/TYR*) y el canal de sodio dependientes de voltaje (Nav), no se logró el ensamble específico a partir de los transcritos, Esta limitación se atribuye a la baja abundancia relativa de estas lecturas observadas en las 3 cepas analizadas, es probable que la señal de estos genes, cuya expresión es predominante tejido-específica del sistema nervioso, se encuentre diluida frente a transcritos de tejidos metabólicamente más activos, no obstante, la ausencia de una señal robusta sugiere que el fenotipo de resistencia en estas poblaciones dependan más de los mecanismos toxicocinéticos de los cuales se detallan a continuación.

14.5 RESISTENCIA TOXICOCINÉTICA

La resistencia toxicocinética comprende los mecanismos mediante los cuales un organismo reduce la concentración efectiva de un acaricida antes de que este alcance su sitio diana. Este fenómeno involucra alteraciones coordinadas en los procesos de absorción, distribución, metabolismo y excreción de moléculas xenobióticas (Abbas et al., 2014; Agwunobi et al., 2021; Cossío-Bayúgar et al., 2021; Miranda-Miranda et al., 2023; Feyereisen et al., 2015a; Obaid et al., 2022). En artrópodos, se han descrito la participación de diversas familias de enzimas que intervienen en estos procesos adaptativos, no obstante, en el presente estudio se detectaron enzimas que actúan como sensores moleculares, y enzimas involucradas en etapas finales de la respuesta de estrés oxidativo. La identificación de estos componentes amplía la perspectiva tradicional de la resistencia, sugiriendo que la respuesta adaptativa, no solo depende de la degradación del toxico, si no de una regulación sensorial fina y una robusta protección contra el daño colateral derivado del metabolismo oxidativo.

14.5.1 ABSORCIÓN

El primer nivel de defensa en la resistencia toxicocinética es la barrera física de la cutícula, cuya estructura puede influir en la tasa de absorción de acaricidas (Balabanidou *et al.*, 2016a; Remedio *et al.*, 2015; Sun *et al.*, 2024). Algunos artrópodos emplean estrategias como engrosamiento de la cutícula y la sobreexpresión de proteínas de cutícula (Huang *et al.*, 2018; Lilly *et al.*, 2016; Mavridis *et al.*, 2025).

En este estudio se identificaron cambios de expresión en genes relacionadas a la arquitectura de la cutícula, como lo son las proteínas de cutícula (10.9, 14 isoforma a y 16.8), así como en

endoquitinasas y una quitinasa ácida de mamíferos. A diferencia de los mecanismos tradicionales reportados, donde se menciona un engrosamiento de la cutícula mediado por la sobreexpresión de la quitina sintasa, este estudio sugiere un proceso de remodelación cuticular.

Este proceso de modulación selectiva, donde ciertas isoformas de proteínas de la cutícula presentan una regulación positiva apuntan a una estrategia de recambio estructural. Bajo este modelo, el organismo favorecería la integración de proteínas que reduzcan la permeabilidad al acaricida (Balabanidou *et al.*, 2018b), mientras que la presencia de las endoquitinasas sugiere la degradación controlada de la matriz de la cutícula para poder permitir este reordenamiento, en lugar de solo engrosar la cutícula agregando más quitina, este proceso de adaptación sugiere una medida eficiente para la reducir la penetración sin comprometer la flexibilidad o el costo energético del organismo (Arakane & Muthukrishnan, 2009; Rabadiya & Behr, 2024)

14.5.2 SENSOR DE XENOBIÓTICOS

La regulación de la respuesta metabólica frente a condiciones de exposición a acaricidas depende de mecanismos de control transcripcional altamente específicos. Existen moléculas que actúan como sensor químico que, al activarse por ligandos de xenobióticos específicos, se translocan al núcleo para promover la expresión coordinada de los genes relacionados con la desintoxicación metabólica (Ema *et al.*, 1992; Vázquez-Gómez *et al.*, 2016; Yan *et al.*, 2019). En este estudio detectó la sobreexpresión del siguiente factor de transcripción:

Receptor nuclear de hidrocarburos de arilo translocador. Esta molécula sensor se encontró sobre expresada en ambas cepas resistentes, teniendo valores de inducción 1000 veces mayores a la cepa control, lo cual sitúa a esta molécula como un marcador de la desintoxicación metabólica importante. Hallazgos similares han sido reportados recientemente en ácaros, reforzando la hipótesis de que la regulación positiva de estos sensores es una parte fundamental en procesos de adaptación para la resistencia a acaricidas (Wen *et al.*, 2025).

14.5.3 METABOLISMO DE XENOBIÓTICOS O RESISTENCIA METABÓLICA.

La resistencia metabólica representa una de las formas más comunes y complejas de resistencia toxicocinética. Se basa en la capacidad del organismo para metabolizar o inactivar el acaricida antes de que alcance su sitio blanco (Feyereisen *et al.*, 2015a; Van Leeuwen *et al.*, 2020). Funcionalmente, este proceso se organiza en tres fases coordinadas:

- **Fase I** (modificación funcional): Oxidación, reducción o hidrólisis por enzimas como *CYPs* y carboxilesterasas.
- **Fase II** (conjugación): unión del xenobiótico a compuestos hidrosolubles mediante glutatión-S-transferasas y las UDP-glucosiltransferasas y sulfatotrasnferasas
- **Fase III** (excreción): Transporte activo de conjugados por proteínas de membrana fuera de la célula. Super familia de los facilitadores mayores y transportadores *ABC*

En este estudio se encontraron genes codificantes para estas enzimas que están diferencialmente expresados de las tres fases, lo que confirma a participación del metabolismo en la resistencia (Achuthkumar *et al.*, 2023; Cossío-Bayúgar *et al.*, 2021, 2025; Dai *et al.*, 2023; Miranda-Miranda., *et al* 2023; Venthur *et al.*, 2022).

14.5.3.1 MODIFICACIÓN FUNCIONAL FASE 1

A través de reacciones de oxidación, el organismo introduce grupos polares en la estructura de xenobiótico, incrementando sus propiedades hidrofílicas, esta modificación resulta conveniente dado que los acaricidas son predominantemente moléculas hidrofóbicas (lipofílicas). Al aumentar la polaridad de estos compuestos se facilita que los metabolitos resultantes sean procesados en las siguientes fases II y III para la neutralización y excreción.(Feyereisen, 2012; Waldman et al., 2023)

Citocromo p450 (CYP)

En el presente trabajo, se identificó una respuesta transcriptómica masiva de la familia de los citocromos P450, 61 DETs en la cepa Rancho Nuevo y 99 DETs en la cepa Vargas, la distribución de estos transcritos en 12 clanes subraya la complejidad y diversidad funcional de estas enzimas. Donde el clan más representado fue el clan de *CYP3* con los siguientes valores:

- Rancho Nuevo: 26 transcritos (42% del total *CYP*)
- Vargas: 51 transcritos (57% del total *CYP*)

La presencia de DETs pertenecientes a este clan refuerza el documentado en la literatura, consolidando estas enzimas como componente clave en la degradación de xenobióticos en insectos (Barrero *et al.*, 2017; Charamis *et al.*, 2025; Dermauw *et al.*, 2020; Fadahunsi *et al.*, 2023; Feyereisen, 2012; Nelson, 2018), a pesar de su abundancia, el clan *CYP3* mostro un perfil de expresión complejo, con una tendencia mayormente reprimida: 46% inducidos en Rancho Nuevo y 24.45 % en Vargas, esta regulación mixta sugiere que la resistencia concedida por estas enzimas no solo depende en la cantidad de enzima producida, si no de una regulación postranscripcional fina, posiblemente mediada por el splicing alternativo. Este mecanismo permitiría al organismo a generar una diversidad de isoformas enzimáticas funcionales, optimizando así la respuesta metabólica frente a diferentes tipos de acaricidas.(Charamis *et al.*, 2025; Fadahunsi *et al.*, 2023)

El clan *CYP6A* fue el segundo con mayor frecuencia:

- Rancho Nuevo: 6 transcritos (9.84%), expresión mayormente reprimida.
- Vargas: 11 transcritos (21.21%), expresión mayormente inducida.

Estos resultados indican diferencias entre cepas en el patrón de expresión de *CYPs*, lo que sugiere un ajuste adaptativo del metabolismo de xenobióticos según el tipo de resistencia. El splicing alternativo también sugiere la generación de isoformas funcionales especializadas para la detoxificación de acaricidas específicos.

Monoxigenasas dependientes de flavina (FMO y MAO)

Las monoxigenasas dependientes de flavina (*FMOs*) y las monoaminas oxidasas (*MAOs*) han sido asociadas con mecanismos de resistencia metabólica en insectos, como *Spodoptera exigua* (Cashman, 2024; Tian *et al.*, 2014). En la cepa Rancho Nuevo, se detectaron 3 DETs: dos de ellos mostraron regulación positiva (*FMO3* y *MAO-B*) y uno con regulación negativa (*FMO-5*). Por otra parte, la cepa Vargas exhibió un perfil más robusto con 6 DETs donde *FMO 3*, *MAO* y *MAO B* estuvieron regulados positivamente mientras que *FMO-5* mostró regulación mixta (con dos de tres transcritos inducidos).

Estos hallazgos refuerzan la premisa de que la resistencia metabólica es un fenómeno multifactorial, donde no participa únicamente una sola enzima, sino múltiples familias con regulación diferenciada y posiblemente complementaria. La expresión positiva consistente de *FMO-3* en ambas cepas resistentes sugiere su posible uso como marcador molecular de resistencia metabólica en *R. (B.) microplus*, aunque su validación funcional aún es necesaria. Cabe destacar que abundancia de estas monoxigenasas fue significativamente menor comparada con los *CYPs* (18 veces menos), lo que indica un papel secundario, pero como de apoyo crucial para la red de detoxificación

Carboxilesterasas

En este estudio se detectó expresión diferencial significativa de genes codificantes para carboxilesterasas (*CCE*):

- Cepa Rancho Nuevo: 42 DETs
- Cepa Vargas: 54 DETs

La alta representatividad de esta familia de enzimas sugiere una presión de selección más intensa, estas esterasas o carboxilesterasas son enzimas hidrolíticas que catalizan las rupturas de enlaces de ésteres en presencia de agua, generando un alcohol y un ácido como productos (Wheelock *et al.*, 2005). Su participación en mecanismos de resistencia ha sido ampliamente reportada en insectos y ácaros expuestos a piretroides y otros acaricidas, incluyendo especies como *N. cincticees*, *C. pipiens*, *A. albopictus*, *M. domestica* y *R. (B.) microplus* (Motoyama *et al.*, 1984; Grigoraki *et al.*, 2015; Hu *et al.*, 2020; X. Feng & Liu, 2020; Aguilar-Díaz *et al.*, 2018; Cossio-Bayugar *et al.*, 2002; Cossío-Bayúgar *et al.*, 2021; Miranda-Miranda, 2023 Cossio-Bayugar *et al* 2018).

De estas *CCEs*, se identificó un perfil diferencial en diversas tioesterasas, las cuales desempeñan un rol crítico en el metabolismo de lípidos y regulación proteica, destacando 3s-malil-CoA-tiolesterasa, sobre expresadas en ambas cepas y candidata como biomarcador de resistencia, por otro lado, la familia de las ubiquitin tioesterasas mostró una regulación mixta, mayormente reprimida, esta familia de enzimas se caracterizan por regular la degradación de proteínas, su expresión mixta podría indicar un mecanismo fino de regulación, para alargar la vida útil de otras enzimas relacionadas en la detoxificación. Y, por último, las colinesterasas presentaron una regulación mixta, con tendencia a la represión, esta expresión diferencial de estas colinesterasas podría estar involucrado en mitigar la sobreestimulación nerviosa provocada por la exposición a cierto grupo de acaricidas.

Deshidrogenasas de cadena corta (SDR)

Un perfil de expresión diferencial complejo fue encontrado en las enzimas *SDR*, las cuales desempeñan un papel importante en el metabolismo de hormonas (Kallberg *et al.*, 2002) así como en la desintoxicación metabólica en artrópodos (Tchigossou *et al.*, 2018; Vijay *et al.*, 2015).

Tienen un impacto en el metabolismo de las hormonas y en la desintoxicación. Se obtuvieron perfiles de expresión mixto:

Retinal *SDR 4*: negativa en RN; mixta en Vargas.

Retinol *SDR 2*: reprimida en ambas.

Retinol *SDR 4*: reprimida en Vargas; negativa en RN.

Retinol *SDR 7*: sobre expresada solo en Rancho Nuevo; la cual la postula como potente candidata funcional.

La represión mixta, predominantemente negativa en ambas cepas, sugiere que estas enzimas al participan en procesos de regulación de los retinoides, su represión ayuda a una reprogramación

del desarrollo o a una reducción de procesos metabólicos esenciales para priorizar la respuesta al estrés químico, sin embargo, la sobreexpresión de diferentes variantes sugiere un papel como enzima funcional que podría participar en la degradación de compuestos xenobióticos esto debido a su capacidad para metabolizar compuestos carbonílicos, actuando como un sistema complementario a las monoxigenasas y las carboxilesterasas antes descritas, lo cual refuerza lo encontrado en la literatura (Feyereisen *et al.*, 2015a; Li *et al.*, 2025)

Aldehído deshidrogenasas (ALDH).

Estas enzimas han sido ampliamente estudiadas, ya que catalizan la oxidación de aldehídos reactivos a ácidos carboxílicos menos tóxicos (Vasiliou & Nebert, 2005), su participación en la resistencia a xenobióticos ha sido documentada en artrópodos (Fry & Saweikis, 2006; Lumjuan *et al.*, 2014). En este estudio, se identificó que las familias 7 y 8 se encontraron inducidas en ambas cepas resistentes, principalmente en la cepa Vargas, lo que sugiere su participación en la metabolización de acaricidas. Estas enzimas podrían estar envueltas en la metabolización de subproductos derivados de la metabolización de los acaricidas, como forma de protección ante el estrés oxidativo. Otras subfamilias mostraron regulación diferencial, aunque en general la inducción indica una maquinaria de detoxificación más robusta, capaz de neutralizar los metabolitos secundarios para dar lugar al fenotipo de resistencia a acaricidas.

14.5.3.2 FASE II (CONJUGACIÓN)

En esta fase del metabolismo de xenobióticos se caracteriza por tener reacciones de conjugación, donde se añaden grupos funcionales para aumentar su hidrosolubilidad y facilitar su excreción (Gao *et al.*, 2022) Las *GST* se encontraron reguladas diferencialmente con 15–19 transcritos, con patrones de regulación mixta, específicos por cepa. Se noto una divergencia notable en la *GST* Mu-1 inducida en Vargas; *GST* Mu-2 inducida en Rancho Nuevo; *GST* Mu-3, Mu-5, Zeta y D reprimidas en ambas. Estos resultados corroboran la participación de estas enzimas en fenotipos de resistencia en *R. (B.) microplus* reportados en la literatura (Cossio-Bayugar *et al.*, 2002; Fular *et al.*, 2020; Hernandez *et al.*, 2021; Miranda-Miranda *et al.*, 2016). Asimismo, el patrón de expresión único en cada cepa sugiere diferentes niveles de optimización metabólica, así como la producción de isoformas más afines a los acaricidas expuesto. Las galactosiltransferasa y Sulfotransferasas (*ST*) mostraron perfiles divergentes, con la subfamilia Heparán-sulfato 3-*O*-*ST* se encontró inducida en las dos cepas, aunque con niveles moderados de log₂FC, lo que corrobora este mecanismo de sulfatación descrito por Xu *et al.* (2021). En contraste con el transcrito Core-1-beta1,3-Galactasa-1 que exhibió valores de log₂FC mayores a 20, lo cual indica una mayor participación en la respuesta adaptativa en la resistencia a acaricidas como se reporta en la literatura (Pan *et al.*, 2020; Scott, 2026).

Dada la magnitud de la respuesta de inducción, se postula esta molécula como biomarcador para la medición de la resistencia, Finalmente la presencia de otras subfamilias mostró inducciones específicas por cepa. Estas variaciones sugieren especialización en la conjugación y neutralización de xenobióticos mediante una red enzimática flexible y diversa.

14.5.3.3 FASE III (EXCRECIÓN)

La fase final del metabolismo de xenobióticos consiste en la excreción activa de los compuestos procesados, este proceso es llevado mediante transportadores de membrana que utilizan energía para movilizar los metabolitos fuera de la célula (Gao *et al.*, 2022), en este estudio se presentó una expresión diferencial significativa en dos familias de transportadores: Casete de unión a ATP

(ABC) y la superfamilia de los facilitadores mayores. Para los transportadores ABC se encontraron 12 DETs para Rancho Nuevo y 10 DETs para Vargas, con regulación mixta, con tendencia a la inducción, donde la subfamilia A miembro 1 y subfamilia C miembro 1 son candidatos como biomarcadores debido a su alto nivel de sobreexpresión y presencia en ambas cepas. La familia de *MFSD* obtuvo un total de 11 y 9 transcritos con expresión mixta, mayormente inducidos para la cepa RN y Vargas, donde los miembros de la superfamilia de *MFSD prot 1*, *prot 6* y *prot 11* son probables candidatos para biomarcadores debido a su alto nivel de inducción $\log_2FC > +8$.

Estas variaciones sugieren un mecanismo complementario entre estas dos familias de transportadores, donde la diversificación de transportadores excretorios de xenobióticos son parte de un sistema altamente eficiente, y dichos datos son respaldados por lo reportado en la literatura (Labbé *et al.*, 2011; Lv *et al.*, 2023; Pohl *et al.*, 2011; Shakya *et al.*, 2023)

14.5.4 ESTRÉS OXIDATIVO.

Como consecuencia secundaria de la desintoxicación metabólica, especialmente en la fase oxidativa de la fase I, se genera una producción significativamente de especies reactivas de oxígeno (ROS) que son capaces realizar daño celular irreversible en lípidos, proteínas y ADN (Hao, Hamzah, Alias, *et al.*, 2020; Lukaszewicz-Hussain, 2010; Otali *et al.*, 2014), en este estudio se encontraron 43 y 29 transcritos expresados diferencialmente en las cepas Rancho Nuevo y Vargas respectivamente, Entre estos transcritos se encontraban la superóxido dismutasa (*SOD*), Catalasa y sistema de la tiorredoxina/peroxirredoxina (*Trx/Prx*), la presencia de DETs en estos sistemas corrobora lo reportado en la literatura, respecto a las respuestas al estrés oxidativo en artrópodos, especialmente en modelos de resistencia (Cossío-Bayúgar *et al.*, 2005; Miranda-Miranda *et al.*, 2023; Rukmini *et al.*, 2004; Sachin *et al.*, 2021)

El sistema *Trx/Prx* resultó ser el mecanismo más abundante y con los niveles de inducción más elevados, lo que lo posiciona como el mecanismo principal del control del estrés oxidativo inducido por metabolismo de xenobióticos. Mientras que la *SOD* mostro una regulación mixta característica; destacando el transcrito *SOD [Cu-Zn]* que se mantuvo presente de manera consistente en ambas cepas resistentes, por último, se identificaron transcritos con regulación mixta para la catalasa, aunque estos transcritos no alcanzaron la intensidad que la *SOD* o el sistema *Trx/Prx*. Estos hallazgos corroboran lo previamente reportado en la literatura de las defensas antioxidantes en artrópodos por Shi *et al.* (2014).

15. CONCLUSIONES

La obtención de perfiles transcriptómicos de alta calidad y la consistencia entre sus réplicas biológicas permitieron establecer una metodología de extracción de ARN de organismos completos y secuenciación óptima para visualizar el perfil transcriptómico relacionado a la resistencia a acaricidas. El uso del ensamble guiado por genoma de referencia (Trinity-BAM-guided) permitió la reconstrucción de un transcriptoma robusto con 170,948 transcritos, superando las limitaciones de los ensambles *de novo* y de la falta de información en la anotación de los genomas de referencia.

Gracias al análisis de expresión diferencial se concluye que el fenotipo de resistencia observado en las cepas trabajadas es un fenómeno multifactorial y poligénico, sustentado por la regulación de 268 y 331 transcritos. La coexistencia de isoformas sobreexpresadas y reprimidas en familias clave, tanto para resistencia toxicodinámica como toxicocinética, demuestran que no dependen de un solo mecanismo aislado, sino de una red de procesos metabólicos, excreción, protección celular, proteínas sensores. Esta actividad de rutas compensatorias permite a *R. B. micropolus* optimizar su respuesta adaptativa, garantizando la supervivencia ante dosis letales de acaricidas mediante una estrategia de desintoxicación compleja.

En este estudio, se demuestra que la caracterización de los mecanismos moleculares de resistencia a acaricidas es pilar fundamental para superar la crisis de resistencia generada por el uso indiscriminado de acaricidas, practica que afecta la inocuidad alimentaria, ambiental y la salud humana y animal. Se establece que el control de garrapatas debe evolucionar a un manejo integral basado en la evidencia, donde la identificación de los mecanismos de resistencia permita la selección de moléculas estratégicas para combatir eficazmente las cepas multirresistentes.

Finalmente, la implementación de un monitoreo constante, que arroje resultados en menor en comparación con las técnicas comúnmente utilizadas para detectar la resistencia, no solo es una necesidad para preservar la eficacia de los tratamientos, si no una medida importante para garantizar la inocuidad alimentaria, la sostenibilidad económica del sector ganadero y la protección de la salud pública bajo el enfoque de “One health”.

Sin embargo, el éxito técnico de estas estrategias moleculares depende directamente del factor humano; por ello, la concientización de grandes y pequeños productores es indispensable. Solo a través de la educación y el compromiso de todos los actores del sector, se podrá promover un uso racional de los acaricidas, y avanzar hacia programas de control que sean sostenibles con el tiempo.

16. LITERATURA

- Abbas, R. Z., Zaman, M. A., Colwell, D. D., Gilleard, J., & Iqbal, Z. (2014). Acaricide resistance in cattle ticks and approaches to its management: The state of play. *Veterinary Parasitology*, 203(1–2), 6–20. <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2014.03.006>
- Abreu-Villaça, Y., & Levin, E. D. (2016). Developmental neurotoxicity of succeeding generations of insecticides. *Environment international*, 99, 55. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2016.11.019>
- Achuthkumar, A., Uchamballi, S., Arvind, K., Vasu, D. A., Varghese, S., Ravindran, R., & Grace, T. (2023). Transcriptome Profiling of *Rhipicephalus annulatus* Reveals Differential Gene Expression of Metabolic Detoxifying Enzymes in Response to Acaricide Treatment. *Biomedicines*, 11(5), 1369. <https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES11051369/S1>
- Adeyinka, A., Muco, E., Regina, A. C., & Pierre, L. (2023). Organophosphates. *Weapons of Mass Destruction: an Encyclopedia of Worldwide Policy, Technology, and History: Volumes 1,2, 1–2*, 204V1-206V1. <https://doi.org/10.2307/j.ctv1850hst.14>
- Agilent Technologies. (2013, julio). *Agilent Technologies Agilent RNA 6000 Nano Kit Guide*. https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/G2938-90034_RNA6000Nano_KG.pdf
- Agnew, J. L., & Romero, A. (2017). Behavioral Responses of the Common Bed Bug, *Cimex lectularius*, to Insecticide Dusts. *Insects*, 8(3). <https://doi.org/10.3390/INSECTS8030083>
- Aguilar-Díaz, H., Esquivel-Velázquez, M., Quiroz-Castañeda, R. E., Miranda-Miranda, E., Conde-Baeye, R. J. P., Cobaxín-Cárdenas, M., Ostoa-Saloma, P., & Cossío-Bayúgar, R. (2018). Comparative Hemolymph Proteomic and Enzymatic Analyses of Two Strains of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Ticks Resistant and Susceptible to Ixodocides. *BioMed Research International*, 2018, 9451547. <https://doi.org/10.1155/2018/9451547>
- Aguilar-Tipacamú, G., Miller, R. J., Hernández-Ortiz, R., Rodríguez-Vivas, R. I., Vázquez-Peláez, C., García-Vázquez, Z., Olvera-Valencia, F., & Rosario-Cruz, R. (2008). Inheritance of pyrethroid resistance and a sodium channel gene mutation in the cattle tick *Boophilus microplus*. *Parasitol Res*, 103:633–639. <https://doi.org/10.1007/s00436-008-1024-2>
- Aguirre, J., Sobrino, A., Santamaría, M., Aburto, A., Roman, S., Hernandez, M., Ortiz, M., & Ortiz, Y. A. (1986). Resistencia de garrapatas en México. En A. H. Cavazzani & Z. Garcia (Eds.), *Seminario Internacional de Parasitología Animal* (pp. 282–306).
- Agwunobi, D. O., Yu, Z., & Liu, J. (2021). A retrospective review on ixodid tick resistance against synthetic acaricides: implications and perspectives for future resistance prevention and mitigation. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 173, 104776. <https://doi.org/10.1016/J.PESTBP.2021.104776>
- Akhgari, M., Abdollahi, M., Kebryaezadeh, A., Hosseini, R., & Sabzevari, O. (2003). Biochemical evidence for free radical-induced lipid peroxidation as a mechanism for subchronic toxicity of malathion in blood and liver of rats. *Human & Experimental Toxicology*, 22(4), 205–211. <https://doi.org/10.1191/0960327103HT346OA>
- Alfieri, A., Malito, E., Orru, R., Fraaije, M. W., & Mattevi, A. (2008). Revealing the moonlighting role of NADP in the structure of a flavin-containing monooxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(18), 6572. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0800859105>
- Almazan, C., Tipacamu, G. A., Rodríguez, S., Mosqueda, J., & Perez de Leon, A. (2018). Immunological control of ticks and tick-borne diseases that impact cattle health and production. *Frontiers in Bioscience - Landmark*, 23(8), 1535–1551. <https://doi.org/10.2741/4659/PDF>

- Alota, S. L., Edquiban, T. R. J., Galay, R. L., Bernardo, J. M. G., Sandalo, K. A. C., Divina, B. P., & Tanaka, T. (2021). Determination of resistance status to amitraz in the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* from Luzon, Philippines, through bioassay and molecular analysis. *Experimental and Applied Acarology*, 83(3), 399–409. <https://doi.org/10.1007/S10493-021-00593-8/METRICS>
- Amezian, D., Nauen, R., & Van Leeuwen, T. (2024). The role of ATP-binding cassette transporters in arthropod pesticide toxicity and resistance. *Current Opinion in Insect Science*, 63, 101200. <https://doi.org/10.1016/J.COIS.2024.101200>
- Amrutha, B. M., Kumar, K. G. A., Kurbet, P. S., Varghese, A., Deepa, C. K., Pradeep, R. K., Nimisha, M., Asaf, M., Juliet, S., Ravindran, R., & Ghosh, S. (2023a). Morphological and molecular characterization of *Rhipicephalus microplus* and *Rhipicephalus annulatus* from selected states of southern India. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 14(2), 102086. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2022.102086>
- Amrutha, B. M., Kumar, K. G. A., Kurbet, P. S., Varghese, A., Deepa, C. K., Pradeep, R. K., Nimisha, M., Asaf, M., Juliet, S., Ravindran, R., & Ghosh, S. (2023b). Morphological and molecular characterization of *Rhipicephalus microplus* and *Rhipicephalus annulatus* from selected states of southern India. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 14(2), 102086. <https://doi.org/10.1016/J.TTBDIS.2022.102086>
- Anderson, J. A., & Coats, J. R. (2012). Acetylcholinesterase inhibition by nootkatone and carvacrol in arthropods. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 102(2), 124–128. <https://doi.org/10.1016/J.PESTBP.2011.12.002>
- Andreev, D., Rocheleau, T., Phillips, T. W., Beeman, R. W., & French-Constant, R. H. (1994). A PCR diagnostic for cyclodiene insecticide resistance in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. *Pesticide Science*, 41(4), 345–349. <https://doi.org/10.1002/PS.2780410410>
- Anthony, N. M., Brown, J. K., Markham, P. G., & French-Constant, R. H. (1995). Molecular Analysis of Cyclodiene Resistance-Associated Mutations among Populations of the Sweetpotato Whitefly *Bemisia tabaci*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 51(3), 220–228. <https://doi.org/10.1006/PEST.1995.1022>
- Antoneli, F., Golubitsky, M., Jin, J., & Stewart, I. (2025). Homeostasis in input-output networks: Structure, Classification and Applications. *Mathematical Biosciences*, 384, 109435. <https://doi.org/10.1016/J.MBS.2025.109435>
- Arakane, Y., & Muthukrishnan, S. (2009). Insect chitinase and chitinase-like proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 67(2), 201. <https://doi.org/10.1007/S00018-009-0161-9>
- Araque, A., Ujueta, S., Bonilla, R., Gómez, D., & Rivera, J. (2014). RESISTENCIA A ACARICIDAS EN *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* DE ALGUNAS EXPLOTACIONES GANADERAS DE COLOMBIA. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 17(1), 161–170. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-42262014000100018&lng=en&nrm=iso&tlng=es
- Baffi, M. A., de Souza, G. R. L., de Sousa, C. S., Ceron, C. R., & Bonetti, A. M. (2008). Esterase enzymes involved in pyrethroid and organophosphate resistance in a Brazilian population of *Rhipicephallus (Boophilus) microplus* (Acari, Ixodidae). *Molecular and Biochemical Parasitology*, 160(1), 70–73. <https://doi.org/10.1016/J.MOLBIOPARA.2008.03.009>
- Balabanidou, V., Grigoraki, L., & Vontas, J. (2018a). Insect cuticle: a critical determinant of insecticide resistance. *Current Opinion in Insect Science*, 27, 68–74. <https://doi.org/10.1016/J.COIS.2018.03.001>

- Balabanidou, V., Grigoraki, L., & Vontas, J. (2018b). Insect cuticle: a critical determinant of insecticide resistance. *Current Opinion in Insect Science*, 27, 68–74. <https://doi.org/10.1016/J.COIS.2018.03.001>
- Balabanidou, V., Kampouraki, A., Maclean, M., Blomquist, G. J., Tittiger, C., Juárez, M. P., Mijailovsky, S. J., Chalepakis, G., Anthousi, A., Lynd, A., Antoine, S., Hemingway, J., Ranson, H., Lycett, G. J., & Vontas, J. (2016a). Cytochrome P450 associated with insecticide resistance catalyzes cuticular hydrocarbon production in *Anopheles gambiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(33), 9268–9273. https://doi.org/10.1073/PNAS.1608295113/SUPPL_FILE/PNAS.1608295113.SD01.XLS
- Balabanidou, V., Kampouraki, A., Maclean, M., Blomquist, G. J., Tittiger, C., Juárez, M. P., Mijailovsky, S. J., Chalepakis, G., Anthousi, A., Lynd, A., Antoine, S., Hemingway, J., Ranson, H., Lycett, G. J., & Vontas, J. (2016b). Cytochrome P450 associated with insecticide resistance catalyzes cuticular hydrocarbon production in *Anopheles gambiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(33), 9268–9273. https://doi.org/10.1073/PNAS.1608295113/SUPPL_FILE/PNAS.1608295113.SD01.XLS
- Banović, P., Díaz-Sánchez, A. A., Galon, C., Foucault-Simonin, A., Simin, V., Mijatović, D., Papić, L., Wu-Chuang, A., Obregón, D., Moutailler, S., & Cabezas-Cruz, A. (2021). A One Health approach to study the circulation of tick-borne pathogens: A preliminary study. *One Health*, 13, 100270. <https://doi.org/10.1016/J.ONEHLT.2021.100270>
- Baron, S., Van Der Merwe, N. A., Maddler, M., & Maritz-Olivier, C. (2015). SNP Analysis Infers that Recombination Is Involved in the Evolution of Amitraz Resistance in *Rhipicephalus microplus*. *PLOS ONE*, 10(7), e0131341. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0131341>
- Barré, N., & Uilenberg, G. (2010). Spread of parasites transported with their hosts: case study of two species of cattle tick. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, 29(1), 149–160, 135. <https://europepmc.org/article/med/20617654>
- Barrero, R. A., Guerrero, F. D., Black, M., McCooke, J., Chapman, B., Schilkey, F., Pérez de León, A. A., Miller, R. J., Bruns, S., Dobry, J., Mikhaylenko, G., Stormo, K., Bell, C., Tao, Q., Bogden, R., Moolhuijzen, P. M., Hunter, A., & Bellgard, M. I. (2017). Gene-enriched draft genome of the cattle tick *Rhipicephalus microplus*: assembly by the hybrid Pacific Biosciences/Illumina approach enabled analysis of the highly repetitive genome. *International Journal for Parasitology*, 47(9), 569–583. <https://doi.org/10.1016/J.IJPARA.2017.03.007>
- Bártíková, H., Podlipná, R., & Skálová, L. (2016). Veterinary drugs in the environment and their toxicity to plants. *Chemosphere*, 144, 2290–2301. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2015.10.137>
- 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 and Molecular Biology*, 29(5), 461–467. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(99\)00023-5](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(99)00023-5)
- Baxter, G. D., & Barker, S. C. (2002). Analysis of the sequence and expression of a second putative acetylcholinesterase cDNA from organophosphate-susceptible and organophosphate-resistant cattle ticks. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32(7), 815–820. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(01\)00168-0](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(01)00168-0)
- Beggas, F., & Lounici, A. (2023). Generation of random sequences using DNA cryptography for OTP encryption. *Biosystems*, 234, 105064. <https://doi.org/10.1016/J.BIOSYSTEMS.2023.105064>

- Berge"lberge"l, J.-B., Rene"fevereisen, R., & Amichot, M. (s/f). *Cytochrome P450 monooxygenases and insecticide resistance in insects*.
- Bergé, J. B., Feyereisen, R., & Amichot, M. (1998). Cytochrome P450 monooxygenases and insecticide resistance in insects. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 353(1376), 1701. <https://doi.org/10.1098/RSTB.1998.0321>
- Bhadra, M., Howell, P., Dutta, S., Heintz, C., & Mair, W. B. (2020). Alternative splicing in aging and longevity. *Human Genetics*, 139(3), 357–369. <https://doi.org/10.1007/S00439-019-02094-6>
- Bock, K. W. (2016). The UDP-glycosyltransferase (UGT) superfamily expressed in humans, insects and plants: Animal-plant arms-race and co-evolution. *Biochemical Pharmacology*, 99, 11–17. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.10.001>
- Boublik, Y., Saint-Aguet, P., Lougarre, A., Arnaud, M., Villatte, F., Estrada-Mondaca, S., & Fournier, D. (2002). Acetylcholinesterase engineering for detection of insecticide residues. *Protein Engineering*, 15(1), 43–50. <https://doi.org/10.1093/PROTEIN/15.1.43>,
- Breckenridge, C. B., Holden, L., Sturgess, N., Weiner, M., Sheets, L., Sargent, D., Soderlund, D. M., Choi, J. S., Symington, S., Clark, J. M., Burr, S., & Ray, D. (2009). Evidence for a separate mechanism of toxicity for the Type I and the Type II pyrethroid insecticides. *NeuroToxicology*, 30(SUPPL.). <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2009.09.002>
- Burger, 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(1), 241–253. <https://doi.org/10.1016/J.YMPEV.2014.03.017>
- Bush, S. J., Chen, L., Tovar-Corona, J. M., & Urrutia, A. O. (2017). Alternative splicing and the evolution of phenotypic novelty. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 372(1713). <https://doi.org/10.1098/RSTB.2015.0474;PAGE:STRING:ARTICLE/CHAPTER>
- Cafarchia, C., Porretta, D., Mastrantonio, V., Epis, S., Sassera, D., Iatta, R., Immediato, D., Ramos, R. A. N., Lia, R. P., Dantas-Torres, F., Kramer, L., Urbanelli, S., & Otranto, D. (2015). Potential role of ATP-binding cassette transporters against acaricides in the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus sensu lato*. *Medical and Veterinary Entomology*, 29(1), 88–93. <https://doi.org/10.1111/MVE.12093>,
- Cardoso, A. dos S., Santos, E. G. G., Lima, A. da S., Temeyer, K. B., Pérez de León, A. A., Costa, L. M., & Soares, A. M. dos S. (2020). Terpenes on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: Acaricidal activity and acetylcholinesterase inhibition. *Veterinary Parasitology*, 280, 109090. <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2020.109090>
- Carvalho, R., Yang, Y., Field, L. M., Gorman, K., Moores, G., Williamson, M. S., & Bass, C. (2012). Chlorpyrifos resistance is associated with mutation and amplification of the acetylcholinesterase-1 gene in the tomato red spider mite, *Tetranychus evansi*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 104(2), 143–149. <https://doi.org/10.1016/J.PESTBP.2012.05.009>
- Cashman, J. R. (2024). Monoamine Oxidases and Flavin-Containing Monooxygenases. En *Reference Module in Biomedical Sciences*. Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-323-95488-4.00004-8>
- Castro Janer, E., Klafke, G. M., Capurro, M. L., & Schumaker, T. T. S. (2015). Cross-resistance between fipronil and lindane in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Veterinary Parasitology*, 210(1–2), 77–83. <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2015.03.011>
- Castro Janer, E., Klafke, G. M., Fontes, F., Capurro, M. L., & Schumaker, T. S. S. (2019a). Mutations in *Rhipicephalus microplus* GABA gated chloride channel gene associated with

- fipronil resistance. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 10(4), 761–765. <https://doi.org/10.1016/J.TTBDIS.2019.03.009>
- Castro Janer, E., Klafke, G. M., Fontes, F., Capurro, M. L., & Schumaker, T. S. S. (2019b). Mutations in *Rhipicephalus microplus* GABA gated chloride channel gene associated with fipronil resistance. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 10(4), 761–765. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.03.009>
- Castro-Janer, E. A., Klafke, G. M., Díaz, A., Fontes, F., & Baraibar, F. (2021). Multiplex allele-specific polymerase chain reaction to detect kdr and rdl mutations in the cattle tick *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*, 292, 109397. <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2021.109397>
- Castro-Saines, E., Hernandez-Ortiz, R., & Lagune-Quintanilla, R. (2021). Bioassays with *Rhipicephalus microplus*. En R. Cossio-Bayugar, E. Miranda-Miranda, & S. Kumar (Eds.), *A laboratory Manual on Rhipicephalus microplus 2023*. (pp. 232–262). Lady Stephenson Library.
- Chahal, G., Tyagi, S., & Ramialison, M. (2019). Navigating the non-coding genome in heart development and Congenital Heart Disease. *Differentiation*, 107, 11–23. <https://doi.org/10.1016/J.DIFF.2019.05.001>
- Chakrabarty, A., Mannan, S., & Cagin, T. (2016). Application of Modeling for Industrial Hygiene and Toxicological Issues. En *Multiscale Modeling for Process Safety Applications* (pp. 397–406). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396975-0.00009-7>
- Champion, C. J., & Xu, J. (2018). Redox state affects fecundity and insecticide susceptibility in *Anopheles gambiae*. *Scientific Reports*, 8(1), 13054. <https://doi.org/10.1038/S41598-018-31360-2>
- Chang, C. L., Villalun, M. A., Geib, S. M., Goodman, C. L., Ringbauer, J., & Stanley, D. (2015). Pupal X-ray irradiation influences protein expression in adults of the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis*. *Journal of Insect Physiology*, 76, 7–16. <https://doi.org/10.1016/J.JINSPHYS.2015.03.002>
- Chapman, E., Best, M. D., Hanson, S. R., & Wong, C. H. (2004). Sulfotransferases: Structure, mechanism, biological activity, inhibition, and synthetic utility. *Angewandte Chemie - International Edition*, 43(27), 3526–3548. <https://doi.org/10.1002/ANIE.200300631;PAGE:STRING:ARTICLE/CHAPTER>
- Charamis, J., Dermauw, W., Van Leeuwen, T., Vontas, J., & Feyereisen, R. (2025). The arthropod P450 Enchiridion: An integrated web resource for research on P450s. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 183, 104377. <https://doi.org/10.1016/J.IBMB.2025.104377>
- Chen, Y., Lafleur, C., Smith, R. J., Kaur, D., Driscoll, B. T., & Bede, J. C. (2024). *Trichoplusia ni* Transcriptomic Responses to the Phytosaponin Aglycone Hederagenin: Sex-Related Differences. *Journal of chemical ecology*, 50(3–4), 168–184. <https://doi.org/10.1007/S10886-024-01482-1>
- Chung, M., Bruno, V. M., Rasko, D. A., Cuomo, C. A., Muñoz, J. F., Livny, J., Shetty, A. C., Mahurkar, A., & Dunning Hotopp, J. C. (2021). Best practices on the differential expression analysis of multi-species RNA-seq. *Genome Biology* 22:1, 22(1), 1–23. <https://doi.org/10.1186/S13059-021-02337-8>
- Collins, S. L., & Patterson, A. D. (2019). The gut microbiome: an orchestrator of xenobiotic metabolism. *Acta Pharmaceutica Sinica. B*, 10(1), 19. <https://doi.org/10.1016/J.APSB.2019.12.001>
- Corley, S. W., Jonsson, N. N., Piper, E. K., Cutullé, C., Stear, M. J., & Seddon, J. M. (2013). Mutation in the Rm β AOR gene is associated with amitraz resistance in the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(12), 4847–4852. <https://doi.org/10.1073/pnas.1219000110>

- States of America*, 110(42), 16772–16777.
https://doi.org/10.1073/PNAS.1309072110/SUPPL_FILE/PNAS.201309072SI.PDF
- Corley, S. W., Piper, E. K., & Jonsson, N. N. (2012). Generation of Full-Length cDNAs for Eight Putative GPCnR from the Cattle Tick, *R. microplus* Using a Targeted Degenerate PCR and Sequencing Strategy. *PLOS ONE*, 7(3), e32480.
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0032480>
- Corta, E., Bakkali, A., Berrueta, L. A., Gallo, B., & Vicente, F. (1999). Kinetics and mechanism of amitraz hydrolysis in aqueous media by HPLC and GC-MS. *Talanta*, 48(1), 189–199.
[https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(98\)00237-9](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(98)00237-9)
- Cossío-Bayúgar, R., Amaro-Estrada, I., Miranda-Miranda, E., Aguilar-Díaz, H., & Kumar, S. (2025). Unlocking Tick Resistance with Transcriptome-Based Bioinformatics. En S. Kumar, Raquel Cossio Bayugar, Miranda Miranda, Anik Kumar Sharma, & Ashok Kumar Chubey (Eds.), *Acaricides Resistance in Ticks A Global Problem* (pp. 169–189). Springer Nature. https://doi.org/10.1007/978-981-97-7411-1_8
- Cossio-Bayugar, R., Barhoumi, R., Burghardt, R. C., Wagner, G. G., & Holman, P. J. (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 and Physiology*, 72(1), 1–9.
<https://doi.org/10.1006/PEST.2001.2578>
- Cossío-Bayúgar, R., Martínez-Ibañez, F., Aguilar-Díaz, H., & Miranda-Miranda, E. (2018a). Pyrethroid Acaricide Resistance Is Proportional to P-450 Cytochrome Oxidase Expression in the Cattle Tick *Rhipicephalus microplus*. *BioMed Research International*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/8292465>
- Cossío-Bayúgar, R., Martínez-Ibañez, F., Aguilar-Díaz, H., & Miranda-Miranda, E. (2018b). Pyrethroid Acaricide Resistance Is Proportional to P-450 Cytochrome Oxidase Expression in the Cattle Tick *Rhipicephalus microplus*. *BioMed Research International*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/8292465>
- Cossio-Bayugar, R., Martinez-Ibañez, F., Aguilar-Díaz, H., & Miranda-Miranda, E. (2024). Relationship between acaricide resistance and acetylcholinesterase gene polymorphisms in the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. *Parasite*, 31, 3. <https://doi.org/10.1051/PARASITE/2024003>
- Cossío-Bayúgar, R., Miranda, E., & Holman, P. J. (2005). Molecular cloning of a phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase gene from the tick, *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Insect biochemistry and molecular biology*, 35(12), 1378–1387.
<https://doi.org/10.1016/J.IBMB.2005.08.008>
- Cossío-Bayúgar, R., Miranda Miranda, E., Diaz, H. A., & Reynaud, E. (2021). Types of Acaricide Resistance. En S. Kumar, R. C. Bayugar, A. K. Sharma, E. Miranda Miranda, & A. K. Chubey (Eds.), *The Entomological Guide to Rhipicephalus* (pp. 146–175). Nova Science Publisher Inc.
- Cossío-Bayúgar, R., Miranda-Miranda, E., Aguilar-Díaz, H., Narváez-Padilla, V., & Reynaud, E. (2024). Transcriptomic dataset of the development and maturation of the *Rhipicephalus microplus* ovary. *Data in Brief*, 55. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2024.110661>
- Cossío-Bayúgar, R., Miranda-Miranda, E., Fernández-Rubalcaba, M., Narvaéz Padilla, V., & Reynaud, E. (2015). Adrenergic ligands that block oviposition in the cattle tick *Rhipicephalus microplus* affect ovary contraction. *Scientific reports*, 5. <https://doi.org/10.1038/SREP15109>
- Cossío-Bayúgar, R., Miranda-Miranda, E., Martínez-Ibañez, F., Narváez-Padilla, V., & Reynaud, E. (2020a). Physiological evidence that three known mutations in the para-sodium channel

- gene confer cypermethrin knockdown resistance in *Rhipicephalus microplus*. *Parasites and Vectors*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/S13071-020-04227-7>,
- Cossío-Bayúgar, R., Miranda-Miranda, E., Martínez-Ibañez, F., Narváez-Padilla, V., & Reynaud, E. (2020b). Physiological evidence that three known mutations in the para-sodium channel gene confer cypermethrin knockdown resistance in *Rhipicephalus microplus*. *Parasites and Vectors*, 13(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/S13071-020-04227-7/FIGURES/2>
- Cossio-Bayugar, R., Miranda-Miranda, E., Ortiz-Najera, A., Neri-Orantes, S., & Olvera-Valencia, F. (2008). Cytochrome P-450 Monooxygenase Gene Expression Supports a Multifactorial Origin for Acaricide Resistance in *Rhipicephalus microplus*. *Research Journal of Parasitology*, 3(2), 59–66. <https://doi.org/10.3923/jp.2008.59.66>
- Cossío-Bayúgar, R., Miranda-Miranda, E., Portilla-Salgado, D., & Osorio-Miranda, J. (2009). Quantitative PCR detection of cholinesterase and carboxylesterase expression levels in acaricide resistant *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*. *Journal of Entomology*, 6(2), 117–123. <https://doi.org/10.3923/JE.2009.117.123>
- Cruse, C., Moural, T. W., & Zhu, F. (2023). Dynamic Roles of Insect Carboxyl/Cholinesterases in Chemical Adaptation. *Insects* 2023, Vol. 14, Page 194, 14(2), 194. <https://doi.org/10.3390/INSECTS14020194>
- Dai, Y., Zhang, Y., Sun, W., Chen, Y., Wang, X., Xin, T., Wan, B., Xia, B., Zhong, L., & Zou, Z. (2023). The metabolism and detoxification effects of lead exposure on *Aleurolyphus ovatus* (Acari: Acaridae) via transcriptome analysis. *Chemosphere*, 333, 138886. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2023.138886>
- Dantas-Torres, F., Chomel, B. B., & Otranto, D. (2012). Ticks and tick-borne diseases: a One Health perspective. *Trends in Parasitology*, 28(10), 437–446. <https://doi.org/10.1016/J.PT.2012.07.003>
- Davey, R. B., Ahrens, E. H., George, J. E., Hunter, J. S., & Jeannin, P. (1998). Therapeutic and persistent efficacy of fipronil against *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) on cattle. *Veterinary Parasitology*, 74(2–4), 261–276. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(97\)00152-0](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(97)00152-0)
- Davies, T. G. E., O'Reilly, A. O., Field, L. M., Wallace, B. A., & Williamson, M. S. (2008). Knockdown resistance to DDT and pyrethroids: From target-site mutations to molecular modelling. *Pest Management Science*, 64(11), 1126–1130. <https://doi.org/10.1002/PS.1617>,
- De Almeida, L. G., De Moraes, L. A. B., Trigo, J. R., Omoto, C., & Cônsoli, F. L. (2017). The gut microbiota of insecticide-resistant insects houses insecticide-degrading bacteria: A potential source for biotechnological exploitation. *PLoS ONE*, 12(3), e0174754. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0174754>
- de Araújo, F. F., Ronda, J. B., Bittar, E. R., Venturini, G. C., Garcia, G. C., Martins-Filho, O. A., Silva Araújo, M. S., & Figueiredo Bittar, J. F. (2019). Distinct immune response profile during *rhipicephalus* (*boophilus*) *microplus* infestations of guzerat dairy herd according to the maternal lineage ancestry (mitochondrial DNA). *Veterinary Parasitology*, 273, 36–44. <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2019.07.005>
- De Boeck, G., Rodgers, E., & Town, R. M. (2022). Using ecotoxicology for conservation: From biomarkers to modeling. *Fish Physiology*, 39, 111–174. <https://doi.org/10.1016/BS.FP.2022.06.002>
- de La Canal, L. H., Dall'Agnol, B., Webster, A., Reck, J., Martins, J. R., & Klafke, G. M. (2021). Mechanisms of amitraz resistance in a *Rhipicephalus microplus* strain from southern Brazil. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 12(5), 101764. <https://doi.org/10.1016/J.TTBDIS.2021.101764>

- De La Fuente, J., & Kocan, K. M. (2006). Strategies for development of vaccines for control of ixodid tick species. *Parasite Immunology*, 28(7), 275–283. <https://doi.org/10.1111/J.1365-3024.2006.00828.X>
- De Rouck, S., İnak, E., Dermauw, W., & Van Leeuwen, T. (2023). A review of the molecular mechanisms of acaricide resistance in mites and ticks. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 159, 103981. <https://doi.org/10.1016/J.IBMB.2023.103981>
- de Waal, T., & Danaher, M. (2014). Veterinary Drugs Residues: Ectoparasitocides. *Encyclopedia of Food Safety*, 3, 76–80. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378612-8.00247-X>
- Del Pino, J., Frejo, M. T., Baselga, M. J. A., Moyano, P., & Díaz, M. J. (2015). Impaired glutamatergic and GABAergic transmission by amitraz in primary hippocampal cells. *Neurotoxicology and Teratology*, 50, 82–87. <https://doi.org/10.1016/J.NTT.2015.06.007>
- Dermauw, W., Van Leeuwen, T., & Feyereisen, R. (2020). Diversity and evolution of the P450 family in arthropods. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 127, 103490. <https://doi.org/10.1016/J.IBMB.2020.103490>
- Didgikar, M. R., & Joshi, S. S. (2016). Alkoxyacylation for Fine Chemicals: Carbamates. En *Industrial Catalytic Processes for Fine and Specialty Chemicals* (pp. 693–719). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801457-8.00015-X>
- Dixit, M., & Kumar, A. (2018). Mutagenesis, Genetic Disorders and Diseases. En *Mutagenicity: Assays and Applications* (pp. 1–34). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809252-1.00001-8>
- Drummond, R. O., Ernst, S. E., Trevino, J. L., Gladney, W. J., & Graham, O. H. (1976). Tests of Acaricides for Control of Boophilus annulatus and B. microplus. *Journal of Economic Entomology*, 69(1), 37–40. <https://doi.org/10.1093/JEE/69.1.37>
- Dulbecco, A. B., Moriconi, D. E., Lynn, S., McCarthy, A., Juárez, M. P., Girotti, J. R., & Calderón-Fernández, G. M. (2020). Deciphering the role of Rhodnius prolixus CYP4G genes in straight and methyl-branched hydrocarbon formation and in desiccation tolerance. *Insect Molecular Biology*, 29(5), 431–443. <https://doi.org/10.1111/IMB.12653>
- Dulbecco, A. B., Moriconi, D. E., & Pedrini, N. (2021a). Knockdown of CYP4PR1, a cytochrome P450 gene highly expressed in the integument tissue of Triatoma infestans, increases susceptibility to deltamethrin in pyrethroid-resistant insects. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 173, 104781. <https://doi.org/10.1016/J.PESTBP.2021.104781>
- Dulbecco, A. B., Moriconi, D. E., & Pedrini, N. (2021b). Knockdown of CYP4PR1, a cytochrome P450 gene highly expressed in the integument tissue of Triatoma infestans, increases susceptibility to deltamethrin in pyrethroid-resistant insects. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 173, 104781. <https://doi.org/10.1016/J.PESTBP.2021.104781>
- Ema, M., Sogawa, K., Watanabe, N., Chujoh, Y., Matsushita, N., Gotoh, O., Funae, Y., & Fujii-Kuriyama, Y. (1992). cDNA cloning and structure of mouse putative Ah receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 184(1), 246–253. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(92\)91185-S](https://doi.org/10.1016/0006-291X(92)91185-S)
- Estrada-Peña, A., & Salman, M. (2013). Current Limitations in the Control and Spread of Ticks that Affect Livestock: A Review. *Agriculture 2013*, Vol. 3, Pages 221-235, 3(2), 221–235. <https://doi.org/10.3390/AGRICULTURE3020221>
- Estrada-Peña, A., Venzal, J. M., Nava, S., Mangold, A., Guglielmone, A. A., Labruna, M. B., & De La Fuente, J. (2012). Reinstatement of Rhipicephalus (Boophilus) australis (Acari: Ixodidae) with redescription of the adult and larval stages. *Journal of medical entomology*, 49(4), 794–802. <https://doi.org/10.1603/ME11223>

- Evans, P. D., & Maqueira, B. (2005). Insect octopamine receptors: a new classification scheme based on studies of cloned *Drosophila* G-protein coupled receptors. *Invertebrate Neuroscience*, 5(3–4), 111–118. <https://doi.org/10.1007/s10158-005-0001-z>
- F. Hoffmann-La Roche Ltd. (s/f). *MagNA Lyser Green Beads*. Recuperado el 11 de mayo de 2025, de <https://lifescience.roche.com/global/en/products/others/magna-lyser-green-beads-387121.html>
- Fadahunsi, A. I., Kumm, C., Graham, K., de León, A. A. P., Guerrero, F., Sparagano, O. A. E., & Finn, R. D. (2023). Biochemical characterisation of Cytochrome P450 oxidoreductase from the cattle tick, *Rhipicephalus microplus*, highlights potential new acaricide target. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 14(3), 102148. <https://doi.org/10.1016/J.TTBDIS.2023.102148>
- Fang, F., Wang, W., Zhang, D., Lv, Y., Zhou, D., Ma, L., Shen, B., Sun, Y., & Zhu, C. (2015). The cuticle proteins: a putative role for deltamethrin resistance in *Culex pipiens pallens*. *Parasitology Research*, 114(12), 4421–4429. <https://doi.org/10.1007/S00436-015-4683-9>/METRICS
- FAO. (2004). *Guidelines resistance management and integrated parasite control in ruminants* FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO, Ed.).
- Feng, X., & Liu, N. (2020). Functional Analyses of House Fly Carboxylesterases Involved in Insecticide Resistance. *Frontiers in Physiology*, 11, 595009. <https://doi.org/10.3389/FPHYS.2020.595009>/BIBTEX
- Feng, Y. ning, Yan, J., Sun, W., Zhao, S., Lu, W. C., Li, M., & He, L. (2011). Transcription and induction profiles of two esterase genes in susceptible and acaricide-resistant *Tetranychus cinnabarinus*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 100(1), 70–73. <https://doi.org/10.1016/J.PESTBP.2011.02.007>
- Feyereisen, R. (2012). Insect CYP Genes and P450 Enzymes. *Insect Molecular Biology and Biochemistry*, 236–316. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384747-8.10008-X>
- Feyereisen, R., Dermauw, W., & Van Leeuwen, T. (2015a). Genotype to phenotype, the molecular and physiological dimensions of resistance in arthropods. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 121, 61–77. <https://doi.org/10.1016/J.PESTBP.2015.01.004>
- Feyereisen, R., Dermauw, W., & Van Leeuwen, T. (2015b). Genotype to phenotype, the molecular and physiological dimensions of resistance in arthropods. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 121, 61–77. <https://doi.org/10.1016/J.PESTBP.2015.01.004>
- Ffrench-Constant, R. H., Rocheleau, T. A., Steichen, J. C., & Chalmers, A. E. (1993). A point mutation in a *Drosophila* GABA receptor confers insecticide resistance. *Nature*, 363(6428), 449–451. <https://doi.org/10.1038/363449A0>
- Fortunato, J. J., Agostinho, F. R., Réus, G. Z., Petronilho, F. C., Dal-Pizzol, F., & Quevedo, J. (2006). Lipid peroxidative damage on malathion exposure in rats. *Neurotoxicity Research*, 9(1), 23–28. <https://doi.org/10.1007/BF03033304>/METRICS
- Fry, J. D., & Saweikis, M. (2006). Aldehyde dehydrogenase is essential for both adult and larval ethanol resistance in *Drosophila melanogaster*. *Genetics Research*, 87(2), 87–92. <https://doi.org/10.1017/S0016672306008032>
- Fujii-Kuriyama, Y., Mizukami, Y., Kawajirit, K., Sogawaf, K., & Muramatsu, M. (1982). Primary structure of a cytochrome P-450: Coding nucleotide sequence of phenobarbital-inducible cytochrome P-450 cDNA from rat liver (amino acid sequence/gene cloning/recombinant DNA/primer extension method). En *Proc. Natl Acad. Sci. USA* (Vol. 79). <https://www.pnas.org>
- Fular, A., Gupta, S., Sharma, A. K., Kumar, S., Upadhaya, D., Shakya, M., Nagar, G., & Ghosh, S. (2020). Standardization of tick specific biochemical tools for estimation of esterases, monooxygenases and glutathione S-transferase for characterization of acaricide resistance.

- Pesticide Biochemistry and Physiology*, 164, 130–139.
<https://doi.org/10.1016/J.PESTBP.2020.01.008>
- Fushan, A. A., & Drayna, D. T. (2009). MALS: An efficient strategy for multiple site-directed mutagenesis employing a combination of DNA amplification, ligation and suppression PCR. *BMC Biotechnology*, 9(1), 83. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-9-83/FIGURES/4>
- Gao, L., Qiao, H., Wei, P., Moussian, B., & Wang, Y. (2022). Xenobiotic responses in insects. *Archives of insect biochemistry and physiology*, 109(3).
<https://doi.org/10.1002/ARCH.21869>
- Gersten, D. M., & Gabriel, O. (1992). Staining for enzymatic activity after gel electrophoresis. II. Enzymes modifying nucleic acids. *Analytical biochemistry*, 203(2), 181–186.
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(92\)90300-V](https://doi.org/10.1016/0003-2697(92)90300-V)
- Ghajar, H. A., Ganjizadeh, M., & Roudgari, H. (2025). Molecular biology and genetic change definition. En *Genetics and Epigenetics of Genitourinary Diseases* (pp. 25–35). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-27302-5.00016-4>
- Giray, B., Gürbay, A., & Hincal, F. (2001). Cypermethrin-induced oxidative stress in rat brain and liver is prevented by Vitamin E or allopurinol. *Toxicology Letters*, 118(3), 139–146.
[https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(00\)00277-0](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(00)00277-0)
- Grabherr, M. G., Haas, B. J., Yassour, M., Levin, J. Z., Thompson, D. A., Amit, I., Adiconis, X., Fan, L., Raychowdhury, R., Zeng, Q., Chen, Z., Mauceli, E., Hacohen, N., Gnirke, A., Rhind, N., di Palma, F., Birren, B. W., Nusbaum, C., Lindblad-Toh, K., ... Regev, A. (2011). Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature Biotechnology*, 29(7), 644–652.
- Graham, K. M., Sparagano, O. A. E., & Finn, R. D. (2016). Isolation of the monooxygenase complex from *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* – clues to understanding acaricide resistance. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 7(4), 614–623.
<https://doi.org/10.1016/J.TTBDIS.2016.01.012>
- Grešková, A., & Petřivalský, M. (2024). Thioredoxin System in Insects: Uncovering the Roles of Thioredoxins and Thioredoxin Reductase beyond the Antioxidant Defences. *Insects*, 15(10), 797. <https://doi.org/10.3390/INSECTS15100797>
- Grigoraki, L., Lagnel, J., Kioulos, I., Kampouraki, A., Morou, E., Labbé, P., Weill, M., & Vontas, J. (2015). Transcriptome Profiling and Genetic Study Reveal Amplified Carboxylesterase Genes Implicated in Temephos Resistance, in the Asian Tiger Mosquito *Aedes albopictus*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 9(5), e0003771.
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0003771>
- Gross, A. D., Temeyer, K. B., Day, T. A., Pérez de León, A. A., Kimber, M. J., & Coats, J. R. (2015). Pharmacological characterization of a tyramine receptor from the southern cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 63, 47–53. <https://doi.org/10.1016/J.IBMB.2015.04.008>
- Guerrero, F. D., Li, A. Y., & Hernandez, R. (2002). Molecular diagnosis of pyrethroid resistance in Mexican strains of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*, 39(5), 770–776. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-39.5.770>
- Guest, M., Goodchild, J. A., Bristow, J. A., & Flemming, A. J. (2019). RDL A301S alone does not confer high levels of resistance to cyclodiene organochlorine or phenyl pyrazole insecticides in *Plutella xylostella*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 158, 32–39.
<https://doi.org/10.1016/J.PESTBP.2019.04.005>
- Gupta, A., & Singh, T. R. (2013). SHIFT: Server for hidden stops analysis in frame-shifted translation. *BMC Research Notes*, 6(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-6-68/FIGURES/1>

- Gupta, R. C. (2006). Classification and Uses of Organophosphates and Carbamates. *Toxicology of Organophosphate and Carbamate Compounds*, 5–24. <https://doi.org/10.1016/B978-012088523-7/50003-X>
- Gupta, R. C., Miller Mukherjee, I. R., Malik, J. K., Doss, R. B., Dettbarn, W. D., & Milatovic, D. (2019). Insecticides. En *Biomarkers in Toxicology* (2a ed., pp. 455–475). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814655-2.00026-8>
- Gupta, S., Sangwan, N., Sangwan, A. K., Mann, S., Gupta, S., Kumar, A., & Kumar, S. (2023). Understanding the resistance mechanisms of Rhipicephalus microplus ticks to synthetic pyrethroids and organophosphates in south-west regions of Haryana, North India. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 196, 105634. <https://doi.org/10.1016/J.PESTBP.2023.105634>
- Han, K. A., Millar, N. S., & Davis, R. L. (1998). A Novel Octopamine Receptor with Preferential Expression in Drosophila Mushroom Bodies. *Journal of Neuroscience*, 18(10), 3650–3658. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-10-03650.1998>
- Hao, T. Y., Hamzah, S. N., & Alias, Z. (2020). Defence against Oxidative Stress and Insecticides in Musca domestica. En R. P. Soundararajan & C. Narayanasamy (Eds.), *Trends in Integrated Insect Pest Management* (2). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.87952>
- Hao, T. Y., Hamzah, S. N., Alias, Z., Hao, T. Y., Hamzah, S. N., & Alias, Z. (2020). Defence against Oxidative Stress and Insecticides in *Musca domestica*. *Trends in Integrated Insect Pest Management*. <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.87952>
- 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 and Biophysical Research Communications*, 261(3), 558–561. <https://doi.org/10.1006/BBRC.1999.1076>
- He, H., Chen, A. C., Davey, R. B., Ivie, G. W., Wagner, G. G., & George, J. E. (1999). Sequence Analysis of the Knockdown Resistance-Homologous Region of the Para-Type Sodium Channel Gene from Pyrethroid-Resistant Boophilus microplus (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*, 36(5), 539–543. <https://doi.org/10.1093/JMEDENT/36.5.539>
- Hernandez, E. P., Talactac, M. R., Vitor, R. J. S., Yoshii, K., & Tanaka, T. (2021). An Ixodes scapularis glutathione S-transferase plays a role in cell survival and viability during Langkat virus infection of a tick cell line. *Acta Tropica*, 214, 105763. <https://doi.org/10.1016/J.ACTATROPICA.2020.105763>
- Hernandez, R., He, H., Chen, A. C., Ivie, G. W., George, J. E., & Wagner, G. G. (1999). Cloning and Sequencing of a Putative Acetylcholinesterase cDNA from Boophilus microplus (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*, 36(6), 764–770. <https://doi.org/10.1093/JMEDENT/36.6.764>
- Hernandez, R., He, H., Chen, A. C., Waghela, S. D., Wayne Ivie, G., George, J. E., & Gale Wagner, G. (2000). Identification of a point mutation in an esterase gene in different populations of the southern cattle tick, Boophilus microplus. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 30(10), 969–977. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(00\)00069-2](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(00)00069-2)
- Hernández-Rodríguez, C. S., Moreno-Martí, S., Almecija, G., Christmon, K., Johnson, J. D., Ventelon, M., vanEngelsdorp, D., Cook, S. C., & González-Cabrera, J. (2022). Resistance to amitraz in the parasitic honey bee mite Varroa destructor is associated with mutations in the β -adrenergic-like octopamine receptor. *Journal of Pest Science*, 95(3), 1179–1195. <https://doi.org/10.1007/S10340-021-01471-3/METRICS>
- Hölzer, M., & Marz, M. (2019). De novo transcriptome assembly: A comprehensive cross-species comparison of short-read RNA-Seq assemblers. *GigaScience*, 8(5), 1–16. <https://doi.org/10.1093/GIGASCIENCE/GIZ039>

- Hope, M., Menzies, M., & Kemp, D. (2010a). Identification of a dieldrin resistance-associated mutation in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Journal of economic entomology*, 103(4), 1355–1359. <https://doi.org/10.1603/EC09267>
- Hope, M., Menzies, M., & Kemp, D. (2010b). Identification of a dieldrin resistance-associated mutation in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Journal of Economic Entomology*, 103(4), 1355–1359. <https://doi.org/10.1603/EC09267>,
- Hoy, M. A. (2019). Genetic Systems, Genome Evolution, and Genetic Control of Embryonic Development in Insects. En *Insect Molecular Genetics* (pp. 103–175). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815230-0.00004-2>
- Hu, H. X., Zhou, D., Ma, L., Shen, B., Sun, Y., & Zhu, C. L. (2020). Lipase is associated with deltamethrin resistance in *Culex pipiens pallens*. *Parasitology Research*, 119(1), 23–30. <https://doi.org/10.1007/S00436-019-06489-2/METRICS>
- Huang, Y., Guo, Q., Sun, X., Zhang, C., Xu, N., Xu, Y., Zhou, D., Sun, Y., Ma, L., Zhu, C., & Shen, B. (2018). *Culex pipiens pallens* cuticular protein CPLCG5 participates in pyrethroid resistance by forming a rigid matrix. *Parasites and Vectors*, 11(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/S13071-017-2567-9/FIGURES/5>
- Hubbard, C. B., & Murillo, A. C. (2024). Behavioral resistance to insecticides: current understanding, challenges, and future directions. *Current Opinion in Insect Science*, 63, 101177. <https://doi.org/10.1016/J.COIS.2024.101177>
- Ibañez, F., Miranda-Miranda, E., Jasso-Villazul, C., & Cossío-Bayúgar, R. (2021). Reference Tick strains as an important biological marker for acaricide-resistance Characterization. En *The Entomological Guide to Rhipicephalus* (pp. 177–200).
- Illumina. (2017). *TruSeq Stranded mRNA Reference Guide*. https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/samplepreps_truseq/truseq-stranded-mrna-workflow/truseq-stranded-mrna-workflow-reference-1000000040498-00.pdf
- İnak, E., De Rouck, S., Koç-İnak, N., Erdem, E., Rüstemoğlu, M., Dermauw, W., & Van Leeuwen, T. (2024a). Identification and CRISPR-Cas9 validation of a novel β -adrenergic-like octopamine receptor mutation associated with amitraz resistance in *Varroa destructor*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 204, 106080. <https://doi.org/10.1016/J.PESTBP.2024.106080>
- İnak, E., De Rouck, S., Koç-İnak, N., Erdem, E., Rüstemoğlu, M., Dermauw, W., & Van Leeuwen, T. (2024b). Identification and CRISPR-Cas9 validation of a novel β -adrenergic-like octopamine receptor mutation associated with amitraz resistance in *Varroa destructor*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 204, 106080. <https://doi.org/10.1016/J.PESTBP.2024.106080>
- Janer, E. C., Díaz, A., Fontes, F., Baraibar, F., Saporiti, T., & Olhagaray, M. E. (2021). Molecular survey of pyrethroid and fipronil resistance in isolates of *Rhipicephalus microplus* in the north of Uruguay. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 12(5). <https://doi.org/10.1016/J.TTBDIS.2021.101747>
- Jhala, A. J., & Knezevic, S. Z. (2017). Gene Flow and Herbicide Resistance. *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*, 3, 447–449. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394807-6.00234-3>
- Jia, H., Peiling, L., Yuan, H., Wencai, L., Zhifeng, X., & Lin, H. (2019). P8 nuclear receptor responds to acaricides exposure and regulates transcription of P450 enzyme in the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 224, 108561. <https://doi.org/10.1016/J.CBPC.2019.108561>

- Jongejan, F., Berger, L., Homminga, L., Hulsebos, I., Petersen, A., Ferreira, P. T., Reck, J., & Klafke, G. (2024). Resistance intensity test (RIT): a novel bioassay for quantifying the level of acaricide resistance in *Rhipicephalus microplus* ticks. *Parasites & Vectors*, *17*(1), 480. <https://doi.org/10.1186/S13071-024-06561-6>
- Jongejan, F., & Uilenberg, G. (2004). The global importance of ticks. *Parasitology*, *129*(SUPPL.). <https://doi.org/10.1017/S0031182004005967>
- Jonsson, N. N., Cutullè, 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*(14), 1659–1664. <https://doi.org/10.1016/J.IJPARA.2010.07.006>
- Jordan, P., Gonçalves, V., Fernandes, S., Marques, T., Pereira, M., & Gama-Carvalho, M. (2019). Networks of mRNA Processing and Alternative Splicing Regulation in Health and Disease. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *1157*, 1–27. https://doi.org/10.1007/978-3-030-19966-1_1
- Jung, M. E., Ku, J. M., Du, L., Hu, H., & Gatti, R. A. (2011). Synthesis and evaluation of compounds that induce readthrough of premature termination codons. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, *21*(19), 5842–5848. <https://doi.org/10.1016/J.BMCL.2011.07.107>
- Jyoti, Singh, N. K., Singh, H., Singh, N. K., & Rath, S. S. (2021). Genotyping amitraz resistance profiles in *Rhipicephalus microplus* Canestrini (Acari: Ixodidae) ticks from Punjab, India. *Ticks and Tick-borne Diseases*, *12*(1), 101578. <https://doi.org/10.1016/J.TTBDIS.2020.101578>
- Kaku, K., & Matsumura, F. (1994). Identification of the site of mutation within the M2 region of the GABA receptor of the cyclodiene-resistant German cockroach. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, *108*(3), 367–376. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(94\)E0010-7](https://doi.org/10.1016/0742-8413(94)E0010-7)
- Kallberg, Y., Oppermann, U., Jörnvall, H., & Persson, B. (2002). Short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs). *European journal of biochemistry*, *269*(18), 4409–4417. <https://doi.org/10.1046/J.1432-1033.2002.03130.X>
- Klafke, G. M., Miller, R. J., Tidwell, J. P., Thomas, D. B., Sanchez, D., Feria Arroyo, T. P., & Pérez de León, A. A. (2019). High-resolution melt (HRM) analysis for detection of SNPs associated with pyrethroid resistance in the southern cattle fever tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, *9*, 100–111. <https://doi.org/10.1016/J.IJPDDR.2019.03.001>
- Koner, B. C., Banerjee, B. D., & Ray, A. (1998). Organochlorine pesticide-induced oxidative stress and immune suppression in rats. *Indian journal of experimental biology*, *36*(4), 395–398. <http://europepmc.org/abstract/MED/9717451>
- Krueger, F., James, F., Ewels, P., Afyounian, E., & Schuster-Boeckler, B. (2021). *FelixKrueger/TrimGalore: v0.6.7 - DOI via Zenodo*. Zenodo. <https://doi.org/10.5281/zenodo.5127899>
- Kumar, R., Klafke, G. M., & Miller, R. J. (2020). Voltage-gated sodium channel gene mutations and pyrethroid resistance in *Rhipicephalus microplus*. *Ticks and Tick-borne Diseases*, *11*(3), 101404. <https://doi.org/10.1016/J.TTBDIS.2020.101404>
- Kumar, R., Nagar, G., Sharma, A. K., 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*(2), 237–245. <https://doi.org/10.1016/J.ACTATROPICA.2012.10.006>
- Kumar, S., Sharma, A. K., Kumar, B., Shakya, M., Patel, J. A., Kumar, B., Bisht, N., Chigure, G. M., Singh, K., Kumar, R., Kumar, S., Srivastava, S., Rawat, P., & Ghosh, S. (2021).

- Characterization of deltamethrin, cypermethrin, coumaphos and ivermectin resistance in populations of *Rhipicephalus microplus* in India and efficacy of an antitick natural formulation prepared from *Ageratum conyzoides*. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 12(6), 101818. <https://doi.org/10.1016/J.TTBDIS.2021.101818>
- Kumawat, M., Nabi, B., Daswani, M., Viquar, I., Pal, N., Sharma, P., Tiwari, S., Sarma, D. K., Shubham, S., & Kumar, M. (2023). Role of bacterial efflux pump proteins in antibiotic resistance across microbial species. *Microbial Pathogenesis*, 181, 106182. <https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2023.106182>
- Kwon, D. H., Choi, J. Y., Je, Y. H., & Lee, S. H. (2012). The overexpression of acetylcholinesterase compensates for the reduced catalytic activity caused by resistance-conferring mutations in *Tetranychus urticae*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 42(3), 212–219. <https://doi.org/10.1016/J.IBMB.2011.12.003>
- Kwon, D. H., Clark, J. M., & Lee, S. H. (2010). Extensive gene duplication of acetylcholinesterase associated with organophosphate resistance in the two-spotted spider mite. *Insect Molecular Biology*, 19(2), 195–204. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2583.2009.00958.X>
- Labbé, R., Caveney, S., & Donly, C. (2011). Genetic analysis of the xenobiotic resistance-associated ABC gene subfamilies of the Lepidoptera. *Insect Molecular Biology*, 20(2), 243–256. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2583.2010.01064.X>
- Lagunes-Quintanilla, R., Gómez-Romero, N., Mendoza-Martínez, N., Castro-Saines, E., Galván-Arellano, D., & Basurto-Alcantara, F. J. (2024). Perspectives on using integrated tick management to control *Rhipicephalus microplus* in a tropical region of Mexico. *Frontiers in Veterinary Science*, 11, 1497840. <https://doi.org/10.3389/FVETS.2024.1497840/BIBTEX>
- Latchman, D. S. (1997). Transcription factors: An overview. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 29(12), 1305–1312. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(97\)00085-X](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(97)00085-X)
- Le Goff, G., Hamon, A., Bergé, J. B., & Amichot, M. (2005). Resistance to fipronil in *Drosophila simulans*: influence of two point mutations in the RDL GABA receptor subunit. *Journal of neurochemistry*, 92(6), 1295–1305. <https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.2004.02922.X>
- Li, J., Liu, J., Peng, L., Liu, J., Xu, L., He, J., Sun, L., Shen, G., & He, L. (2025). Functional analysis of SDR112C1 associated with fenpropathrin tolerance in *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval). *Insect Science*, 32(2), 585–599. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.13408>
- Lilly, D. G., Latham, S. L., Webb, C. E., & Doggett, S. L. (2016). Cuticle Thickening in a Pyrethroid-Resistant Strain of the Common Bed Bug, *Cimex lectularius* L. (Hemiptera: Cimicidae). *PLOS ONE*, 11(4), e0153302. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0153302>
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15(12), 1–21. <https://doi.org/10.1186/S13059-014-0550-8/FIGURES/9>
- Lukaszewicz-Hussain, A. (2010). Role of oxidative stress in organophosphate insecticide toxicity – Short review. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 98(2), 145–150. <https://doi.org/10.1016/J.PESTBP.2010.07.006>
- Lumjuan, N., Wicheer, J., Leelapat, P., Choochote, W., & Somboon, P. (2014). Identification and characterisation of *Aedes aegypti* aldehyde dehydrogenases involved in pyrethroid metabolism. *PloS one*, 9(7). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0102746>
- Lv, Y., Pan, Y., Li, J., Ding, Y., Yu, Z., Yan, K., & Shang, Q. (2023). The C2H2 zinc finger transcription factor CF2-II regulates multi-insecticide resistance-related gut-predominant

- ABC transporters in *Aphis gossypii* Glover. *International Journal of Biological Macromolecules*, 253, 126765. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2023.126765>
- M., E., J. M., & R. (2005). Detección de resistencia a los acaricidas en la garrapata del ganado *Boophilus microplus* mediante análisis de zimogramas. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, VI, 1–17. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=63617170013>
- Manchenko, G. P. (1994). *Handbook of detection of enzymes on electrophoretic gels* (Vol. 1). CRC Press.
- Mans, B. J., Gothe, R., & Neitz, A. W. H. (2004). Biochemical perspectives on paralysis and other forms of toxicoses caused by ticks. *Parasitology*, 129(SUPPL.). <https://doi.org/10.1017/S0031182003004670>
- Manzano-Román, R., Díaz-Martín, V., Fuente, J. de la, Pérez-Sánchez, R., Manzano-Román, R., Díaz-Martín, V., Fuente, J. de la, & Pérez-Sánchez, R. (2012). Soft Ticks as Pathogen Vectors: Distribution, Surveillance and Control. En *Parasitology*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/32521>
- Marklund, S. L. (1985). Product of extracellular-superoxide dismutase catalysis. *FEBS Letters*, 184(2), 237–239. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(85\)80613-X](https://doi.org/10.1016/0014-5793(85)80613-X)
- Martin, J. A., & Wang, Z. (2011). Next-generation transcriptome assembly. *Nature Reviews Genetics*, 12(10), 671–682. <https://doi.org/10.1038/NRG3068>
- Martínez-Ibáñez, F. (2016, noviembre 18). *Situación de la Resistencia de B. microplus en México*. <https://www.aphis.usda.gov/sites/default/files/sit-of-the-resis-ofbmicro-in-mx.pdf>
- Martínez-Ibáñez, F., Miranda-Miranda, E., Jasso-Villazul, C. E., & Cossío Bayugar, R. (2021). Reference tick strains as an important biological material for acaricide resistance characterization. En S. Kumar, R. Cossío Bayugar, A. K. Sharma, E. Miranda Miranda, & A. K. Chaubey (Eds.), *The Entomological Guide to Rhipicephalus* (pp. 177–200). Nova Science Publisher Inc.
- Martins, A. J., Brito, L. P., Linss, J. G. B., Rivas, G. B. da S., Machado, R., Bruno, R. V., Lima, J. B. P., Valle, D., & Peixoto, A. A. (2013). Evidence for gene duplication in the voltage-gated sodium channel gene of *Aedes aegypti*. *Evolution, Medicine, and Public Health*, 2013(1), 148. <https://doi.org/10.1093/EMPH/EOT012>
- Maston, G. A., Evans, S. K., & Green, M. R. (2006). Transcriptional regulatory elements in the human genome. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 7(Volume 7, 2006), 29–59. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.GENOM.7.080505.115623/CITE/REFWORKS>
- Mavridis, K., Tsakireli, D., Vlogiannitis, S., Charamis, J., Siden-Kiamos, I., Osabutey, A. F., Soroker, V., & Vontas, J. (2025). Identification and functional characterization of CYP3002B2, a cytochrome P450 associated with amitraz and flumethrin resistance in the major bee parasite *Varroa destructor*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 210, 106364. <https://doi.org/10.1016/J.PESTBP.2025.106364>
- Miller, R. J., Almazán, C., Ortiz-Estrada, M., Davey, R. B., George, J. E., & De León, A. P. (2013). First report of fipronil resistance in *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* of Mexico. *Veterinary Parasitology*, 191(1–2), 97–101. <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2012.08.011>
- Miranda, E., Cossio-Bayugar, R., Tellez-Alaniz, M., Garcia-Vazquez, Z., Rosario-Cruz, R., & Ortiz-Estrada, M. (1995). An enzymatic marker for ixodic resistance detection in the cattle tick *Boophilus microplus*. *Advances in Agricultural Research*, 4, 1–8.
- Miranda, E. M., Hernández, E. L., Arellano, M. E. L., Gives, P. M. de, & Bayúgar, R. C. (2006). Marcadores enzimáticos como indicadores de resistencia a los antihelmínticos en el nematodo parásito gastroentérico de rumiantes *Haemonchus contortus*. *Bioquímica*, 31(1), 6–12. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57631102>

- Miranda-Miranda, E., Aguilar-Díaz, H., Arreguín-Pérez, A., Sachman-Ruiz, B., Fernández-Rubalcaba, M., & Cossio-Bayugar, R. (2016). GLUTATIÓN S TRANSFERASA COMO MARCADOR DE RESISTENCIA A LOS ACARICIDAS EN LA GARRAPATA DEL GANADO *Rhipicephalus microplus* (ACARI: IXODIDAE). *Entomología mexicana*, 3, 45–50. www.fermentas.com
- Miranda-Miranda, R. C.-B. H. A.-D. and I. A.-E. (2023). Identification of *Rhipicephalus microplus* xenobiotic metabolizing enzymes by zymography and transcriptome-based bioinformatics, en A laboratory Manual on *Rhipicephalus microplus*. En Raquel Cossio-Bayugar, Estefan Miranda-Miranda, & Sachin Kumar. (Eds.), *A laboratory Manual on Rhipicephalus microplus* (pp. 190-213.). Lady Stephenson.
- Montella, I. R., Schama, R., & Valle, D. (2012). The classification of esterases: An important gene family involved in insecticide resistance - A review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 107(4), 437–449. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762012000400001>
- Moreton, J., Izquierdo, A., & Emes, R. D. (2016). Assembly, assessment, and availability of De novo generated eukaryotic transcriptomes. *Frontiers in Genetics*, 6(JAN), 361. <https://doi.org/10.3389/FGENE.2015.00361/BIBTEX>
- Morgan, J. A. T., 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 acaricides. *International Journal for Parasitology*, 39(7), 775–779. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.12.006>
- Motoyama, N., Kao, L. R., Lin, P. T., & Dauterman, W. C. (1984). Dual role of esterases in insecticide resistance in the green rice leafhopper. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 21(2), 139–147. [https://doi.org/10.1016/0048-3575\(84\)90049-X](https://doi.org/10.1016/0048-3575(84)90049-X)
- Mueller, O., Lightfoot, S., & Schroeder, A. (2016). *RNA Integrity Number (RIN)-Standardization of RNA Quality Control Application*. <https://www.agilent.com/cs/library/applications/5989-1165EN.pdf>
- Muthu Lakshmi Bavithra, C., Murugan, M., Pavithran, S., & Naveena, K. (2023). Enthralling genetic regulatory mechanisms meddling insecticide resistance development in insects: role of transcriptional and post-transcriptional events. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 10, 1257859. <https://doi.org/10.3389/FMOLB.2023.1257859/XML>
- Nagar, G., Upadhaya, D., Sharma, A. K., Kumar, R., Fular, A., & Ghosh, S. (2021). Association between overexpression of cytochrome P450 genes and deltamethrin resistance in *Rhipicephalus microplus*. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 12(2), 101610. <https://doi.org/10.1016/J.TTBDIS.2020.101610>
- Nagaya, Y., Kutsukake, M., Chigusa, S. I., & Komatsu, A. (2002). A trace amine, tyramine, functions as a neuromodulator in *Drosophila melanogaster*. *Neuroscience Letters*, 329(3), 324–328. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(02\)00596-7](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(02)00596-7)
- Nagi, S. C., & Ingham, V. A. (2025). A multi-omic meta-analysis reveals novel mechanisms of insecticide resistance in malaria vectors. *Communications Biology*, 8(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/S42003-025-08221-6;TECHMETA>
- Narlikar, L., & Ovcharenko, I. (2009). Identifying regulatory elements in eukaryotic genomes. *Briefings in functional Genomics and Proteomics*, 8, 125–230. <https://doi.org/10.1093/bfpg/elp014>
- Nelson, D. R. (2018). Cytochrome P450 diversity in the tree of life. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1866(1), 141–154. <https://doi.org/10.1016/J.BBAPAP.2017.05.003>
- Ngoc, D. P., Ha, T. D. T., Ngoc, S. N., Ngoc, M. P., Nhu, N. D., Farkas, R., Teeraananchai, S., & Hornok, S. (2025). The current status and predicted climate-driven range expansion of

- Rhipicephalus microplus in northern Vietnam. *Acta Tropica*, 268, 107732. <https://doi.org/10.1016/J.ACTATROPICA.2025.107732>
- Nogueira Domingues, L., dos Santos Alves Figueiredo Brasil, B., Passos de Paiva Bello, A. C., Pinto da Cunha, A., Thadeu Medeiros de Barros, A., Cerqueira Leite, R., Silaghi, C., Pfister, K., & Friche Passos, L. M. (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(2–4), 327–332. <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2012.04.031>
- Obaid, M. K., Islam, N., Alouffi, A., Khan, A. Z., da Silva Vaz, I., Tanaka, T., & Ali, A. (2022). Acaricides Resistance in Ticks: Selection, Diagnosis, Mechanisms, and Mitigation. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 941831. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2022.941831/BIBTEX>
- Ogden, N. H., & Lindsay, L. R. (2016). Effects of Climate and Climate Change on Vectors and Vector-Borne Diseases: Ticks Are Different. *Trends in Parasitology*, 32(8), 646–656. <https://doi.org/10.1016/J.PT.2016.04.015>
- Oliveira, P. R. de, Bechara, G. H., Denardi, S. E., Pizano, M. A., & Mathias, M. I. C. (2011). Toxicity effect of the acaricide fipronil in semi-engorged females of the tick Rhipicephalus sanguineus (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): Preliminary determination of the minimum lethal concentration and LC50. *Experimental Parasitology*, 127(2), 418–422. <https://doi.org/10.1016/J.EXPPARA.2010.09.009>
- O'Reilly, A. O., Williamson, M. S., González-Cabrera, J., Turberg, A., Field, L. M., Wallace, B. A., & Davies, T. G. E. (2014). Predictive 3D modelling of the interactions of pyrethroids with the voltage-gated sodium channels of ticks and mites. *Pest Management Science*, 70(3), 369–377. <https://doi.org/10.1002/PS.3561>
- Ortiz, M., Fragoso, H., Soberanes, N., Santamaría, M., & Ortiz, A. (1995). Epidemiología de la resistencia a ixodídeos piretróides en garrapatas Boophilus microplus en la República Mexicana. En S. Rodríguez & H. Fragoso (Eds.), *Seminario Internacional de Parasitología Animal-Resistencia y Control en Garrapatas y Moscas de Importancia Veterinaria* (pp. 45–57).
- Otali, D., Novak, R. J., Wan, W., Bu, S., Moellering, D. R., & De Luca, M. (2014). Increased production of mitochondrial reactive oxygen species and reduced adult life span in an insecticide-resistant strain of Anopheles gambiae. *Bulletin of entomological research*, 104(3), 323. <https://doi.org/10.1017/S0007485314000091>
- Paessler, S., McBride, J. W., Stich, R. W., Moutailler, S., Gondard, M., Cabezas-Cruz, A., Charles, R. A., Vayssier-Taussat, M., & Albina, E. (2017). Ticks and Tick-Borne Pathogens of the Caribbean: Current Understanding and Future Directions for More Comprehensive Surveillance. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* | www.frontiersin.org, 7, 490. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00490>
- Palermo, G., Kovarik, Z., & Hotchkiss, P. J. (2022). Newly scheduled carbamate compounds: A synopsis of their properties and development, and considerations for the scientific community. *Toxicology*, 480, 153322. <https://doi.org/10.1016/J.TOX.2022.153322>
- Pan, Y., Wen, S., Chen, X., Gao, X., Zeng, X., Liu, X., Tian, F., & Shang, Q. (2020). UDP-glycosyltransferases contribute to spirotetramat resistance in Aphis gossypii Glover. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 166, 104565. <https://doi.org/10.1016/J.PESTBP.2020.104565>
- Parra-Bracamonte, G. M., Lopez-Villalobos, N., Morris, S. T., & Vázquez-Armijo, J. F. (2020). An overview on production, consumer perspectives and quality assurance schemes of beef in Mexico. *Meat Science*, 170, 108239. <https://doi.org/10.1016/J.MEATSCI.2020.108239>

- Parra-Bracamonte, G., Magaña, J., Delgado, R., Osorio-Arce, M., & Segura-Correa, J. (2005). Genetic and non-genetic effects on productive and reproductive traits of cows in dual-purpose herds in southeastern Mexico. *Genetics and Molecular Research*, 4(3), 482–490. www.funpecrp.com.br/FUNPEC-RP
- Pedrini, N., Mijailovsky, S. J., Girotti, J. R., Stariolo, R., Cardozo, R. M., Gentile, A., & Juárez, M. P. (2009a). Control of Pyrethroid-Resistant Chagas Disease Vectors with Entomopathogenic Fungi. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 3(5), e434. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0000434>
- Pedrini, N., Mijailovsky, S. J., Girotti, J. R., Stariolo, R., Cardozo, R. M., Gentile, A., & Juárez, M. P. (2009b). Control of pyrethroid-resistant chagas disease vectors with entomopathogenic fungi. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 3(5). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0000434>,
- Perez-Cogollo, L. C., Rodriguez-Vivas, R. I., Ramirez-Cruz, G. T., & Miller, R. J. (2010). First report of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* resistant to ivermectin in Mexico. *Veterinary Parasitology*, 168(1–2), 165–169. <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2009.10.021>
- Petroianu, G. A. (2010). History of organophosphate synthesis: The very early days. *Pharmazie*, 65(4), 306–311. <https://doi.org/10.1691/PH.2010.9141>
- Pohl, P. C., Klafke, G. M., Carvalho, D. D., Martins, J. R., Daffre, S., Da Silva Vaz, I., & Masuda, A. (2011). ABC transporter efflux pumps: A defense mechanism against ivermectin in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *International Journal for Parasitology*, 41(13–14), 1323–1333. <https://doi.org/10.1016/J.IJPARA.2011.08.004>
- Poulsen, L. L., & Ziegler, D. M. (1979). The liver microsomal FAD-containing monooxygenase. Spectral characterization and kinetic studies. *Journal of Biological Chemistry*, 254(14), 6449–6455. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)50388-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)50388-4)
- Prado-Ochoa, M. G., Muñoz-Guzmán, M. A., Abrego-Reyes, V. H., Velázquez-Sánchez, A. M., Lara-Rocha, M., Cuenca-Verde, C., Angeles, E., & Alba-Hurtado, F. (2013). Effect of new ethyl and methyl carbamates on biological parameters and reproduction of the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. *Veterinary Parasitology*, 194(1), 49–57. <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2012.12.026>
- Rabadiya, D., & Behr, M. (2024). The biology of insect chitinases and their roles at chitinous cuticles. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 165, 104071. <https://doi.org/10.1016/J.IBMB.2024.104071>
- Reid, W. R., Sun, H., Becnel, J. J., Clark, A. G., & Scott, J. G. (2019). Overexpression of a glutathione S-transferase (Mdgst) and a galactosyltransferase-like gene (Mdgt1) is responsible for imidacloprid resistance in house flies. *Pest Management Science*, 75(1), 37–44. <https://doi.org/10.1002/PS.5125>
- Remedio, R. N., Nunes, P. H., & Camargo-Mathias, M. I. (2015). The extensible integument of *Rhipicephalus sanguineus* female ticks in different feeding stages: a morphological approach. *Acta Zoologica*, 96(3), 319–327. <https://doi.org/10.1111/AZO.12079>
- Remnant, E. J., Good, R. T., Schmidt, J. M., Lumb, C., Robin, C., Daborn, P. J., & Batterham, P. (2013). Gene duplication in the major insecticide target site, Rdl, in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(36), 14705–14710. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1311341110>
- Rinkevich, F. D., Moreno-Martí, S., Hernández-Rodríguez, C. S., & González-Cabrera, J. (2023). Confirmation of the Y215H mutation in the β 2-octopamine receptor in *Varroa destructor* is associated with contemporary cases of amitraz resistance in the United States. *Pest Management Science*, 79(8), 2840–2845.

<https://doi.org/10.1002/PS.7461>;SUBPAGE:STRING:ABSTRACT;REQUESTEDJOURNAL:JOURNAL:15264998;WGROU:STRING:PUBLICATION

- Robbertse, L., Baron, S., van der Merwe, N. A., Madder, M., Stoltz, W. H., & Maritz-Olivier, C. (2016). Genetic diversity, acaricide resistance status and evolutionary potential of a *Rhipicephalus microplus* population from a disease-controlled cattle farming area in South Africa. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 7(4), 595–603. <https://doi.org/10.1016/J.TTBDIS.2016.02.018>
- Rodriguez-Vivas, R. I., Jonsson, N. N., & Bhushan, C. (2017). Strategies for the control of *Rhipicephalus microplus* ticks in a world of conventional acaricide and macrocyclic lactone resistance. *Parasitology Research* 2017 117:1, 117(1), 3–29. <https://doi.org/10.1007/S00436-017-5677-6>
- Rojas-Cabeza, J. F., Moreno-Cordova, E. N., Ayala-Zavala, J. F., Ochoa-Teran, A., Sonenshine, D. E., Valenzuela, J. G., & Sotelo-Mundo, R. R. (2025). A review of acaricides and their resistance mechanisms in hard ticks and control alternatives with synergistic agents. *Acta Tropica*, 261, 107519. <https://doi.org/10.1016/J.ACTATROPICA.2024.107519>
- Rosa, M. E., Oliveira, R. S., de Faria Barbosa, R., Hyslop, S., & Dal Belo, C. A. (2024). Recent advances on the influence of fipronil on insect behavior. *Current Opinion in Insect Science*, 65, 101251. <https://doi.org/10.1016/J.COIS.2024.101251>
- Ross, M. K., Borazjani, A., Edwards, C. C., & Potter, P. M. (2006). Hydrolytic metabolism of pyrethroids by human and other mammalian carboxylesterases. *Biochemical pharmacology*, 71(5), 657–669. <https://doi.org/10.1016/J.BCP.2005.11.020>
- Roy, B. C., Estrada-Peña, A., Krücken, J., Rehman, A., & Nijhof, A. M. (2018). Morphological and phylogenetic analyses of *Rhipicephalus microplus* ticks from Bangladesh, Pakistan and Myanmar. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 9(5), 1069–1079. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.03.035>
- Rukmini, M. S., D'Souza, B., & D'Souza, V. (2004). Superoxide dismutase and catalase activities and their correlation with malondialdehyde in schizophrenic patients. *Indian journal of clinical biochemistry : IJCB*, 19(2), 114–118. <https://doi.org/10.1007/BF02894268>
- Sachin, K., Anil, K., Sharma, S., & Raquel, C.-B. (2021). Tick resistance to acaricide diagnosis en The Entomological Guide to *Rhipicephalus*. En y Raquel Cossio-Bayugar, Estefan Miranda-Miranda, & Sachin Kumar. (Eds.), *A laboratory Manual on Rhipicephalus microplus* (pp. 214-231.). Lady Stephenson Library.
- Sahara, A., Nugraheni, Y. R., Patra, G., Prastowo, J., & Priyowidodo, D. (2019). Ticks (Acari: Ixodidae) infestation on cattle in various regions in Indonesia. *Veterinary World*, 12(11), 1755. <https://doi.org/10.14202/VETWORLD.2019.1755-1759>
- Sahraeian, S. M. E., Mohiyuddin, M., Sebra, R., Tilgner, H., Afshar, P. T., Au, K. F., Bani Asadi, N., Gerstein, M. B., Wong, W. H., Snyder, M. P., Schadt, E., & Lam, H. Y. K. (2017). Gaining comprehensive biological insight into the transcriptome by performing a broad-spectrum RNA-seq analysis. *Nature Communications*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/S41467-017-00050-4>
- Schrider, D. R., Houle, D., Lynch, M., & Hahn, M. W. (2013). Rates and genomic consequences of spontaneous mutational events in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 194(4), 937–954. <https://doi.org/10.1534/GENETICS.113.151670>
- Scott, J. G. (2026). Insect UDP-glycosyltransferases and xenobiotic metabolism. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 216, 106731. <https://doi.org/10.1016/J.PESTBP.2025.106731>
- Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. (1994, septiembre 21). *INFORME DE REVISIÓN SISTEMÁTICA CORRESPONDIENTE A LA NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-006-ZOO-1993, REQUISITOS DE EFECTIVIDAD BIOLÓGICA PARA LOS IXODICIDAS DE*

- USO BOVINOS Y MÉTODOS DE PRUEBA*. Diario oficial de la federación. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/755783/Informe_de_Revisi_n__Quinquenal_NOM-006-ZOO-1993_SPZ.pdf
- Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. (1998, abril 6). *MODIFICACION a la Norma Oficial Mexicana NOM-006-ZOO-1993, Requisitos de efectividad biológica para los ixodidas de uso en bovinos y método de prueba*. Diario Oficial. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/202274/Modificaci_n_NOM-006-ZOO-1993_060498.pdf
- Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. (2024, septiembre 18). *Ganadería Bovina en México: Un Orgullo Nacional* | Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural | Gobierno | gob.mx. <https://www.gob.mx/agricultura/es/articulos/ganaderia-bovina-en-mexico-un-orgullo-nacional>
- Sehlmeyer, S., Wang, L., Langel, D., Heckel, D. G., Mohagheghi, H., Petschenka, G., & Ober, D. (2010). Flavin-Dependent Monooxygenases as a Detoxification Mechanism in Insects: New Insights from the Arctiids (Lepidoptera). *PLoS ONE*, 5(5), e10435. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0010435>
- Servicio Nacional de Sanidad, I. y C. (2025, enero 31). *Situación actual Campaña Nacional para el control de la garrapata Boophilus spp.* | Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria | Gobierno | gob.mx. <https://www.gob.mx/senasica/documentos/situacion-actual-del-control-de-la-garrapata-boophilus-spp>
- Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. (2025, enero 31). *Situación actual Campaña Nacional para el control de la garrapata Boophilus spp.* | Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria | Gobierno | gob.mx. Situación actual Campaña Nacional para el control de la garrapata Boophilus spp. <https://www.gob.mx/senasica/documentos/situacion-actual-del-control-de-la-garrapata-boophilus-spp>
- Shakya, M., Sharma, A. K., Kumar, S., Upadhaya, D., Nagar, G., Singh, K., M, S., & Ghosh, S. (2023). Acaricides resistance in Rhipicephalus microplus and expression profile of ABC-transporter genes in the sampled populations. *Experimental Parasitology*, 252, 108584. <https://doi.org/10.1016/J.EXPPARA.2023.108584>
- Shi, G. Q., Zhang, Z., Jia, K. L., Zhang, K., An, D. X., Wang, G., Zhang, B. L., & Yin, H. N. (2014). Characterization and expression analysis of peroxiredoxin family genes from the silkworm Bombyx mori in response to phoxim and chlorpyrifos. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 114(1), 24–31. <https://doi.org/10.1016/J.PESTBP.2014.07.007>
- Shumate, S., Haylett, M., Nelson, B., Young, N., Lamour, K., Walsh, D., Bradford, B., & Clements, J. (2023). Using targeted sequencing and TaqMan approaches to detect acaricide (bifenthrin, bifenazate, and etoxazole) resistance associated SNPs in Tetranychus urticae collected from peppermint fields and hop yards. *PLOS ONE*, 18(3), e0283211. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0283211>
- Singh, P., & Kumar, S. (2019). Microbial Enzyme in Food Biotechnology. *Enzymes in Food Biotechnology: Production, Applications, and Future Prospects*, 19–28. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813280-7.00002-5>
- Soberanes-Céspedes, N., SantamaríaVargas, M., Fragoso-Sánchez, H., & García-Vázquez, Z. (2002). Primer caso de resistencia al amitraz en la garrapata del ganado Boophilus microplus en México. *Técnica Pecuaria en México*, 40(1), 81–92. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61340106>
- Soderlund, D. M. (2011). Molecular Mechanisms of Pyrethroid Insecticide Neurotoxicity: Recent Advances. *Archives of Toxicology*, 86(2), 165. <https://doi.org/10.1007/S00204-011-0726-X>

- Sparks, T. C., & Nauen, R. (2015). IRAC: Mode of action classification and insecticide resistance management. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 121, 122–128. <https://doi.org/10.1016/J.PESTBP.2014.11.014>
- Stone, B. F., & Haydock, K. P. (1962). A method for measuring the acaricide-susceptibility of the cattle tick *Boophilus microplus* (Can.). *Bulletin of Entomological Research*, 53(3), 563–578. <https://doi.org/10.1017/S000748530004832X>
- Stone, N. E., Olafson, P. U., Davey, R. B., Buckmeier, G., Bodine, D., Sidak-Loftis, L. C., Giles, J. R., Duhaime, R., Miller, R. J., Mosqueda, J., Scoles, G. A., Wagner, D. M., & Busch, J. D. (2014a). 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(1), 456. <https://doi.org/10.1186/S13071-014-0456-Z>
- Stone, N. E., Olafson, P. U., Davey, R. B., Buckmeier, G., Bodine, D., Sidak-Loftis, L. C., Giles, J. R., Duhaime, R., Miller, R. J., Mosqueda, J., Scoles, G. A., Wagner, D. M., & Busch, J. D. (2014b). Multiple mutations in the para-sodium channel gene are associated with pyrethroid resistance in *Rhipicephalus microplus* from the United States and Mexico. *Parasites and Vectors*, 7(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/S13071-014-0456-Z/FIGURES/3>
- Sun, W., Chen, S., Liu, L., Jiang, Z., Feng, K., & He, L. (2024). Study on susceptibility differences of *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval) males and females to acaricides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 205, 106112. <https://doi.org/10.1016/J.PESTBP.2024.106112>
- Sungirai, M., Baron, S., Moyo, D. Z., 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(1), 2–9. <https://doi.org/10.1016/J.TTBDIS.2017.10.017>
- Tai, P. W. L., Kapinas, K., Lian, J. B., van Wijnen, A. J., Stein, J. L., & Stein, G. S. (2013). Gene Regulation. En *Brenner's Encyclopedia of Genetics* (Second Edition, pp. 216–220). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.00602-1>
- Takata, M., Misato, S., Ozoe, F., & Ozoe, Y. (2020). A point mutation in the β -adrenergic-like octopamine receptor: possible association with amitraz resistance. *Pest Management Science*, 76(11), 3720–3728. <https://doi.org/10.1002/PS.5921>
- Tchigossou, G., Djouaka, R., Akoton, R., Riveron, J. M., Irving, H., Atoyebi, S., Moutairou, K., Yessoufou, A., & Wondji, C. S. (2018). Molecular basis of permethrin and DDT resistance in an *Anopheles funestus* population from Benin. *Parasites and Vectors*, 11(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/S13071-018-3115-Y/FIGURES/4>
- Temeyer, K. B., Pruet, J. H., & Olafson, P. U. (2010). Baculovirus expression, biochemical characterization and organophosphate sensitivity of rBmAChE1, rBmAChE2, and rBmAChE3 of *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*. *Veterinary Parasitology*, 172(1–2), 114–121. <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2010.04.016>
- Temeyer, K. B., Pruet, J. H., Olafson, P. U., & Chen, A. C. (2007). R86Q, a mutation in BmAChE3 yielding a *Rhipicephalus microplus* organophosphate-insensitive acetylcholinesterase. *Journal of medical entomology*, 44(6), 1013–1018. [https://doi.org/10.1603/0022-2585\(2007\)44\[1013:RAMIBY\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0022-2585(2007)44[1013:RAMIBY]2.0.CO;2)
- Temeyer, K. B., Pruet, J. H., Untalan, P. M., & Chen, A. C. (2006). Baculovirus Expression of BmAChE3, a cDNA Encoding an Acetylcholinesterase of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*, 43(4), 707–712. <https://doi.org/10.1093/JMEDENT/43.4.707>
- Temeyer, K. B., Schlechte, K. G., & McDonough, W. P. (2019). Baculoviral Expression of Presumptive OP-Resistance Mutations in BmAChE1 of *Rhipicephalus* (*Boophilus*)

- microplus (Ixodida: Ixodidae) and Biochemical Resistance to OP Inhibition. *Journal of medical entomology*, 56(5), 1318–1323. <https://doi.org/10.1093/JME/TJZ062>
- Temeyer, K. B., Tuckow, A. P., Brake, D. K., Li, A. Y., & Pérez De León, A. A. (2013). Acetylcholinesterases of blood-feeding flies and ticks. *Chemico-Biological Interactions*, 203(1), 319–322. <https://doi.org/10.1016/J.CBI.2012.09.010>
- Termanini, R. (2020). Synthesizing DNA-encoded data. En *Storing Digital Binary Data in Cellular DNA* (pp. 173–224). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823295-8.00007-0>
- Thatheyus, A. J., Deborah, A., & Selvam, G. (2013). Synthetic Pyrethroids: Toxicity and Biodegradation. *Applied Ecology and Environmental Sciences*, 1(3), 33–36. <https://doi.org/10.12691/AEES-1-3-2>
- Thawng, C. N., & Smith, G. B. (2022). A transcriptome software comparison for the analyses of treatments expected to give subtle gene expression responses. *BMC Genomics*, 23(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/S12864-022-08673-8/TABLES/3>
- Thermo Fisher Scientific. (2016). *NanoDrop Micro-UV/Vis Spectrophotometers NanoDrop One User Guide*. <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/3091-NanoDrop-One-Help-UG-en.pdf>
- Thomas, J. H. (2007). Rapid Birth–Death Evolution Specific to Xenobiotic Cytochrome P450 Genes in Vertebrates. *PLOS Genetics*, 3(5), e67. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.0030067>
- Thompson, M., Shotkoski, F., & ffrench-Constant, R. (1993). Cloning and sequencing of the cyclodiene insecticide resistance gene from the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*: Conservation of the gene and resistance associated mutation with *Drosophila*. *FEBS Letters*, 325(3), 187–190. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)81070-G](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)81070-G)
- Thompson, M., Steichen, J. C., & Ffrench-Constant, R. H. (1993). Conservation of cyclodiene insecticide resistance-associated mutations in insects. *Insect Molecular Biology*, 2(3), 149–154. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2583.1993.TB00134.X>
- Tian, X., Sun, X., & Su, J. (2014). Biochemical mechanisms for metaflumizone resistance in beet armyworm, *Spodoptera exigua*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 113(1), 8–14. <https://doi.org/10.1016/J.PESTBP.2014.06.010>
- Torgerson, T. R. (2020). Genetics of primary immune deficiencies. En *Stiehm's Immune Deficiencies: Inborn Errors of Immunity* (pp. 133–142). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816768-7.00005-3>
- Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva y Bioinformática. (s/f). *Catalogo de servicios*. Recuperado el 11 de mayo de 2025, de <http://www.uusmb.unam.mx/servicios.html>
- Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva y Bioinformática. (2022). *Laboratorio Nacional de Apoyo Tecnológico a las Ciencias Genómicas*. <http://www.uusmb.unam.mx/preguntasFrecuentes.html>
- Van Leeuwen, T., Dermauw, W., Mavridis, K., & Vontas, J. (2020). Significance and interpretation of molecular diagnostics for insecticide resistance management of agricultural pests. *Current Opinion in Insect Science*, 39, 69–76. <https://doi.org/10.1016/J.COIS.2020.03.006>
- Vasiliou, V., & Nebert, D. W. (2005). Analysis and update of the human aldehyde dehydrogenase (ALDH) gene family. *Human genomics*, 2(2), 138–143. <https://doi.org/10.1186/1479-7364-2-2-138>
- Vázquez-Gómez, G., Rubio-Lightbourn, J., Espinosa-Aguirre, J. J., Vázquez-Gómez, G., Rubio-Lightbourn, J., & Espinosa-Aguirre, J. J. (2016). Mecanismos de acción del receptor de hidrocarburos de arilos en el metabolismo del benzo[a]pireno y el desarrollo de tumores.

- TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 19(1), 54–67.
<https://doi.org/10.1016/J.RECQB.2016.02.006>
- Venthur, H., Lizana, P., Manosalva, L., Rojas, V., Godoy, R., Rocha, A., Aguilera, I., Palma-Millanao, R., Fajardo, V., Quiroz, A., & Mutis, A. (2022). Analysis of glutathione-S-transferases from larvae of *Galleria mellonella* (Lepidoptera, Pyralidae) with potential alkaloid detoxification function. *Frontiers in Physiology*, 13, 989006.
<https://doi.org/10.3389/FPHYS.2022.989006/BIBTEX>
- Vijay, S., Rawal, R., Kadian, K., Raghavendra, K., & Sharma, A. (2015). Annotated Differentially Expressed Salivary Proteins of Susceptible and Insecticide-Resistant Mosquitoes of *Anopheles stephensi*. *PLOS ONE*, 10(3), e0119666.
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0119666>
- Villar, D., Klafke, G. M., Rodríguez-Durán, A., Bossio, F., Miller, R., Pérez de León, A. A., Cortés-Vecino, J. A., & Chaparro-Gutiérrez, J. J. (2020). Resistance profile and molecular characterization of pyrethroid resistance in a *Rhipicephalus microplus* strain from Colombia. *Medical and Veterinary Entomology*, 34(1), 105–115.
<https://doi.org/10.1111/MVE.12418>
- Villavicencio-Gutiérrez, M. del R., Callejas-Juárez, N., Rogers-Montoya, N. A., González-Hernández, V., González-López, R., Martínez-García, C. G., Martínez-Castañeda, F. E., Villavicencio-Gutiérrez, M. del R., Callejas-Juárez, N., Rogers-Montoya, N. A., González-Hernández, V., González-López, R., Martínez-García, C. G., & Martínez-Castañeda, F. E. (2023). Prospectiva ambiental al 2030 en sistemas de producción de leche de vaca en México. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 14(4), 760–781.
<https://doi.org/10.22319/RMCP.V14I4.6410>
- Vogel, H., Heidel, A. J., Heckel, D. G., & Groot, A. T. (2010). Transcriptome analysis of the sex pheromone gland of the noctuid moth *Heliothis virescens*. *BMC Genomics*, 11(1), 1–21.
<https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-29/FIGURES/9>
- Vontas, J., Blass, C., Koutsos, A. C., David, J. P., Kafatos, F. C., Louis, C., Hemingway, J., Christophides, G. K., & Ranson, H. (2005). Gene expression in insecticide resistant and susceptible *Anopheles gambiae* strains constitutively or after insecticide exposure. *Insect molecular biology*, 14(5), 509–521. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2583.2005.00582.X>
- Vontas, J. G., Small, G. J., & Hemingway, J. (2001). Glutathione S-transferases as antioxidant defence agents confer pyrethroid resistance in *Nilaparvata lugens*. *The Biochemical journal*, 357(Pt 1), 65–72. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3570065>
- Vudriko, P., Umemiya-Shirafuji, R., Okwee-Acai, J., Tayebwa, D. S., Byaruhanga, J., Bbira, J. S., Fujisaki, K., Xuan, X., & Suzuki, H. (2018). C190A knockdown mutation in sodium channel domain II of pyrethroid-resistant *Rhipicephalus appendiculatus*. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 9(6), 1590–1593. <https://doi.org/10.1016/J.TTBDIS.2018.08.007>
- Waldman, J., Klafke, G. M., & Júnior, I. da S. V. (2023). Mechanisms of Acaricide Resistance in Ticks. En *Acta Scientiae Veterinariae* (Vol. 51). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. <https://doi.org/10.22456/1679-9216.128913>
- Waldman, J., Klafke, G. M., Tirloni, L., Logullo, C., & da Silva Vaz, I. (2023). Putative target sites in synganglion for novel ixodid tick control strategies. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 14(3), 102123. <https://doi.org/10.1016/J.TTBDIS.2023.102123>
- Wang, J., & Stresser, D. M. (2022). Principles of Pharmacodynamics and Toxicodynamics. En *Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology: Volume 1: Principles and Practice of Toxicologic Pathology* (2a ed., Vol. 1, pp. 101–112). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821044-4.00027-3>
- Wang, Q., Jia, Y., Wang, Y., Jiang, Z., Zhou, X., Zhang, Z., Nie, C., Li, J., Yang, N., & Qu, L. (2019). Evolution of cis- And trans-regulatory divergence in the chicken genome between

- two contrasting breeds analyzed using three tissue types at one-day-old. *BMC Genomics*, 20(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/S12864-019-6342-5/FIGURES/4>
- Wen, X., Feng, K., Wei, P., Li, J., Li, M., Dou, W., Guo, Z., Zhang, Y., & He, L. (2025). The ROS–FOXO pathway mediates broad-spectrum detoxification of acaricides in *Tetranychus cinnabarinus*. *Communications Biology* 2025 8:1, 8(1), 1–18. <https://doi.org/10.1038/s42003-025-08726-0>
- Wheelock, C. E., Shan, G., & Ottea, J. (2005). Overview of Carboxylesterases and Their Role in the Metabolism of Insecticides. *Journal of Pesticide Science*, 30(2), 75–83. <https://doi.org/10.1584/jpestics.30.75>
- Wittenstein, A., Caspi, M., Rippin, I., Elroy-Stein, O., Eldar-Finkelman, H., Thoms, S., & Rosin-Arbesfeld, R. (2023). Nonsense mutation suppression is enhanced by targeting different stages of the protein synthesis process. *PLOS Biology*, 21(11), e3002355. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.3002355>
- Wright, F. C., & Ahrens, E. H. (1988). Cholinesterase Insensitivity: A Mechanism of Resistance in Mexican Strains of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) Against Coumaphos. *Journal of Medical Entomology*, 25(4), 234–239. <https://doi.org/10.1093/JMEDENT/25.4.234>
- Xi, P., Guan, T., Liu, X., Li, X., Dou, Z., Shi, L., Huang, J., Jiang, L., Situ, J., Li, M., Kong, G., & Jiang, Z. (2025). A major facilitator superfamily transporter PIMFS1 contributes to growth, oosporogenesis, and pathogenesis of *Peronophythora litchii*. *Horticultural Plant Journal*, 11(1), 189–198. <https://doi.org/10.1016/J.HPJ.2023.09.003>
- Xin, T., Kong, X., Jiang, C., Wang, H., Wang, J., & Xia, B. (2024). Biological and biochemical responses of *Panonychus citri* (Acari: Tetranychidae) exposed to sublethal concentrations of cyflumetofen. *Crop Protection*, 178, 106604. <https://doi.org/10.1016/J.CROPRO.2024.106604>
- Xu, X., Meng, X., Zhang, N., Jiang, H., Ge, H., Qian, K., & Wang, J. (2021). The cytosolic sulfotransferase gene TcSULT1 is involved in deltamethrin tolerance and regulated by CncC in *Tribolium castaneum*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 177, 104905. <https://doi.org/10.1016/J.PESTBP.2021.104905>
- Yan, J., Tung, H. C., Li, S., Niu, Y., Garbacz, W. G., Lu, P., Bi, Y., Li, Y., He, J., Xu, M., Ren, S., Monga, S. P., Schwabe, R. F., Yang, D., & Xie, W. (2019). Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling Prevents Activation of Hepatic Stellate Cells and Liver Fibrogenesis in Mice. *Gastroenterology*, 157(3), 793. <https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2019.05.066>
- Yessinou, R. E., Akpo, Y., Sidick, A., Adoligbe, C., Youssao Abdou Karim, I., Akogbeto, M., & Farougou, S. (2018). Evidence of multiple mechanisms of alphacypermethrin and deltamethrin resistance in ticks *Rhipicephalus microplus* in Benin, West Africa. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 9(3), 665–671. <https://doi.org/10.1016/J.TTBDIS.2018.02.013>
- Yin, J., Yamba, F., Zheng, C., Zhou, S., Smith, S. J., Wang, L., Li, H., Xia, Z., & Xiao, N. (2021). Molecular Detection of Insecticide Resistance Mutations in *Anopheles gambiae* from Sierra Leone Using Multiplex SNaPshot and Sequencing. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 666469. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2021.666469/BIBTEX>
- Zhang, X., Li, Y., Wang, J., Zhang, T., Li, T., Dong, W., Ma, E., & Zhang, J. (2016). Identification and characteristic analysis of the catalase gene from *Locusta migratoria*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 132, 125–131. <https://doi.org/10.1016/J.PESTBP.2016.03.010>
- Zhou, X., Ma, C., Li, M., Sheng, C., Liu, H., & Qiu, X. (2010). CYP9A12 and CYP9A17 in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*: sequence similarity, expression profile and xenobiotic response. *Pest management science*, 66(1), 65–73. <https://doi.org/10.1002/PS.1832>

- Zhu, T., Li, W., Zhu, X., Zheng, W., Xu, T., & Sun, Y. (2025). Identification and functional regulation of three alternative splicing isoforms of the Ythdc2 gene in *Miichthys miiuy*. *Developmental & Comparative Immunology*, 166, 105351. <https://doi.org/10.1016/J.DCI.2025.105351>
- Ziapour, S. P., Kheiri, S., Fazeli-Dinan, M., Sahraei-Rostami, F., Mohammadpour, R. A., Aarabi, M., Nikookar, S. H., Sarafrazi, M., Asgarian, F., Enayati, A., & Hemingway, J. (2017). Pyrethroid resistance in Iranian field populations of *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 136, 70–79. <https://doi.org/10.1016/J.PESTBP.2016.08.001>

17. ANEXOS

17.1 BASES DE DATOS.

Tabla 31.-Tabla de la base de datos utilizada para filtrar las lecturas para el ensamble individual de las acetilcolinesterasas.

Bases de datos	Numero de secuencias	Pares de bases
AchE1 AchE2 AchE3	64	147330
Identificadores		
AJ223965.1, KT215342.1, OR378375.1, OR378376.1, AJ278345.1, AJ278344.1, AJ278342.1, AJ278343.1, AF067771.1, AY267337.1, KX670385.1, KT215340.1, KT215337.1, GU944963.2, TRINITY_GG_16425_c0_g1_i12, TRINITY_GG_16829_c0_g1_i1, TRINITY_GG_16907_c0_g1_i2, TRINITY_GG_16907_c0_g1_i3, TRINITY_GG_16907_c0_g1_i4, TRINITY_GG_16907_c0_g1_i5, TRINITY_GG_5608_c12_g1_i7, TRINITY_GG_5715_c0_g1_i2, TRINITY_GG_5715_c0_g1_i3, TRINITY_GG_5715_c0_g1_i5, TRINITY_GG_5715_c0_g1_i7, TRINITY_GG_5715_c0_g1_i9, TRINITY_GG_5715_c13_g1_i1, TRINITY_GG_5715_c13_g1_i3, TRINITY_GG_5715_c13_g1_i4, TRINITY_GG_5715_c13_g1_i5, TRINITY_GG_5715_c16_g1_i1, TRINITY_GG_5715_c16_g1_i11, TRINITY_GG_5715_c1_g1_i1, TRINITY_GG_5715_c1_g1_i2, TRINITY_GG_5715_c1_g1_i3, TRINITY_GG_5715_c1_g1_i4, TRINITY_GG_5715_c1_g1_i6, TRINITY_GG_5715_c1_g1_i7, TRINITY_GG_5715_c1_g1_i9, TRINITY_GG_5715_c20_g1_i2, TRINITY_GG_5715_c2_g1_i5, TRINITY_GG_5715_c2_g1_i8, TRINITY_GG_5715_c2_g1_i9, TRINITY_GG_5715_c30_g1_i1, TRINITY_GG_5715_c31_g1_i1, TRINITY_GG_5715_c36_g1_i1, TRINITY_GG_5715_c3_g1_i1, TRINITY_GG_5715_c3_g1_i3, TRINITY_GG_5715_c3_g1_i4, TRINITY_GG_5715_c3_g1_i7, TRINITY_GG_5715_c3_g1_i8, TRINITY_GG_5715_c6_g1_i16, TRINITY_GG_5715_c6_g1_i20, TRINITY_GG_5715_c6_g1_i3, TRINITY_GG_5715_c8_g1_i1, TRINITY_GG_5715_c8_g1_i4, TRINITY_GG_5715_c8_g1_i5, TRINITY_GG_5715_c9_g1_i2, TRINITY_GG_5715_c9_g1_i5, TRINITY_GG_5908_c8_g1_i1, TRINITY_GG_5908_c8_g1_i6, TRINITY_GG_5908_c8_g1_i8, TRINITY_GG_6497_c5_g1_i2		

Tabla 32.- Tabla de la base de datos utilizada para filtrar las lecturas para el ensamble individual del canal de cloro activado por ácido gama-aminobutírico.

Bases de datos	Numero de secuencias	Pares de bases
Canal de cloruro activado por ácido Gama butírico	15	20822
Identificadores		
GQ398111.1, GQ398112.1, MH801932.1, MH801933.1, MH801934.1, GQ398111.1, GQ398112.1, MH801932.1, MH801933.1, MH801934.1, TRINITY_DN1243_c1_g1_i7, TRINITY_DN1243_c1_g1_i3, TRINITY_DN3414_c1_g1_i1, TRINITY_DN3414_c1_g2_i1, TRINITY_GG_9318_c8_g1_i2		

Tabla 33.-Tabla de la base de datos utilizada para filtrar las lecturas para el ensamble individual de los receptores de octopaminas.

Bases de datos	Numero de secuencias		Pares de bases
octopaminas	159		567,772
Identificadores			
XM_075887219.1,	XM_037421701.2,	XM_075887217.1,	XM_075887216.1,
XM_075887215.1,	XM_075894650.1,	XM_037426518.2,	XM_075877250.1,
XM_075877249.1,	XM_075689923.1,	XM_075672144.1,	XM_075672136.1,
XM_075672127.1,	XM_075677257.1,	XM_074745535.1,	XM_074745534.1,
XM_074741051.1,	XM_074741050.1,	XM_074737716.1,	XM_050192214.3,
XM_070531428.1,	XM_064600371.1,	XM_064609831.1,	XM_064609830.1,
XM_064609828.1,	XM_064609827.1,	XM_054311331.1,	XM_054310618.1,
XM_053351894.1,	XM_053351268.1,	XM_053351266.1,	XM_053351265.1,
XM_053351264.1,	XM_053350889.1,	XM_053350888.1,	XM_053350887.1,
XM_053350886.1,	XM_053350884.1,	XM_053349552.1,	XM_053349551.1,
XM_053349550.1,	XM_053349549.1,	XM_053349548.1,	XM_053349547.1,
XM_053358275.1,	MZ855513.1,	MZ855512.1,	XM_049662811.1,
XM_037648820.2,	XM_037648699.2,	XM_049420385.1,	XM_037651671.1,
MT656571.1,	MN928576.1,	MN928575.1,	KU836748.1,
KU836747.1,	KU836746.1,	KU836745.1,	KU836744.1,
KU836743.1,	KU836742.1,	KU836741.1,	KU836740.1,
KU836739.1,	KU836738.1,	HM151377.1,	EF490688.1,
EF490687.1,	PP156773.1,	PP156772.1,	PP156771.1,
PP156770.1,	PP156769.1,	PP156768.1,	PP156767.1,
PP156766.1,	PP156765.1,	PP156764.1,	OR978331.1,
OR978330.1,	OR978329.1,	OR978328.1,	OR978327.1,
OR978326.1,	OR978325.1,	OR978320.1,	MZ198231.1,
MZ198230.1,	MT814702.1,	MT814700.1,	XM_042287388.1,
XM_042287387.1,	XM_042287386.1,	XM_029985306.4,	XM_029985307.4,
XM_042290367.1,	XM_029110495.1,	XM_015929872.2,	XM_022843483.1,
XM_022843482.1,	XM_022843481.1,	XM_022843480.1,	XM_022843479.1,
XM_022834146.1,	XM_022808969.1,	XM_022808968.1,	XM_022808967.1,
XM_022808966.1,	XM_022808965.1,	XM_022808964.1,	XM_022808963.1,
XM_022808962.1,	XM_022814607.1,	XM_022814602.1,	XM_022814594.1,
EU669576.1,	JN974909.1,	JN974908.1,	XM_037428976.2,
XM_075894620.1,	XM_075894570.1,	XM_055074063.2,	XM_050183532.3,
XM_050183529.3,	XM_072287891.1,	XM_050183531.3,	XM_055074062.2,
XM_050193513.3,	XM_070530693.1,	XM_070530692.1,	XM_070530691.1,
XM_070530690.1,	XM_065426755.1,	XM_065426754.1,	XM_065426753.1,
XM_065426751.1,	XM_065426750.1,	XM_065426749.1,	IACW01032120.1,
IACW01032121.1,	IACW01032122.1,	IACW01038677.1,	IACW01022540.1,
IACW01029584.1,	XM_075819480.1,	XM_075730881.1,	XM_075730039.1,
XM_064628736.1,	XM_064628731.1,	XM_054302800.1,	MZ855516.1,
MZ855515.1,	MZ855514.1,	MZ855511.1,	XM_037651670.2,
XM_037651669.2,	AJ010743.1		

Tabla 34.-Tabla de la base de datos utilizada para filtrar las lecturas para el ensamble individual del canal de sodio presináptico

Bases de datos	Numero de secuencias	Pares de bases
Canal de sodio	49	28,7742
Identificadores		
OP612720.1, ON552241.1, FJ387018.1, KU866097.1, KU866096.1, KU866095.1, KU866094.1, KU866093.1, KF771994.1, KF771993.1, KF771992.1, KF771991.1, KF771990.1, NM_001323169.1, HM117902.1, XM_075891653.1, XM_075823778.1, XM_075823777.1, XM_075734263.1, XM_075734261.1, XM_075734260.1, XM_075734259.1, XM_075680915.1, XM_075680914.1, XM_075680913.1, XM_075680912.1, XM_074738986.1, XM_074738985.1, XM_074738984.1, XM_074738983.1, XM_074738981.1, XM_072286412.1, XM_072286411.1, XM_072286410.1, XM_055077118.2, XM_070531852.1, LC555743.1, MH591213.1, MH591212.1, MH607137.1, IACW01034779.1, IACW01036585.1, IACW01032533.1, IACW01032534.1, IACW01033568.1, IACW01036722.1, MN535172.1, MN535171.1, MH591214.1		

17.2 ALINEAMIENTOS MÚLTIPLES CON LAS REFERENCIAS

17.2.1 AChE1

Tabla 35.-Fragmentos del alineamiento múltiple para cada una de las mutaciones reportadas y para aquellas encontradas en este estudio para la enzima acetilcolinesterasa 1

Mutación	Alineamiento
P157S	Consensus Identity 1. CAA11702.1_AchE1_Rhipicephalus_microplus_Baxter_Becker_1998 2. AJA71270.1_AchE1_Rhipicephalus_microplus 3. zacatecas_TRINITY_DN2_c0_g1_i1_1 4. zacatecas_TRINITY_DN2_c0_g1_i11_1 5. zacatecas_TRINITY_DN2_c0_g1_i12_1 6. zacatecas_TRINITY_DN2_c0_g1_i10_1 7. zacatecas_TRINITY_DN2_c0_g1_i13_1 8. zacatecas_TRINITY_DN2_c0_g1_i3_1 9. Rancho_nuevo_TRINITY_DN12_c0_g1_i1_1 10. Rancho_nuevo_TRINITY_DN12_c0_g1_i12_1 11. Rancho_nuevo_TRINITY_DN12_c0_g1_i13_1 12. Rancho_nuevo_TRINITY_DN12_c0_g1_i14_1 13. Rancho_nuevo_TRINITY_DN12_c0_g1_i16_1 14. Vargas_TRINITY_DN11_c0_g2_i1_1 15. Vargas_TRINITY_DN11_c0_g2_i3_1 16. Vargas_TRINITY_DN11_c0_g2_i4_1 P157S 180 A P G S P T S S G G R A P G P P T S S G G R A P G P P T S S G G R A P G S P T S S G G R A P G S P T S S G G R A P G S P T S S G G R A P G S P T S S G G R A P G S P T S S G G R A P G P P T S S G G R A P G P P T S S G G R A P G P P T S S G G R A P G S P T S S G G R A P G S P T S S G G R A P G S P T S S G G R

S282G

S282G

300

Consensus

Identity

1. CAA11702.1_AchE1_Rhipicephalus_microplus_Baxter_Becker_1998
2. AJA71270.1_AchE1_Rhipicephalus_microplus
3. zacatecas_TRINITY_DN2_c0_g1_i1_1
4. zacatecas_TRINITY_DN2_c0_g1_i11_1
5. zacatecas_TRINITY_DN2_c0_g1_i12_1
6. zacatecas_TRINITY_DN2_c0_g1_i10_1
7. zacatecas_TRINITY_DN2_c0_g1_i13_1
8. zacatecas_TRINITY_DN2_c0_g1_i3_1
9. Rancho_nuevo_TRINITY_DN12_c0_g1_i1_1
10. Rancho_nuevo_TRINITY_DN12_c0_g1_i12_1
11. Rancho_nuevo_TRINITY_DN12_c0_g1_i13_1
12. Rancho_nuevo_TRINITY_DN12_c0_g1_i14_1
13. Rancho_nuevo_TRINITY_DN12_c0_g1_i16_1
14. Vargas_TRINITY_DN11_c0_g2_i1_1
15. Vargas_TRINITY_DN11_c0_g2_i3_1
16. Vargas_TRINITY_DN11_c0_g2_i4_1

R	V	I	L	Q	S	G	S	P
R	V	I	L	Q	S	G	S	P
R	V	I	L	Q	S	G	S	P
R	V	I	L	Q	S	G	S	P
R	V	I	L	Q	S	G	S	P
R	V	I	L	Q	S	G	S	P
R	V	I	L	Q	S	G	S	P
R	V	I	L	Q	S	G	S	P
R	V	I	L	Q	S	G	S	P
R	V	I	L	Q	S	G	S	P
R	V	I	L	Q	S	G	S	P
R	V	I	L	Q	S	G	S	P
R	V	I	L	Q	S	G	S	P
R	V	I	L	Q	S	G	S	P
R	V	I	L	Q	S	G	S	P
R	V	I	L	Q	S	G	S	P

V331A

V331A

349

Consensus

Identity

1. CAA11702.1_AchE1_Rhipicephalus_microplus_Baxter_Becker_1998
2. AJA71270.1_AchE1_Rhipicephalus_microplus
3. zacatecas_TRINITY_DN2_c0_g1_i1_1
4. zacatecas_TRINITY_DN2_c0_g1_i11_1
5. zacatecas_TRINITY_DN2_c0_g1_i12_1
6. zacatecas_TRINITY_DN2_c0_g1_i10_1
7. zacatecas_TRINITY_DN2_c0_g1_i13_1
8. zacatecas_TRINITY_DN2_c0_g1_i3_1
9. Rancho_nuevo_TRINITY_DN12_c0_g1_i1_1
10. Rancho_nuevo_TRINITY_DN12_c0_g1_i12_1
11. Rancho_nuevo_TRINITY_DN12_c0_g1_i13_1
12. Rancho_nuevo_TRINITY_DN12_c0_g1_i14_1
13. Rancho_nuevo_TRINITY_DN12_c0_g1_i16_1
14. Vargas_TRINITY_DN11_c0_g2_i1_1
15. Vargas_TRINITY_DN11_c0_g2_i3_1
16. Vargas_TRINITY_DN11_c0_g2_i4_1

R	P	E	D	I	V	N	N
R	P	E	D	I	V	N	N
R	P	E	D	I	V	N	N
R	P	E	D	I	V	N	N
R	P	E	D	I	V	N	N
R	P	E	D	I	V	N	N
R	P	E	D	I	V	N	N
R	P	E	D	I	V	N	N
R	P	E	D	I	V	N	N
R	P	E	D	I	V	N	N
R	P	E	D	I	V	N	N
R	P	E	D	I	V	N	N
R	P	E	D	I	V	N	N
R	P	E	D	I	V	N	N
R	P	E	D	I	V	N	N
R	P	E	D	I	V	N	N

A360T
T362A

Consensus	D T P Q A L T D R G S F
Identity	
1. CAA11702.1_AchE1_Rhipicephalus_microplus_Baxter_Becker_1998	D T P Q A L T D K G S F
2. AJA71270.1_AchE1_Rhipicephalus_microplus	D T P Q T L M D R G S F
3. zacatecas_TRINITY_DN2_c0_g1_i11_1	D T P Q T L M D R G S F
4. zacatecas_TRINITY_DN2_c0_g1_i11_1	D T P Q A L T D R G S F
5. zacatecas_TRINITY_DN2_c0_g1_i12_1	D T P Q A L T D R G S F
6. zacatecas_TRINITY_DN2_c0_g1_i10_1	D T P Q A L T D R G S F
7. zacatecas_TRINITY_DN2_c0_g1_i13_1	D T P Q A L T D R G S F
8. zacatecas_TRINITY_DN2_c0_g1_i3_1	D T P Q A L T D R G S F
9. Rancho_nuevo_TRINITY_DN12_c0_g1_i1_1	D T P Q T L M D R G S F
10. Rancho_nuevo_TRINITY_DN12_c0_g1_i12_1	D T P Q A L T D K G S F
11. Rancho_nuevo_TRINITY_DN12_c0_g1_i13_1	D T P Q A L T D K G S F
12. Rancho_nuevo_TRINITY_DN12_c0_g1_i14_1	D T P Q A L T D K G S F
13. Rancho_nuevo_TRINITY_DN12_c0_g1_i16_1	D T P Q A L T D K G S F
14. Vargas_TRINITY_DN11_c0_g2_i1_1	D T P Q A L T D K G S F
15. Vargas_TRINITY_DN11_c0_g2_i3_1	D T P Q A L T D K G S F
16. Vargas_TRINITY_DN11_c0_g2_i4_1	D T P Q A L T D K G S F

F390S

Consensus	F L Q Y F F G F P V T
Identity	
1. CAA11702.1_AchE1_Rhipicephalus_microplus_Baxter_Becker_1998	F L Q Y F F G F P V T
2. AJA71270.1_AchE1_Rhipicephalus_microplus	F L Q Y F F G F P V T
3. zacatecas_TRINITY_DN2_c0_g1_i11_1	F L Q Y F F G F P V T
4. zacatecas_TRINITY_DN2_c0_g1_i11_1	F L Q Y F F G F P V T
5. zacatecas_TRINITY_DN2_c0_g1_i12_1	F L Q Y F F G F P V T
6. zacatecas_TRINITY_DN2_c0_g1_i10_1	F L Q Y F F G F P V T
7. zacatecas_TRINITY_DN2_c0_g1_i13_1	F L Q Y F F G F P V T
8. zacatecas_TRINITY_DN2_c0_g1_i3_1	F L Q Y F F G F P V T
9. Rancho_nuevo_TRINITY_DN12_c0_g1_i1_1	F L Q Y F F G L P L T
10. Rancho_nuevo_TRINITY_DN12_c0_g1_i12_1	F L Q Y F F G L P L T
11. Rancho_nuevo_TRINITY_DN12_c0_g1_i13_1	F L Q Y F F G L P L T
12. Rancho_nuevo_TRINITY_DN12_c0_g1_i14_1	F L Q Y F F G L P L T
13. Rancho_nuevo_TRINITY_DN12_c0_g1_i16_1	F L Q Y F F G L P L T
14. Vargas_TRINITY_DN11_c0_g2_i1_1	F L Q Y F F G F P V T
15. Vargas_TRINITY_DN11_c0_g2_i3_1	F L Q Y F F G F P V T
16. Vargas_TRINITY_DN11_c0_g2_i4_1	F L Q Y F F G F P V T

N566D	Consensus Identity 1. CAA11702.1_AchE1_Rhipicephalus_microplus_Baxter_Becker_1998 2. AJA71270.1_AchE1_Rhipicephalus_microplus 3. zacatecas_TRINITY_DN2_c0_g1_i1_1 4. zacatecas_TRINITY_DN2_c0_g1_i11_1 5. zacatecas_TRINITY_DN2_c0_g1_i12_1 6. zacatecas_TRINITY_DN2_c0_g1_i10_1 7. zacatecas_TRINITY_DN2_c0_g1_i13_1 8. zacatecas_TRINITY_DN2_c0_g1_i3_1 9. Rancho_nuevo_TRINITY_DN12_c0_g1_i1_1 10. Rancho_nuevo_TRINITY_DN12_c0_g1_i12_1 11. Rancho_nuevo_TRINITY_DN12_c0_g1_i13_1 12. Rancho_nuevo_TRINITY_DN12_c0_g1_i14_1 13. Rancho_nuevo_TRINITY_DN12_c0_g1_i16_1 14. Vargas_TRINITY_DN11_c0_g2_i1_1 15. Vargas_TRINITY_DN11_c0_g2_i3_1 16. Vargas_TRINITY_DN11_c0_g2_i4_1 580584 V L D V N E S V V L D V N E S V V L D V N E S V V L D V N E S V V L D V N E S V V L D V N E S V V L D V N E S V V L D V N E S V V L D V N E S V V L D V N E S V V L D V N E S V V L D V N E S V V L D V N E S V V L D V N E S V V L D V N E S V V L D V N E S V
W571R, W57F T576A N583D P590A	Consensus Identity 1. CAA11702.1_AchE1_Rhipicephalus_microplus_Baxter_Becker_1998 2. AJA71270.1_AchE1_Rhipicephalus_microplus 3. zacatecas_TRINITY_DN2_c0_g1_i1_1 4. zacatecas_TRINITY_DN2_c0_g1_i11_1 5. zacatecas_TRINITY_DN2_c0_g1_i12_1 6. zacatecas_TRINITY_DN2_c0_g1_i10_1 7. zacatecas_TRINITY_DN2_c0_g1_i13_1 8. zacatecas_TRINITY_DN2_c0_g1_i3_1 9. Rancho_nuevo_TRINITY_DN12_c0_g1_i1_1 10. Rancho_nuevo_TRINITY_DN12_c0_g1_i12_1 11. Rancho_nuevo_TRINITY_DN12_c0_g1_i13_1 12. Rancho_nuevo_TRINITY_DN12_c0_g1_i14_1 13. Rancho_nuevo_TRINITY_DN12_c0_g1_i16_1 14. Vargas_TRINITY_DN11_c0_g2_i1_1 15. Vargas_TRINITY_DN11_c0_g2_i3_1 16. Vargas_TRINITY_DN11_c0_g2_i4_1 589600610613 V G R A H R Q T Y C D F W E N V R R N R T P P V P S C V G W A H R Q T Y C D F W E N V R R N R T P P V P S C V G R A H R Q T Y C D F W E N V R R N R T P P V P S C V G W A H R Q T Y C D F W E N V R R N R T P P V P S C V G W A H R Q T Y C D F W E N V R R N R T P P V P S C V G W A H R Q T Y C D F W E N V R R N R T P P V P S C V G W A H R Q T Y C D F W E N V R R N R T P P V P S C V G W A H R Q T Y C D F W E N V R R N R T P P V P S C V G W A H R Q T Y C D F W E N V R R N R T P P V P S C V G W A H R Q T Y C D F W E N V R R N R T P P V P S C V G W A H R Q T Y C D F W E N V R R N R T P P V P S C V G W A H R Q T Y C D F W E N V R R N R T P P V P S C V G W A H R Q T Y C D F W E N V R R N R T P P V P S C V G W A H R Q T Y C D F W E N V R R N R T P P V P S C V G W A H R Q T Y C D F W E N V R R N R T P P V P S C V G W A H R Q T Y C D F W E N V R R N R T P P V P S C

17.2.2 AChE2

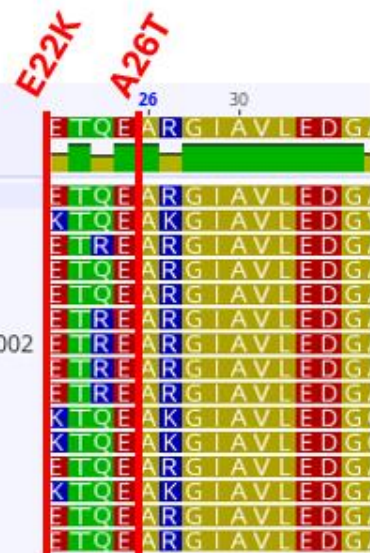
Tabla 36.-Fragmentos del alineamiento múltiple para cada una de las mutaciones reportadas y para aquellas encontradas en este estudio para la enzima acetilcolinesterasa 2

Mutación	Alineamiento
F9L	Consensus Identity 1. AAC18857.1_AchE2_R_microplus_Temeyer_etal_2013 2. ALD51321.1_R_microplus_AchE2 3. CAB93509.1_AchE2_Rhipicephalus_microplus 4. WKZ09323.1_AchE2_Rhipicephalus_microplus 5. WKZ09324.1_AchE2_Rhipicephalus_microplus 6. CAB93511.1_AchE2_R_microplus_S_ultimo_Baxter_backer_2002 7. CAB93510.1_AchE2_R_microplus_Baxter_MtAlfornd_Baxter_Back... 8. CAB93508.1_AchE2_R_microplus_Ctrl_Baxter_Becker_2002 9. CAB93509.1_AchE2_R_microplus_Biarra_Baxter_Becker_2002 10. Zacatecas_TRINITY_DN15_c0_g1_i3_1 11. Zacatecas_TRINITY_DN15_c0_g1_i6_1 12. Rancho_nuevo_TRINITY_DN15_c0_g1_i2_1 13. Rancho_nuevo_TRINITY_DN15_c0_g1_i3_1 14. Vargas_TRINITY_DN13_c0_g1_i2_2 15. Vargas_TRINITY_DN13_c0_g1_i3_2 1 9 10 F9L A10T M Y V R V S L V F A S A W I I M Y V R V S L V F A S V W I I M Y M R V S L V F A S A W I I M Y V R V S L V F A S A W I I M Y V R V S L V F A S A W I I M Y V R V S L V F A S A W I I M Y V R V S F V F A S A W I I M Y M R V S L V F A S A W I I M Y M R V S L V F A S A W I I M Y V R V S L V F A S A W I I M Y V R V S L V F A S A W I I M Y V R V S L V F A S A W I I M Y V R V S L V F T S V W I I M Y V R V S L V F A S A W I I M Y V R V S L V F A S A W I I

**E22K
A26T**

Consensus
Identity

1. AAC18857.1_AchE2_R_microplus_Temeyer_etal_2013
2. ALD51321.1_R_microplus_AchE2
3. CAB93509.1_AchE2_Rhipicephalus_microplus
4. WKZ09323.1_AchE2_Rhipicephalus_microplus
5. WKZ09324.1_AchE2_Rhipicephalus_microplus
6. CAB93511.1_AchE2_R_microplus_S_ultimo_Baxter_backer_2002
7. CAB93510.1_AchE2_R_microplus_Baxter_MtAlfornd_Baxter_Backer_2002
8. CAB93508.1_AchE2_R_microplus_Ctrl_Baxter_Becker_2002
9. CAB93509.1_AchE2_R_microplus_Biarra_Baxter_Becker_2002
10. Zacatecas_TRINITY_DN15_c0_g1_i3_1
11. Zacatecas_TRINITY_DN15_c0_g1_i6_1
12. Rancho_nuevo_TRINITY_DN15_c0_g1_i2_1
13. Rancho_nuevo_TRINITY_DN15_c0_g1_i3_1
14. Vargas_TRINITY_DN13_c0_g1_i2_2
15. Vargas_TRINITY_DN13_c0_g1_i3_2



E75G

Consensus
Identity

1. AAC18857.1_AchE2_R_microplus_Temeyer_etal_2013
2. ALD51321.1_R_microplus_AchE2
3. CAB93509.1_AchE2_Rhipicephalus_microplus
4. WKZ09323.1_AchE2_Rhipicephalus_microplus
5. WKZ09324.1_AchE2_Rhipicephalus_microplus
6. CAB93511.1_AchE2_R_microplus_S_ultimo_Baxter_backer_2002
7. CAB93510.1_AchE2_R_microplus_Baxter_MtAlfornd_Baxter_Back...
8. CAB93508.1_AchE2_R_microplus_Ctrl_Baxter_Becker_2002
9. CAB93509.1_AchE2_R_microplus_Biarra_Baxter_Becker_2002
10. Zacatecas_TRINITY_DN15_c0_g1_i3_1
11. Zacatecas_TRINITY_DN15_c0_g1_i6_1
12. Rancho_nuevo_TRINITY_DN15_c0_g1_i2_1
13. Rancho_nuevo_TRINITY_DN15_c0_g1_i3_1
14. Vargas_TRINITY_DN13_c0_g1_i2_2
15. Vargas_TRINITY_DN13_c0_g1_i3_2



W114R

	110	114	120
Consensus	RNLLWLPYDQQKS		
Identity	[Green bar]		
1. AAC18857.1_AchE2_R_microplus_Temeyer_etal_2013	RNLLWLPYDQQKS		
2. ALD51321.1_R_microplus_AchE2	RNLLWLPYDQQKS		
3. CAB93509.1_AchE2_Rhipicephalus_microplus	RNLLWLPYDHQKS		
4. WKZ09323.1_AchE2_Rhipicephalus_microplus	RNLLWLPYDQQKS		
5. WKZ09324.1_AchE2_Rhipicephalus_microplus	RNLLWLPYDQQKS		
6. CAB93511.1_AchE2_R_microplus_S_ultimo_Baxter_backer_2002	RNLLWLPYDHQKS		
7. CAB93510.1_AchE2_R_microplus_Baxter_MtAlfornd_Baxter_Backer_2002	RNLLWLPYDHQKS		
8. CAB93508.1_AchE2_R_microplus_Ctrl_Baxter_Becker_2002	RNLLWLPYDHQKS		
9. CAB93509.1_AchE2_R_microplus_Biarra_Baxter_Becker_2002	RNLLWLPYDHQKS		
10. Zacatecas_TRINITY_DN15_c0_g1_i3_1	RNLLWLPYDQQKS		
11. Zacatecas_TRINITY_DN15_c0_g1_i6_1	RNLLWLPYDQQKS		
12. Rancho_nuevo_TRINITY_DN15_c0_g1_i2_1	RNLLWLPYDQQKS		
13. Rancho_nuevo_TRINITY_DN15_c0_g1_i3_1	RNLLWLPYDQQKS		
14. Vargas_TRINITY_DN13_c0_g1_i2_2	RNLLWLPYDQQKS		
15. Vargas_TRINITY_DN13_c0_g1_i3_2	RNLLWLPYDQQKS		

W114R

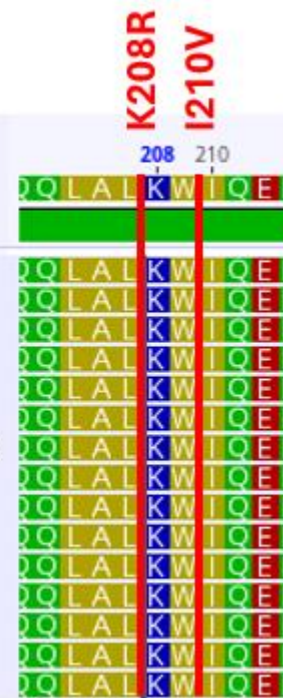
L141F

Consensus	TPRLNTSAGLPVM
Identity	
1. AAC18857.1_AchE2_R_microplus_Temeyer_etal_2013	TPRLNTSAGLPVM
2. ALD51321.1_R_microplus_AchE2	TPRLNTSAGLSVM
3. CAB93509.1_AchE2_Rhipicephalus_microplus	TPRLNTSAGLPVM
4. WKZ09323.1_AchE2_Rhipicephalus_microplus	TPRLNTSAGLPVM
5. WKZ09324.1_AchE2_Rhipicephalus_microplus	TPRLNTSAGLPVM
6. CAB93511.1_AchE2_R_microplus_S_ultimo_Baxter_backer_2002	TPRLNTSAGLPVM
7. CAB93510.1_AchE2_R_microplus_Baxter_MtAlfornd_Baxter_Back...	TPRLNTSAGLPVM
8. CAB93508.1_AchE2_R_microplus_Ctrl_Baxter_Becker_2002	TPRLNTSAGLPVM
9. CAB93509.1_AchE2_R_microplus_Biarra_Baxter_Becker_2002	TPRLNTSAGLPVM
10. Zacatecas_TRINITY_DN15_c0_g1_i3_1	TPRLNTSAGLPVM
11. Zacatecas_TRINITY_DN15_c0_g1_i6_1	TPRLNTSAGLPVM
12. Rancho_nuevo_TRINITY_DN15_c0_g1_i2_1	TPRLNTSAGLPVM
13. Rancho_nuevo_TRINITY_DN15_c0_g1_i3_1	TPRLNTSAGLPVM
14. Vargas_TRINITY_DN13_c0_g1_i2_2	TPRLNTSAGLPVM
15. Vargas_TRINITY_DN13_c0_g1_i3_2	TPRLNTSAGLPVM

K208R
I210V

Consensus
Identity

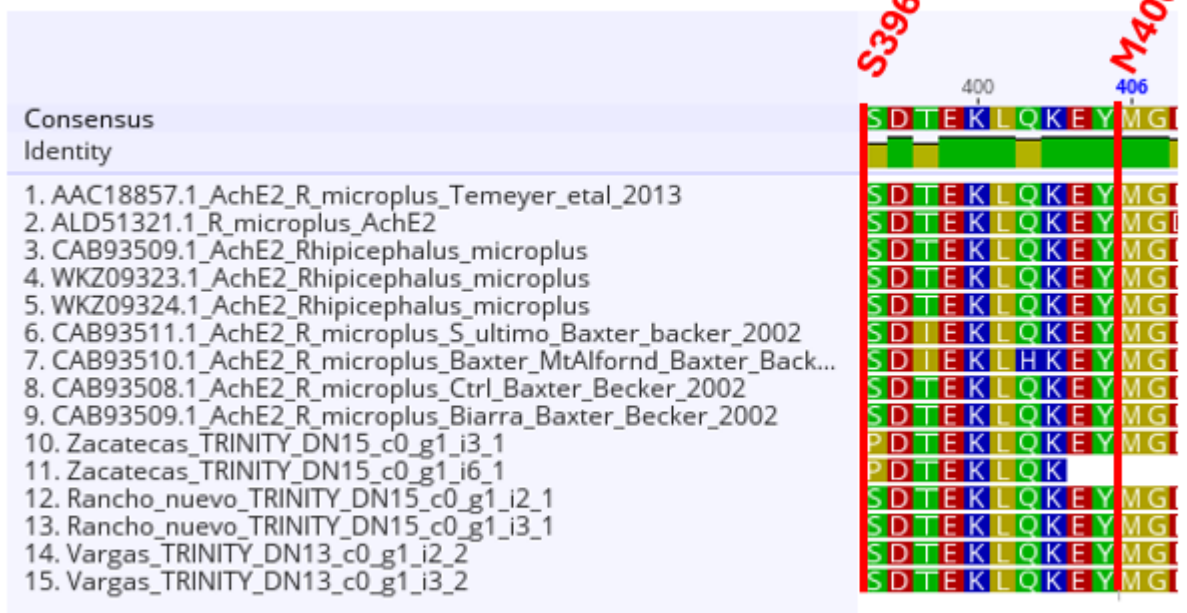
1. AAC18857.1_AchE2_R_microplus_Temeyer_et al_2013
2. ALD51321.1_R_microplus_AchE2
3. CAB93509.1_AchE2_Rhipicephalus_microplus
4. WKZ09323.1_AchE2_Rhipicephalus_microplus
5. WKZ09324.1_AchE2_Rhipicephalus_microplus
6. CAB93511.1_AchE2_R_microplus_S_ultimo_Baxter_backer_2002
7. CAB93510.1_AchE2_R_microplus_Baxter_MtAlfornd_Baxter_Backer_2002
8. CAB93508.1_AchE2_R_microplus_Ctrl_Baxter_Becker_2002
9. CAB93509.1_AchE2_R_microplus_Biarra_Baxter_Becker_2002
10. Zacatecas_TRINITY_DN15_c0_g1_i3_1
11. Zacatecas_TRINITY_DN15_c0_g1_i6_1
12. Rancho_nuevo_TRINITY_DN15_c0_g1_i2_1
13. Rancho_nuevo_TRINITY_DN15_c0_g1_i3_1
14. Vargas_TRINITY_DN13_c0_g1_i2_2
15. Vargas_TRINITY_DN13_c0_g1_i3_2



**P343S,
M349V**

		340	343	350																
Consensus		I	E	P	R	M	A	D	F	P	G	D	K	D	V	M	I	G	Q	T
Identity																				
1. AAC18857.1_AchE2_R_microplus_Temeyer_etal_2013		I	E	P	R	M	A	D	F	P	G	D	K	D	V	M	I	G	Q	T
2. ALD51321.1_R_microplus_AchE2		I	E	P	R	M	A	D	F	P	G	D	K	D	V	M	I	G	Q	T
3. CAB93509.1_AchE2_Rhipicephalus_microplus		I	E	P	C	M	A	D	F	P	G	D	K	D	V	M	I	G	Q	T
4. WKZ09323.1_AchE2_Rhipicephalus_microplus		I	E	P	R	M	A	D	F	P	G	D	K	D	V	M	I	G	Q	T
5. WKZ09324.1_AchE2_Rhipicephalus_microplus		I	E	P	R	M	A	D	F	P	G	D	K	D	V	M	I	G	Q	T
6. CAB93511.1_AchE2_R_microplus_S_ultimo_Baxter_backer_2002		I	E	P	R	M	A	D	F	P	G	D	K	D	V	M	I	G	Q	T
7. CAB93510.1_AchE2_R_microplus_Baxter_MtAlfornd_Baxter_Backer_2002		I	E	P	R	M	A	D	F	P	G	D	K	D	V	M	I	G	Q	T
8. CAB93508.1_AchE2_R_microplus_Ctrl_Baxter_Becker_2002		I	E	P	R	M	A	D	F	P	G	D	K	D	V	M	I	G	Q	T
9. CAB93509.1_AchE2_R_microplus_Biarra_Baxter_Becker_2002		I	E	P	C	M	A	D	F	P	G	D	K	D	V	M	I	G	Q	T
10. Zacatecas_TRINITY_DN15_c0_g1_i3_1		I	E	P	R	M	A	D	F	P	G	D	K	D	V	M	I	G	Q	T
11. Zacatecas_TRINITY_DN15_c0_g1_i6_1		I	E	P	R	M	A	D	F	P	G	D	K	D	V	M	I	G	Q	T
12. Rancho_nuevo_TRINITY_DN15_c0_g1_i2_1		I	E	P	R	M	A	D	F	P	G	D	K	D	V	M	I	G	Q	T
13. Rancho_nuevo_TRINITY_DN15_c0_g1_i3_1		I	E	P	R	M	A	D	F	P	G	D	K	D	V	M	I	G	Q	T
14. Vargas_TRINITY_DN13_c0_g1_i2_2		I	E	P	R	M	A	D	F	P	G	D	K	D	V	M	I	G	Q	T
15. Vargas_TRINITY_DN13_c0_g1_i3_2		I	E	P	R	M	A	D	F	P	G	D	K	D	V	M	I	G	Q	T

M406V



H476, G477 y D478	H476 G477 D478 460470476480 Consensus FYELNYVSACVKKQPWFGMTHGDELPL Identity 1. AAC18857.1_AchE2_R_microplus_Temeyer_etal_2013 FYELNYVSACVKKQPWFGMTHGDELPL 2. ALD51321.1_R_microplus_AchE2 FYELNYVSACVKKQPWFGMTHGDELPL 3. CAB93509.1_AchE2_Rhipicephalus_microplus FYELNYVSACVKKQPWFGMTHGDELPL 4. WKZ09323.1_AchE2_Rhipicephalus_microplus FYELNYVSACVKKQPWFGMTHGDELPL 5. WKZ09324.1_AchE2_Rhipicephalus_microplus FYELNYVSACVKKQPWFGMTHGDELPL 6. CAB93511.1_AchE2_R_microplus_S_ultimo_Baxter_backer_2002 FYELNYVSACVKKQPWFGMTHGDELPL 7. CAB93510.1_AchE2_R_microplus_Baxter_MtAlfornd_Baxter_Backter_2002 FYELNYVSACVKKQPWFGMTHGDELPL 8. CAB93508.1_AchE2_R_microplus_Ctrl_Baxter_Becker_2002 FYELNYVSACVKKQPWFGMTHGDELPL 9. CAB93509.1_AchE2_R_microplus_Biarra_Baxter_Becker_2002 FYELNYVSACVKKQPWFGMTHGDELPL 10. Zacatecas_TRINITY_DN15_c0_g1_i3_1 FYELNYVSACVKKQPWFGMTHGDELPL 11. Zacatecas_TRINITY_DN15_c0_g1_i6_1 FYELNYVSACVKKQPWFGMTHGDELPL 12. Rancho_nuevo_TRINITY_DN15_c0_g1_i2_1 FYELNYVSACVKKQPWFGMTHGDELPL 13. Rancho_nuevo_TRINITY_DN15_c0_g1_i3_1 FYELNYVSACVKKQPWFGMTHGDELPL 14. Vargas_TRINITY_DN13_c0_g1_i2_2 FYELNYVSACVKKQPWFGMTHGDELPL 15. Vargas_TRINITY_DN13_c0_g1_i3_2 FYELNYVSACVKKQPWFGMTHGDELPL
K555M K558Q	K555M K558Q 550555560563 Consensus TGSEVSTFNNEPRCKILKELKLY Identity 1. AAC18857.1_AchE2_R_microplus_Temeyer_etal_2013 TGSEVSTFNNEPRCKILKELKLY 2. ALD51321.1_R_microplus_AchE2 TGSEASTYNNEPRCKILKELKLY 3. CAB93509.1_AchE2_Rhipicephalus_microplus TGSEVSTFNNEPRCKILKELKLY 4. WKZ09323.1_AchE2_Rhipicephalus_microplus TGSEVSTFNNEPRCKILKELKLY 5. WKZ09324.1_AchE2_Rhipicephalus_microplus TGSEVSTFNNEPRCKILKELKLY 6. CAB93511.1_AchE2_R_microplus_S_ultimo_Baxter_backer_2002 TGSEVSTFNNEPRCKILKELKLY 7. CAB93510.1_AchE2_R_microplus_Baxter_MtAlfornd_Baxter_Backter_2002 TGSEVSTFNNEPRCKILKELKLY 8. CAB93508.1_AchE2_R_microplus_Ctrl_Baxter_Becker_2002 TGSEVSTFNNEPRCKILKELKLY 9. CAB93509.1_AchE2_R_microplus_Biarra_Baxter_Becker_2002 TGSEVSTFNNEPRCKILKELKLY 10. Zacatecas_TRINITY_DN15_c0_g1_i3_1 TGSEVSTFNNEPRCKILKELKLY 11. Zacatecas_TRINITY_DN15_c0_g1_i6_1 TGSEVSTFNNEPRCKILKELKLY 12. Rancho_nuevo_TRINITY_DN15_c0_g1_i2_1 TGSEVSTFNNEPRCKILQELKLY 13. Rancho_nuevo_TRINITY_DN15_c0_g1_i3_1 TGSEVSTFNNEPRCKILQELKLY 14. Vargas_TRINITY_DN13_c0_g1_i2_2 TGSEVSTFNNEPRCKILKELKLY 15. Vargas_TRINITY_DN13_c0_g1_i3_2 TGSEVSTFNNEPRCKILKELKLY

17.2.3 RECEPTOR B-ADRENÉRGICO DE OCTOPAMINA

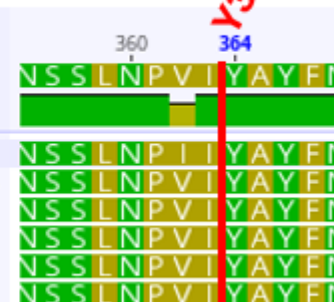
Tabla 37.-Fragmentos del alineamiento múltiple para cada una de las mutaciones reportadas y para aquellas encontradas en este estudio para los receptores de beta adrenergico de optopamina

Mutación	Alineamiento
I61F	Consensus Identity 1. AFC88978.1_Beta2_OCT_receptor_NRFS_R_microplus_Corley2013 2. Zacatecas_TRINITY_DN82_c0_g1_i1_3 3. Rancho_nuevo_TRINITY_DN54_c0_g1_i1_3 4. Rancho_nuevo_TRINITY_DN54_c0_g1_i2_3 5. Vargas_TRINITY_DN54_c0_g1_i1_3
Y215H	Consensus Identity 1. XP_022664697.1_beta-2R-like_octopamine_V_destructor 2. AFC88978.1_Beta2_OCT_receptor_NRFS_R_microplus_Corley2013 3. Rancho_nuevo_TRINITY_DN54_c0_g1_i1_3 4. Rancho_nuevo_TRINITY_DN54_c0_g1_i2_3 5. Vargas_TRINITY_DN54_c0_g1_i1_3 6. Zacatecas_TRINITY_DN82_c0_g1_i1_3

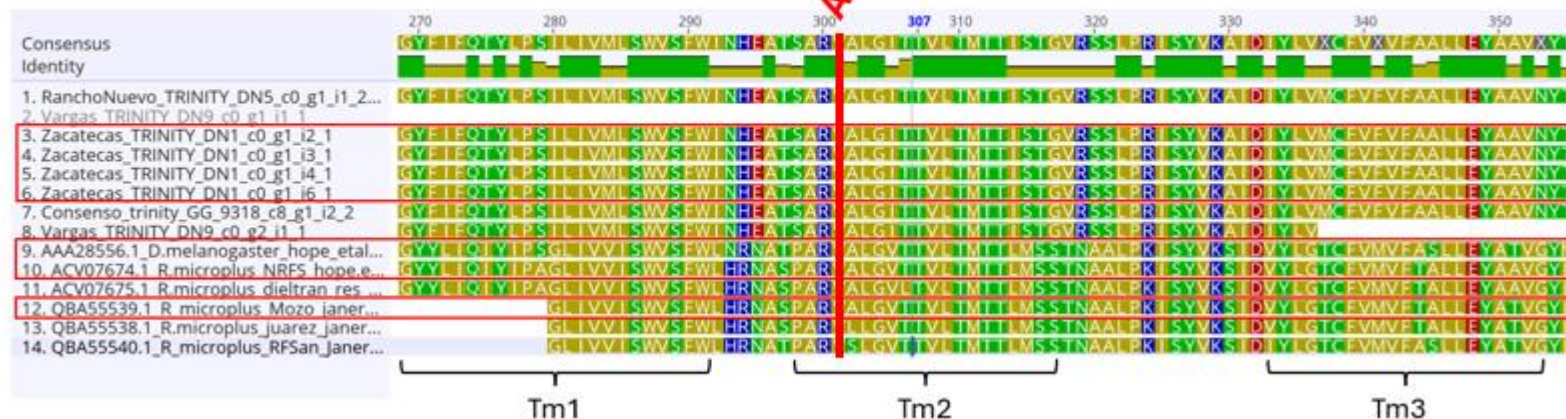
Y337F

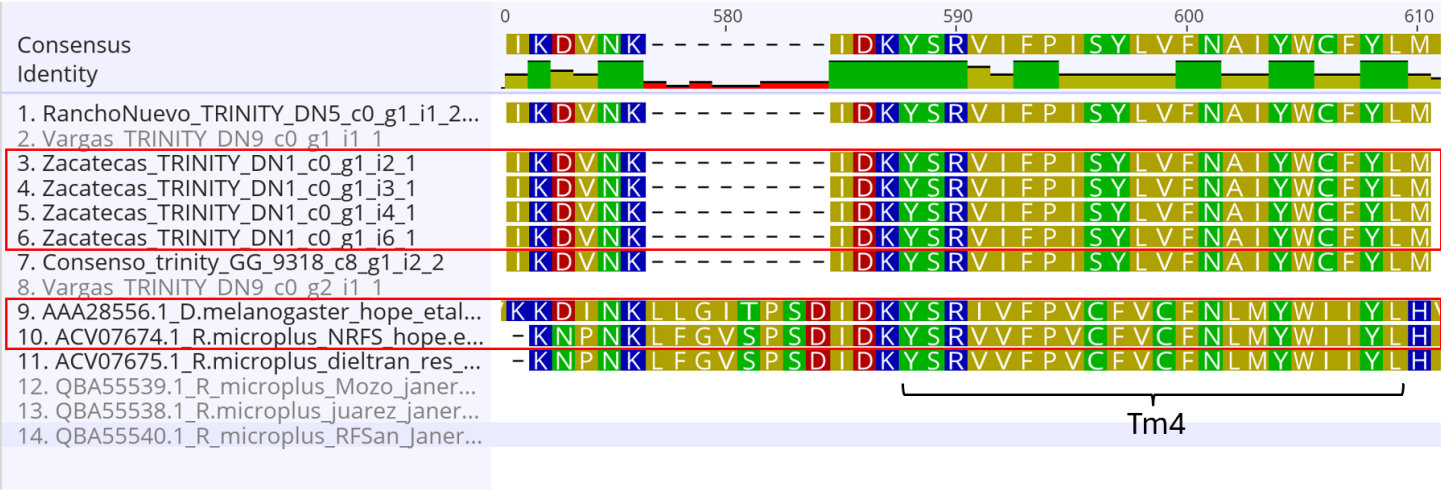
Consensus
Identity

1. XP_022664697.1_beta-2R-like_octopamine_V_destructor
2. AFC88978.1_Beta2_OCT_receptor_NRFS_R_microplus_Corley2013
3. Rancho_nuevo_TRINITY_DN54_c0_g1_i1_3
4. Rancho_nuevo_TRINITY_DN54_c0_g1_i2_3
5. Vargas_TRINITY_DN54_c0_g1_i1_3
6. Zacatecas_TRINITY_DN82_c0_g1_i1_3



17.2.4 CANALES DE CLORURO ACTIVADOS POR ÁCIDO GAMA-AMINO BUTÍRICO.







UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Instituto de
Investigación en
Ciencias
Básicas y
Aplicadas



INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

POSGRADO EN CIENCIAS

Cuernavaca, Mor., a 21 de Mayo de 2026

DRA. LINA ANDREA RIVILLAS ACEVEDO
COORDINADORA DEL POSGRADO EN CIENCIAS
PRESENTE

Atendiendo a la solicitud para emitir DICTAMEN sobre la revisión de la tesis titulada: "Caracterización transcriptómica de mecanismos de resistencia múltiple a acaricidas en *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*" que presenta el I.B.T. Eduardo Ferrara Tijera (10072554), para obtener el título de Maestro en Ciencias.

Dirección de tesis: Dr. Hugo Gildardo Castelán Sánchez Ramos

Codirector de tesis: Dra. Raquel Cossío Bayúgar

Unidad Académica: Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas (IICBA)

Nos permitimos informarle que nuestro voto es:

NOMBRE	DICTAMEN
Dra. María Eugenia Núñez Valdez UAEM – CIDC	APROBADO
Dr. Armando Hernández Mendoza UAEM – CIDC	APROBADO
Dr. Diego Cortez Quezada UNAM – CCG	APROBADO
Dra. Verónica Obregón Barboza UAEM – CEIB	APROBADO
Dra. Sonia Dávila Ramos UAEM - CIDC	APROBADO



Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos, México, 62209, Edificio 65
Tel. (777) 329 70 00, Ext. 6011 / posgradoenciencias@uaem.mx

UAEM
RECTORÍA
2023-2029



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANO INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

Sello electrónico

DIEGO CLAUDIO CORTEZ QUEZADA | Fecha:2026-03-23 11:14:54 | FIRMANTE

G1lfdtpJT6S5yKbNke+YBKx9EHVH4gKi471C2BHz2hkGR7f/A3xufFAPNrlckZKjNQoMVshxDPBhvvToiOWYRwBkt7LH/pa5eumfdjzJbS1xqN5ScHZAU4ZQPX5x+lh9aCeyB16FycOgOTLeeBgfa2Aq7k0ahtlB3vPjuUnbA0xnuU+DnEN2+O/HszW3Rkg0xflQe8kzzA1X9KoMIAyBHpqHEJM/1clqqGVgmnFWEPy8RMhxmubBTG2Lo/tCDrBH+h8Wa0prcBKGN+yVovu4csdSSsCVtF27NHDxVPYwvGHB5oPO9uCeBht1BSLHmRWoRblQf7sVlkiHS//jAz6Q==

SONIA DAVILA RAMOS | Fecha:2026-03-23 12:00:29 | FIRMANTE

jzEARk26JOP3WJpB9P1C7fGw4uCWwQkoPCjwZmv+fgkoVNbkT04bKBhJsBbJ630126OyycV/uaYslVx9g9sTSBRneVtJvM1pDp0ODZXiQ4GaRhanziU6H6W0ztbSNJq+yiJfzl7znSF79590DEF5mY5B+bK7DuWMU2x6imTSfAmhYmqVDdG9M91BHFxCj/8EqOfs+zGF1pAhqIkNIar1cFw3l0xyA3mHmmlxkJKu+wUzJjWRijci38HCgPnrf7idhoP4vTDS6/rL4zes0nJda9CPWewlcmQCtkb3JvxGHIW0vRhWc9uSMpyTON28PW+0Ddkf8iAr1EJYG2EQw==

ARMANDO HERNANDEZ MENDOZA | Fecha:2026-03-24 08:02:12 | FIRMANTE

KDQCLLzdm08FV9WYynFBBKCLafGhtBChUr2HgCgZZJkZJ9oFMD+LcJAUQfKyyFj3gCiOSpdTMX+FhEFIfvZVzxJkysLjXp11CSgGRsx4Pt8tqSSJcaiQX92hpmY/4onlXWHswD8JQfh3kVmxuQBNAx9zLXSfqbJJVytLCPuznAXbZAZHeX7JOYsm4bq7AXVWwyBDRaO/ALT1BWl4O3PT/OLmy/oJbT6yCo8+6OzXKcZbWaFxbADLcJ2WkuQNP3CLJpzyNYh2D47yitjx6AMg+G80huAbCpnQMjzgT1kC2AGuwp0ru7799RIMWva5bHpk4pCfu0B17n23pln6njg==

VERONICA OBREGON BARBOZA | Fecha:2026-03-24 14:17:29 | FIRMANTE

dH7XX4IbljcdG448x2kWmJK6OonjKj09GA8HMuj+/ORQfnNd2Lcbu/7wF9nvdHgYj0TUx7v1GzPhLXXNF5kJnAj4HO5F8aWQKpiq4ieeQr5OimGB9/oDHDmwlNyzaJsSNG5ThVWBjkoWwqNFPmoZTwt3vcWuD48tnmtj06O4bNmnu3h30JA9f7HpXLfTMisQN+inbw4ySarRGsl5noS7+Gknm4A//GGaUnFJsVPis04aZ4iADAUpi7PQB3925Tbbj2zsZdct81KmeXPuauXPRPrJkTzYhgW6vdfllqY9Ynt5S6o3jMbNc5QiiFOy5yqQslor7vK3s0T08GaHP91g==

MARIA EUGENIA NUÑEZ VALDEZ | Fecha:2026-05-06 15:55:18 | FIRMANTE

Ea5Ctk/fvE2lMA/bp2me6Yt1HB21LGhG+qYZXJPR1to6crUtaqDzTzngv55Bg4R845sxEvOFI52N81KY5roE+9KDQmAj07kN0nIHRlIIFuhpSY892LTDUJbJ1b+OfqlUyvjKB/Sf9kaOI8takfZREUou1mPvA6HU729KLT1bJGwZ0pgprwVkvj45fcamu3YfjF1+xUJNGBLEYwYH0u52H52u8RX4eJnE80HkudHdoKrYCGhQWQ11HalRra1O7peQWvzbqDLWiconaN2A8BPhDWEoJizrbNF565gL4laA8yBNmxqX4cWS0MJBtenoDyxI4Ou7x5KXCOUvC19VIZ/A==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



3P9MziFXn

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/Csp15jvZdVO2d33uwOaiise9ibofyeNe>



UAEM
RECTORÍA
2023-2029