

Bioquimia

Volumen **31**
Volume

Número **1**
Number




Enero-Marzo **2006**
January-March

Artículo:




Marcadores enzimáticos como
indicadores de resistencia a los
antihelmínticos en el nematodo parásito
gastroentérico de rumiantes
Haemonchus contortus

Derechos reservados, Copyright © 2006:
Asociación Mexicana de Bioquímica Clínica, AC

**Otras secciones de
este sitio:**

-  **Índice de este número**
-  **Más revistas**
-  **Búsqueda**

***Others sections in
this web site:***

-  ***Contents of this number***
-  ***More journals***
-  ***Search***

Marcadores enzimáticos como indicadores de resistencia a los antihelmínticos en el nematodo parásito gastroentérico de rumiantes *Haemonchus contortus*[§]

Estefan Miranda-Miranda,* Enrique Liéban-Hernández,* María Eugenia López-Arellano,* Pedro Mendoza-de-Gives,* Raquel Cossío-Bayúgar*

RESUMEN

La identificación de resistencia a los antihelmínticos del nematodo parásito *Haemonchus contortus*, se hace mediante un complicado bioensayo que requiere larvas de nematodos de referencia, así como de campo, cultivadas en laboratorio y expuestas a diferentes productos. Con el fin de evaluar una posible alternativa diagnóstica, se hicieron ensayos enzimáticos en geles de poli(acrilamida)-SDS usando extractos de larvas L₃ de *H. contortus* provenientes de tres cepas de referencia con diferentes niveles de resistencia y susceptibilidad a productos antihelmínticos, bencimidazoles e ivermectinas. Los ensayos que se diseñaron para detectar las enzimas esterasa (ES), fosfodiesterasa (FDE) y glutatión-S transferasa (GST), fueron procesados como zimogramas en imágenes digitalizadas, a partir de las cuales se obtuvieron sus respectivos densitogramas, valorando los diferentes pesos moleculares (PM) en miles de Daltones (kDa). Se identificaron dos ES con PM de 17 y 60 kDa compartidos entre nematodos sensibles y resistentes, así como una ES de 24 kDa presente sólo en cepas resistentes. Fue posible detectar FDE de 160, 130, y 70 kDa en todas las cepas y una isozima FDE de 41 kDa presente sólo en la cepa resistente a ivermectinas, misma cepa que también mostró una actividad enzimática FDE 94% mayor al nivel basal de la cepa sensible. El ensayo GST de las cepas resistentes mostró una isozima de PM de 49 kDa no detectable en la cepa susceptible, así como GST de 24 y 6 kDa presentes en todas las cepas. Los zimogramas utilizados, así como los datos obtenidos de éstos,

ABSTRACT

Anthelmintic resistance detection on the gastroenteric parasitic nematode Haemonchus contortus, is achieved by a complex bioassay which requires reference strains of nematodes as well as field isolated worms, cultured and exposed to different anthelmintic products. In order to assess an alternate diagnostics procedure, enzymatic assays were performed on SDS polyacrylamide gels, using larval nematodes extracts from three reference strains with variable levels of resistance and susceptibility to benzimidazole and ivermectine products. Zymograms were designed for detection of esterase (ES), phosphodiesterase (PDE), and glutathione-S transferase (GST). Zymograms were processed as digital images obtaining their respective densitograms and molecular weight (MW) in thousands of Daltons (kDa). Two ES were located with a MW of 17 and 60 kDa shared among all strains used, as well as a 24 kDa ES found only in both resistant strains. Several PDE were detected in all strains with a MW of 160, 130 and 70 kDa, as well as an isozyme of 41 kDa found only on the ivermectine resistant strain which also showed PDE enzymatic activity up to 94% above the sensitive strain basal activity. GST assay showed activity of 49 kDa band not detectable on the sensitive strain, as well as 24 and 6 kDa bands shared among all strains. We concluded that these zymograms assays as well as the data obtained from them may be used as anthelmintic resistance markers on field nematodes.

* Unidad de Helminología del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria.

Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias.

[§] Este trabajo fue parcialmente financiado por el fondo SAGARPA-CONACYT. No. de proyecto 2004-C01-6/B-1.

Correspondencia:

Dr. Estefan Miranda Mirando.

Km. 11.5 Carretera Federal Cuernavaca-Cuautla, Col. Progreso. Jiutepec, Morelos México. 62550. Apdo. Post. 602 CIVAC, Morelos. Fax. 7773 192848 Ext. 129. e-mail: miranda.estefhan@inifap.gob.mx

Recibido: 11-10-2005

Aceptado: 01-03-2006

mostraron características suficientes para usarse como indicadores de resistencia a los antihelmínticos en poblaciones de *H. contortus*.

Palabras clave: Zimograma, densitometría, antihelmínticos, resistencia, esterasa, fosfodiesterasa, glutatión-S-transferasa, *H. contortus*.

Key words: Zymogram, densitometry, anthelmintic, resistance, esterase, phosphodiesterase, glutathion-S-transferase, *H. contortus*.

INTRODUCCIÓN

La identificación de enzimas en geles de poliacrilamida implica su localización visual mediante su actividad específica sobre un substrato cromogénico posterior a su separación electroforética, esta metodología permite la separación de los componentes proteicos mediante carga y/o peso molecular, de manera tal que es posible identificar una población heterogénea de enzimas en una gran variedad de muestras biológicas. En 1957 se utilizaron por primera vez metodologías histoquímicas en geles de almidón, conteniendo muestras biológicas, con el fin de identificar zonas en el gel electroforético con actividad de esterasa; fueron ellos quienes acuñaron el término zimograma, vigente hasta la fecha, usado para describir el despliegue visual de una población de enzimas separadas electroforéticamente presentes en una muestra biológica;¹ y en 1959 se introdujo el concepto de isozima para designar diferentes formas moleculares de la misma enzima en muestras de un mismo individuo o en diferentes miembros de la misma especie.² Actualmente las técnicas zimográficas son valiosas para determinar las rasgos génicos en organismos de una misma especie que difieren en comportamiento y/o propiedades fenotípicas, y por lo mismo estas técnicas son usadas en una gran variedad de procedimientos diagnósticos.³ El fenómeno de la resistencia a los antihelmínticos en los nematodos parásitos, constituye un problema en el cual es necesario identificar y/o diagnosticar en nematodos dentro de una misma especie, sutiles variaciones genéticas que los hacen resistentes a los tratamientos antihelmínticos. El nematodo parásito gastroentérico de rumiantes *Haemonchus contortus* ha desarrollado resistencia hacia formulaciones comerciales basadas en bencimidazoles e ivermectinas, lo que ha dificultado el control de este parásito.^{4,5} Este problema de resistencia ha hecho necesario utilizar estratégicamente las diferentes fórmulas de antihelmínticos, y por lo mismo, se han diseñado complicados ensayos para identificar los niveles de resistencia a los diferentes químicos. Estos procedimientos, implican el recuento de huevos del parásito aislados de las explotaciones pecuarias cui-

dadosamente controladas y tratadas con diferentes productos,⁵ además de ensayos *in vitro* con cepas de referencia cultivadas en laboratorio.⁶ Esto hace que cada ensayo requiera de un tiempo considerable, así como altos costos de operación. Una alternativa al problema de diagnóstico de resistencia, son las técnicas zimográficas, que han demostrado ser muy útiles en la masificación del ensayo de detección de resistencia de los artrópodos hacia los pesticidas, y actualmente se aplican en la identificación de cepas de artrópodos resistentes a diferentes productos químicos.^{7,8} Algunas modificaciones a la detección de enzimas se ha aplicado en *H. contortus*, correlacionando espectrofotométricamente los niveles de colinesterasa y fosfatasa ácida,⁹ así como zimogramas de diferentes enzimas¹⁰ con los niveles de resistencia a bencimidazoles e ivermectinas. Otros trabajos correlacionan el metabolismo protector de diferentes compuestos antihelmínticos con la acción de glutatión-S transferasa y el intercambio de glutatión de los nematodos, protegiéndose contra los efectos tóxicos de los químicos.¹¹⁻¹⁴ Sin embargo, estos trabajos no aprovechan debidamente las ventajas de combinar los avances en electroforesis en geles de poliacrilamida con el procesamiento de imágenes digitales de los zimogramas en enzimas tales como esterasa, fosfodiesterasa y glutatión-S transferasa; todas ellas con potencial implicación en el fenómeno de resistencia y/o diferenciación zimográfica de cepas de nematodos resistentes de cepas sensibles a diferentes compuestos antihelmínticos. En este trabajo se pretendió implementar un procedimiento de diferenciación de cepas resistentes y sensibles a las formulaciones de bencimidazoles e ivermectinas en *H. contortus*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cepas de nematodos

Se usaron cepas de referencia de *H. contortus* pertenecientes al laboratorio de helmintología del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria del INIFAP (CENID-PAVET/INI-FAP), entre ellas una cepa resistente a bencimidazo-

les aislada en 1987 en Hueytamalco, Puebla y cuyas características de resistencia se reportaron previamente,⁴ así como una cepa resistente a ivermectinas aislada en Calpulalpan, Tlaxcala en 2003 y cuyas características de resistencia han sido ya reportadas.⁵ Las cepas resistentes se compararon contra una cepa susceptible a los antihelmínticos aislada en Jonacatepec, Morelos en 2003 y reportada en publicaciones previas.^{5,6}

Extractos

Se utilizaron larvas L₃ de cada cepa que fueron pesadas en lotes de 100 mg y maceradas en 1 mL de solución salina amortiguadora de fosfatos pH 7.2 (SSAF). El extracto fue centrifugado a 14,000 g durante 5 min. y al sobrenadante se le determinó el contenido proteico acorde al método descrito por Bradford.¹⁵ Los extractos así obtenidos fueron almacenados en alícuotas de 50 µL a -20 °C.

Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS

Se utilizó el método descrito por Laemmli¹⁶ en geles de 100 X 82 X 1.5 mm con 15 pozos de muestras con 75 µg de proteína de extracto por cada pozo. La separación electroforética se condujo a 15 mA durante 90 min.

Zimogramas

Los geles de poliacrilamida se sumergieron en una solución de agua-tritón X-100 al 2.5% con agitación durante 15 min y 2 lavados posteriores en solución salina amortiguadora de fosfatos-tritón X-100 al 0.2% para detectar esterasa¹⁷ y glutatión-S transferasa,¹⁸ y

en Tris HCl 50 mM pH. 9.5 para detectar fosfodiesterasas.¹⁹ Los geles así preparados se sumergieron en diferentes soluciones de sustrato, siguiendo las metodologías referidas en el *cuadro I*, hasta la aparición de bandas. Los zimogramas obtenidos fueron registrados digitalmente en un procesador de imágenes Epichem (UVP Life Sciences. www.uvp.com).

Densitometría

Se procesaron las imágenes digitales de cinco geles por cada ensayo en la modalidad de densitometría del paquete de programas de computadora LabWorks 4.0 (UVP Life Sciences. www.uvp.com) y se calibró el densitómetro para cuantificar la densidad óptica de cada banda enzimática obtenida. Las densitometrías se conjuntaron para complementar las zimografías junto con la movilidad electroforética relativa (Rf) y peso molecular (PM), para lo cual se utilizaron las proteínas marcadoras de PM preteñidas *Page Ruler* (Fermentas Life Sciences www.fermentas.com) con un rango de 11 a 170 kDa que fueron corridos simultáneamente con los extractos de nematodos para formar una curva de calibración de PM (*Figura 1*), a partir de la cual el programa de computadora fue calibrado para calcular de manera automática las medias de las Rf, las medias de los pesos moleculares, así como las medias de las DO de cada banda presente en las cinco repeticiones de cada ensayo junto con sus medidas de dispersión.

RESULTADOS

Los zimogramas obtenidos de los extractos de nematodos mostraron actividad específica para las enzi-

Cuadro I. Condiciones de ensayo y sustratos utilizados para la obtención de zimogramas.

Enzima	Sustrato	Sol. amortiguadora	Referencia
Esterasa	α-Naftil acetato Fast Gardnet	SSAF ⁷	17
Fosfodiesterasa	BCIP ¹ 2.5 mM; NBT ² 4mM.	Tris HCl 50 mM pH 9.6	19
Glutatión S Transferasa	Glutatión reducido 4.5 mM; glutatión reductasa 1.5 U/mL; EDTA ³ 5.4 mM; NADPH ⁴ 1mM CDNB ⁵ 1mM; NBT ² 1mM; PMS ⁶ 3 mM.	SSAF ⁷ Tris-HCl 50 mM pH. 9.6	18

1. Bromo cloro indolil fosfato; 2. Nitro azul de tetrazolio; 3. Ácido etilen-diamino tetracético; 4. Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato; 5. Cloro dinitro benceno; 6. Metosulfato de fenacina; 7. Solución salina amortiguadora de fosfatos: K₂H PO₄ 50 mM; NaCl 150 mM, pH 7.2.

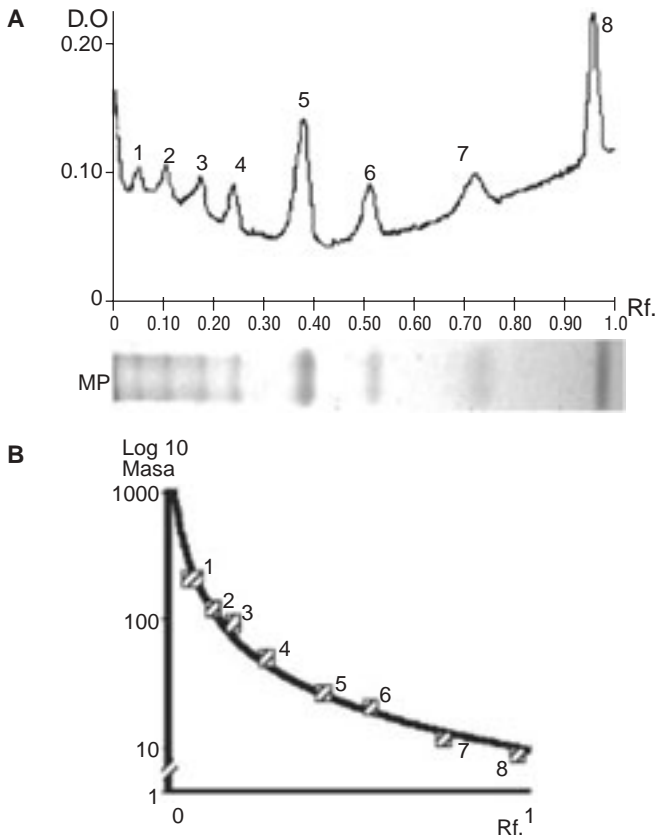


Figura 1. Calibración de programa para el cálculo de pesos moleculares. **A.** Imagen digitalizada y densitograma de los marcadores de peso molecular generados por el programa a partir de la imagen digital. **B.** Curva de calibración semilogarítmica generada por el programa.

D.O: Densidad óptica; Rf: Movilidad electroforética relativa; MP: Marcadores de peso molecular.

mas esterasa, fosfodiesterasa, y glutatión-S transferasa al usar los sustratos enzimáticos correspondientes descritos en el cuadro I.

Se observaron variaciones de cepas tanto en los niveles de DO, como en la Rf cuando se comparan las cepas en función de actividad de esterases (Figura 2), identificando una banda en Rf 0.61 con un PM de 24 kDa presente en ambas cepas resistentes, que mostró un incremento de la DO del 97% en la cepa resistente a ivermectinas cuando se compara con el nivel basal de la susceptible, además de dos bandas con actividad de esterasa que parecen ser compartidas entre todas las cepas pero con mayor DO en las cepas resistentes. Similarmente, se identificaron tres fosfodiesterasas que parecen ser compartidas entre todas las cepas de nematodos, incrementándose la DO de todas las bandas en ambas cepas resistentes con un aumento de

hasta el 94% al compararse los nematodos susceptibles con los resistentes a ivermectinas, en esta última cepa se identificó una fosfodiesterasa adicional con Rf de 0.44 y un PM de 41 kDa (Figura 3). La actividad de GST también mostró una banda adicional con Rf 0.48 y PM 49 kDa presente sólo en las cepas resistentes (Figura 4).

DISCUSIÓN

El análisis de zimogramas es un procedimiento muy confiable para identificar diferencias genéticas entre individuos de una misma especie.³ En este trabajo nos hemos concentrado en identificar enzimas que pudiesen constituir diferencias genéticas que actúen de manera directa y/o indirecta en la degradación de los antihelmínticos y/o en la reparación del daño ocasionado por los diferentes químicos a nivel celular y molecular.¹¹⁻¹⁴ Pocos reportes se han hecho dando cuenta sobre el posible papel de esterases y fosfatasa en la resistencia de *H. contortus* a productos antihelmínticos, atribuyendo parte del efecto neutralizador a la degradación hidrolítica que estas enzimas ejercen sobre la estructura química de los diferentes productos;^{10,20} así como un efecto de protección celular contra el nocivo de peróxidos y radicales libres producidos de manera indirecta por los productos antihelmínticos para el caso de glutatión-S transferasa.^{13,14} Los resultados obtenidos en este trabajo muestran diferencias en los zimogramas de las cepas analizadas cuando se utilizan aquellos sustratos correspondientes a las tres enzimas, probablemente debido a que participan activamente en la degradación y metabolismo de los antihelmínticos en los nematodos utilizados. Los zimogramas-densitogramas mostraron una esterasa que no se encuentra en la cepa susceptible y parece ser sólo encontrada en las cepas resistentes, este hallazgo es de considerable importancia ya que algunas isoenzimas de esterases participan activamente en la degradación de xenobiontes, así como de diferentes productos químicos y actualmente se utilizan para diagnosticar la resistencia a diferentes pesticidas en el áfido parásito de plantas *Myzus persicae* y el mosquito hematófago *Culex pipiens*.^{7,8} Estos mismos modelos de resistencia a pesticidas nos indican que no es necesario encontrar isoenzimas diferentes en organismos resistentes ya que, tanto *M. persicae* como *C. pipiens*, adquieren resistencia a partir de una actividad enzimática incrementada de isoenzimas compartidas con las variedades sensibles de artrópodos, esto se asemeja a los datos encontrados en este tra-

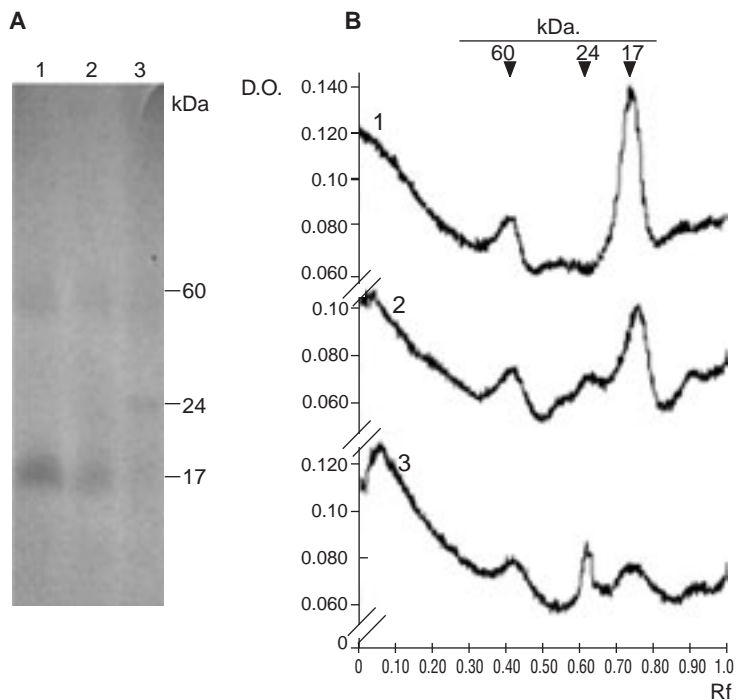


Figura 2. A. Zimograma y B. densitogramas obtenidos de las esterasas presentes en los extractos de *H. contortus*. 1. cepa susceptible; 2. cepa resistente a bencimidazol; 3. cepa resistente a ivermectina. Los pesos moleculares se representan en kiloDaltones (kDa). La reacción enzimática produce bandas de color rojo en un fondo claro.

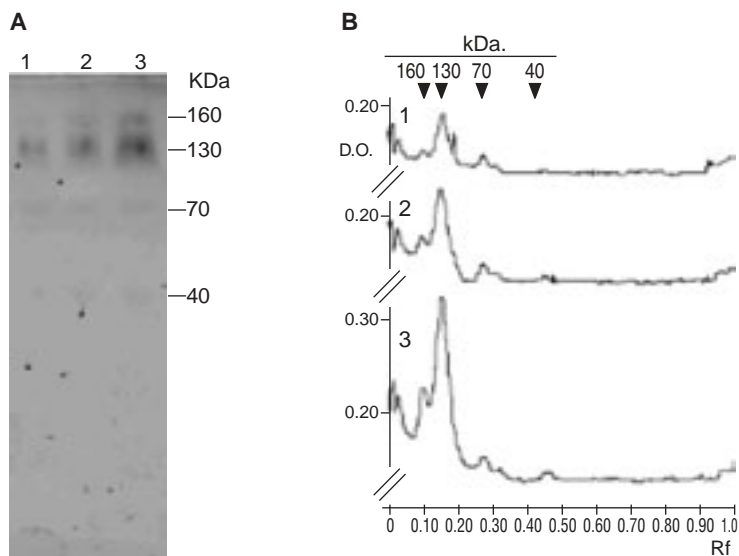


Figura 3. A. Zimograma y B. densitogramas obtenidos de las fosfodiesterasas presentes en los extractos de *H. contortus*. 1. cepa susceptible 2. cepa resistente a bencimidazol; 3. cepa resistente a ivermectina. Los pesos moleculares se representan en kiloDaltones (kDa). La reacción enzimática produce bandas de color violeta sobre un fondo claro.

bajo con respecto a las fosfodiesterasas, ya que si bien parece haber una isoenzima de 41 kDa exclusiva de la cepa resistente a ivermectinas, el resto de FDE mostró hasta el 94% de incremento, sugiriendo que la DO debida a la actividad de FDE y no la presencia de isoenzimas diferentes, podrían ser la clave para identificar la resistencia a ivermectinas, lo cual requerirá un análisis estadístico detallado para poder ser comprobado.

Los datos relacionados con GST muestran variaciones en la actividad de las diferentes cepas, así como una banda de 49 kDa que no está presente en la cepa susceptible; la enzima GST se encuentra involucrada en la prevención de daño ocasionado por la presencia de radicales libres a nivel de membrana celular, proceso documentado como parte de la toxicidad de los xenobiontes,^{11,12} por lo que los zimogramas de GST parecen ser una opción clara para profundizar

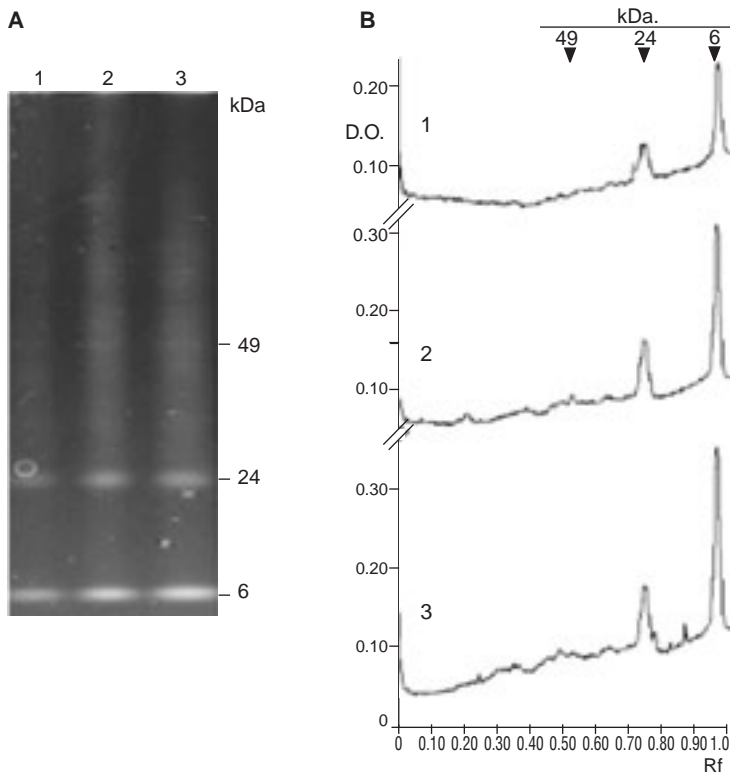


Figura 4. A. Zimograma y B. densitogramas obtenidos de las glutatión-S transferasas presentes en los extractos de *H. contortus*. 1. cepa susceptible; 2. cepa resistente a bencimidazol; 3. cepa resistente a ivermectina. Los pesos moleculares se representan en kiloDaltones (kDa). La reacción enzimática produce bandas claras sobre un fondo azul oscuro.

en la identificación de helmintos resistentes a diferentes productos químicos. Esta enzima ha sido previamente estudiada en *H. contortus* con la finalidad de correlacionar la conjugación del tripéptido glutatión con los niveles de resistencia del nematodo a diversas fórmulas antihelmínticas, ya que se conoce que la GST de diferentes invertebrados cumple esta misma función en una gran cantidad de productos químicos, inutilizando su funcionamiento tóxico. Existe la probabilidad de que la isoenzima GST de 49 kDa descrita en este trabajo y presente sólo en las cepas resistentes, cumpla alguna función que ayude al fenómeno de resistencia de las cepas analizadas, ya que al estar ausente en los nematodos sensibles, puede constituir un parámetro diagnóstico de resistencia en *H. contortus* que discrimine resistencia de susceptibilidad a ivermectinas y bencimidazoles.

Es claro que se debe de afinar la técnica y valorar una muestra grande de nematodos tanto de referencias como poblaciones de campo para poder estimar la utilidad de usar estas enzimas detectadas por los zimogramas-densitogramas utilizados. Actualmente nuestro grupo de trabajo valora un ensayo estadístico que permitirá identificar el tipo de herencia de los genes responsables de la actividad enzimática de

esterasas, fosfodiesterasas y glutatión-S-transferasa en *H. contortus* (datos no mostrados), que esperamos sea útil en establecer la correlación entre los niveles de actividad enzimática, la resistencia y los diferentes alelos de resistencia de la población de nematodos, de la misma forma que actualmente se utilizan estos datos en control de poblaciones de garrapatas de ganado resistentes a los acaricidas.^{21,22} El procedimiento aquí descrito constituye una herramienta útil en el diagnóstico de la resistencia a los antihelmínticos en *H. contortus*, que combina los valores obtenidos conjuntamente de zimogramas y sus respectivos densitogramas, analizando simultáneamente múltiples enzimas, esto tiene una gran ventaja sobre el sistema tradicional de diagnóstico de resistencia y deberá ser estudiada a profundidad sobre poblaciones de nematodos proveniente de campo, esta metodología puede proporcionar resultados en días en lugar de semanas, sólo requiere pequeñas cantidades de muestras provenientes de cepas de referencia y poblaciones de campo, que pueden ser congeladas por tiempo indefinido para ser procesadas en el momento más oportuno, razones por las cuales abatiría los elevados costos del diagnóstico que actualmente se hace.

REFERENCIAS

1. Hunter RL, Markert CL. Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. *Science* 1957; 125: 1294.
2. Market CL, Moller F. Multiple form of enzymes: tissue ontogenetic, and species specific patterns. *Proc Natl Acad Sci USA* 1959; 45: 753.
3. Manchenko GP. *Handbook of detection of enzymes on electrophoretic gels*. Boca Raton Florida: CRC Press; 1994: 1-2.
4. Campos RR, Herrera DR, Quiroz RH, Olazarán JS. Resistencia de *Haemonchus contortus* a bencimidazoles en ovinos de México. *Tec Pec Mex* 1990; 28: 30-34.
5. García FA, Vázquez PV, López AME, Liébano HE, Mendoza DGP. In vitro and in vivo diagnosis of anthelmintic resistance in *Haemonchus contortus* infected sheep in México. En: Proceedings V International Seminar in Animal Parasitology. Mérida Yucatán México. 2003: 194-199.
6. Montalvo XA, Vázquez PV, López AME, Liébano HE. Presence of anthelmintic resistance against gastro-intestinal nematodes in sheep farms in Tlaxcala, Mexico. En: Proceedings V International Seminar in Animal Parasitology. Mérida Yucatán México. 2003: 298-306.
7. Field LM, Foster SP. Amplified esterase genes and their relationship with other insecticide resistance mechanisms in English field populations of the aphid, *Myzus persicae* (Sulzer). *Pest Manag Sci* 2002; 58: 889-894.
8. Karunaratne SH, Hemingway J. Malathion resistance and prevalence of the malathion carboxylesterase mechanism in populations of mosquito vectors of disease in Sri Lanka. *Bull World Health Organ* 2001; 79: 1060-1064.
9. Gimenez-Pardo C, Martínez-Grueiro MM, Gomez-Barrio A, Rodriguez-Caabeiro F. Cholinesterase and phosphatase activities in adults and infective-stage larvae of levamisole-resistant and levamisole-susceptible isolates of *Haemonchus contortus*. *Vet Res Commun* 2003; 27: 611-623.
10. Echevarria FA, Gennari SM, Tait A. Isoenzyme analysis of *Haemonchus contortus* resistant or susceptible to ivermectin. *Vet Parasitol* 1992; 44: 87-95.
11. Ecobichon DJ. *Toxic effect of pesticides*. En: Klaassen CD [Editor]. Casarett & Doull's Toxicology. 5a ed. New York: McGraw-Hill; 1996: 643-689.
12. Van Rossum AJ, Jefferies JR, Rijsewijk FA, LaCourse EJ, Teesdale-Spittle P, Barrett J, et al. Binding of hematin by a new class of glutathione transferase from the blood-feeding parasitic nematode *Haemonchus contortus*. *Infect Immun* 2004; 72: 2780-2790.
13. Kawalek JC, Rew RS, Heavner J. Glutathione S-transferase, a possible drug-metabolizing enzyme, in *Haemonchus contortus*-comparative activity of a cambendazole-resistant and a susceptible strain. *Int J Parasitol* 1984; 14:173-175.
14. Kerboeuf D, Aycardi J. Unexpected increased thiabendazole tolerance in *Haemonchus contortus* resistant to anthelmintic by modulation of glutathione activity. *Parasitol Res* 1999; 85: 713-718.
15. Bradford M. A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248.
16. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685.
17. Miranda E, Cossío-Bayúgar R, Téllez-Alanís MR, García-Vázquez Z, Rosario-Cruz R, Ortiz-Estrada M. An enzymatic marker for ixodicide resistance detection in the cattle tick *Boophilus microplus*. *Adv Agric Res* 1995; 4: 001-008.
18. Ricci G, Bello ML, Caccuri AM, Galiazzo F, Federici G. Detection of glutathione transferase activity on polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 1984; 143: 226.
19. Hodes ME, Retz JE. A positive zymogram for distinguishing among RNase and phosphodiesterases I and II. *Anal Biochem* 1981; 110: 150.
20. Gimenez-Pardo C, Martínez-Grueiro MM, Gómez-Barrio A, Rodríguez-Caabeiro F. Ivermectin resistant and susceptible third-stage larvae of *Haemonchus contortus*: cholinesterase and phosphatase activities. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004; 99: 223-226.
21. Miranda-Miranda E, Osorio-Miranda G, Cossío-Bayúgar R. Acaricide resistance detection in the cattle tick *Boophilus microplus* by zymogram analysis. *Rev Electrón Vet Nov* 2005. Disponible en: www.veterinaria.org/revistas/redvet.
22. Cossío-Bayúgar R, Miranda-Miranda E, Holman P. Molecular cloning of a phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase gene from the tick, *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Insect Biochem Mol Biol* 2005; 35: 1378-1387.

