



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

**DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA  
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

***Boophilus microplus*: HERENCIA DE LA  
RESISTENCIA A LOS PIRETROIDES Y LA  
MUTACIÓN *Kdr* EN EL GEN DEL CANAL DE  
SODIO**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A:**

**GABRIELA AGUILAR TIPACAMÚ**

**TUTOR: RODRIGO ROSARIO CRUZ**

**COMITÉ TUTORAL: ZEFERINO S. GARCÍA VÁZQUEZ  
CARLOS G. VÁSQUEZ PELÁEZ**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **AGRADECIMIENTOS**

**Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)**, por la beca autorizada para poder realizar mis estudios de Doctorado y por el sustento otorgado al través del programa “**Apoyo Integral para la Formación de Doctores**”.

**A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)**, por la formación académica y por permitirme ser parte de esta institución.

**A la Universidad Autónoma de Chiapas (UNACH) y PROMEP** por el apoyo académico, económico y la confianza brindada para el logro de una meta más en mi vida profesional.

**Al Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria (CENID-PAVET) del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias** en Jiutepec, Morelos por el apoyo para mi formación profesional y de investigación.

**A mis padres Gilberto y Graciela y mis hermanos Claudia y Emmanuel** y sus respectivas familias, por todo el apoyo moral y amor demostrado durante estos años de ausencia. Por enseñarme, que para lograr un sueño y una meta más en la vida, es necesario hacer algunos sacrificios. Los quiero mucho.

**A Diosito** por darme salud y fortaleza para poder realizar uno de mis sueños.

**A todos los investigadores del CENID-PAVET** en especial a los integrantes del laboratorio de Artropodología: Rodrigo Rosario Cruz, Rubén Hernández Ortiz, Zeferino S. García Vázquez y Edgar Castro Saínes por el apoyo brindado.

**A mi tutor Dr. Rodrigo Rosario Cruz** y a los integrantes de mi **comité tutorial Dr. Carlos Vásquez Peláez y Dr. Zeferino García Vázquez** que dedicaron su valioso tiempo, enseñanzas, apoyo y confianza para poder concluir una meta más en mi vida; así como también, gracias por la amistad brindada y por motivarme encontrar el lado positivo de cada situación en mis ratos de desesperación como estudiante de Doctorado.

**Al Doctor Robert Miller y Mary Tijerina** por su valiosa colaboración para la realización de este proyecto.

**A los Doctores Julio Figueroa Millán y Rogelio Alonso Morales** por su valioso tiempo para revisar y apoyar la redacción de este escrito.

**A los Doctores Roger Iván Rodríguez Vivas y Graciela G. Tapia Pérez** por sus sabios consejos y por brindarme una linda amistad desinteresada.

**A mis amigos y compañeros docentes de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNACH** por todo su apoyo brindado durante mi ausencia en esa institución para poder cumplir mi objetivo.

**A todos mis amigos** que siempre me dieron el apoyo para seguir adelante en este reto. Muchas gracias a todos.

## RESUMEN

En *Boophilus microplus* una mutación (F1538I) en el gen que codifica para un canal de sodio ha sido asociado con la resistencia a los piretroides. El objetivo del presente trabajo fue conocer el efecto de la acción génica de la mutación en cruzas y retrocruzas de una cepa *B. microplus* resistente con una susceptible mediante el bioensayo de paquete de larvas y la reacción de PCR, para evaluar la resistencia a los piretroides. La frecuencia del alelo mutante en las cepas parentales fue 100% para la cepa resistente (RR) y 2.27% para la cepa susceptible (SS). Las cruzas recíprocas presentaron una predominancia al genotipo heterocigoto (55-73%), lo cual explica la significativa disminución de la resistencia a los acaricidas cipermetrina, deltametrina y flumetrina, mientras que las retrocruzas presentaron porcentajes que oscilaron entre el 51 al 84%. El comportamiento de la dominancia efectiva para la sobrevivencia de la cruzada RS fue completamente recesiva (DML=0) para deltametrina y flumetrina, indicando que el comportamiento del alelo susceptible es completamente dominante, sin embargo, esta misma cepa muestra una dominancia incompleta para la cipermetrina (DML=0.169). La cepa SR se comportó como parcialmente recesiva a la sobrevivencia para cipermetrina (DML=0.380), deltametrina, (DML=0.319) y flumetrina (DML=0.258) lo que indica una herencia parcialmente recesiva del alelo mutado, que pudiera explicarse por un posible efecto de la cepa materna. La retrocruza R4 (SRXRR) mostró una sobrevivencia parcialmente dominante hacia la cipermetrina (DML=0.605), deltametrina (DML=0.639) y flumetrina (DML=0.498).

Correlaciones altamente significativas fueron observadas entre la frecuencia del alelo R y el porcentaje de sobrevivencia para los tres piretroides. Estos datos evidencian que la resistencia a los piretroides, es monogénica y se debe a la presencia de una mutación en el canal de sodio, aunque la presencia de otras mutaciones, mecanismos metabólicos o combinaciones entre estos, pueden también ocurrir.

**Palabras Claves:** *Boophilus microplus*, canal de sodio, resistencia a piretroides, dominancia efectiva, cruzas, retrocruzas.

## ABSTRACT

A substitution (Phe1538Ile) within the coding sequence of the sodium channel gene has been associated with pyrethroid resistance in *Boophilus microplus*. The aim of the present study was to analyze the inheritance of pyrethroid resistance and the mutant allele, on reciprocal crosses of a susceptible and a resistant strain. The Larval Packet Test and PCR were determined to evaluate cypermethrin, deltamethrin and flumethrin resistance. The frequency of the mutant allele for the parental strains was 100% and 2.27% for resistant (RR) and susceptible (SS), respectively. The reciprocal crosses showed a predominance of the heterozygote genotype (55-77%) in agreement with the significant decrease of the acaricide resistance to cypermethrin, deltamethrin and flumethrin, while the back crosses presented a mutated allele frequency within a range of 51-84%. The RS progeny showed a complete recessive survival (DML=0) for deltamethrin and flumethrin, suggesting a complete dominance of the susceptible allele, and incomplete dominance for cypermethrin (DML=0.169). On the other hand, SR progeny showed a partially recessive survival for cypermethrin (DML=0.380), deltamethrin (DML=0.319) and flumethrin (DML=0.258), indicative of a partially recessive inheritance of the resistance, because of a possible maternal strain effect. The backcross R4 (SRXRR) showed a survival partially dominance to cypermethrin ( $D_{ML}=0.605$ ), deltamethrin ( $D_{ML}=0.639$ ) and flumethrin ( $D_{ML}=0.498$ ).

Highly significant correlations ( $p<0.01$ ) were found between R allele frequency and survival rate for all three pyrethroids used in this study. Therefore, pyrethroid resistance seems to be due to the presence of the point mutation within the sodium channel gene sequence as a monogenic inheritance mode ( $p<0.01$ ), however, it is possible that the presence of other mutations, metabolic mechanisms or combinations of them can also occur.

**Key Words:** *Boophilus microplus*, sodium channel, pyrethroids resistance, effective dominance, crosses, backcrosses.

<b>CONTENIDO</b>	<b>PÁGINA</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1 Hipótesis.....	3
1.2 Objetivo general .....	3
1.3 Objetivos específicos .....	3
<b>II. REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	4
2.1 Importancia global de las garrapatas .....	4
2.2 Ciclo biológico de <i>Boophilus microplus</i> .....	4
2.3 Estructura del canal de sodio .....	6
2.4 Fisiología del canal de sodio .....	7
2.5 Mecanismo de acción de los piretroides en el canal de sodio.....	9
2.6 Desarrollo de la resistencia a los insecticidas .....	11
2.7 Genética de la resistencia a los insecticidas .....	13
2.8 Modo de herencia de la resistencia a pesticidas en diferentes especies de insectos .....	17
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	19
3.1 Cepas de garrapatas .....	19
3.2 Mantenimiento de las cepas.....	19
3.3 Cruzas recíprocas y retrocruzadas entre la cepa susceptible y resistente .....	20
3.4 Prueba de Paquete de Larvas.....	22
3.5 Extracción de DNA genómico.....	23
3.6 Análisis de la mutación en el gen que codifica para el canal de sodio.....	23
3.7 Análisis estadístico.....	24
<b>IV. RESULTADOS</b> .....	28
4.1 Análisis toxicológicos de las cepas parentales y sus cruzas recíprocas.....	28
4.2 Dominancia efectiva de las cepas parentales y sus cruzas recíprocas.....	29
4.3 Frecuencia de alelos R en las cepas parentales y sus cruzas	

recíprocas.....	29
4.4 Análisis toxicológicos de las cepas parentales y sus retrocruzas.....	37
4.5 Dominancia efectiva y frecuencia de alelos de las cepas parentales y sus retrocruzas .....	38
4.6 Análisis estadístico.....	38
<b>V. DISCUSIÓN</b> .....	45
<b>VI. CONCLUSIONES</b> .....	55
<b>VII. REFERENCIAS</b> .....	57



## ÍNDICE DE CUADROS

## PÁGINA

<b>Cuadro 1.</b> Metodología para obtener las cruzas recíprocas de <i>Boophilus microplus</i> .....	27
<b>Cuadro 2.</b> Metodología para obtener las retrocruzas de <i>Boophilus microplus</i> .....	27
<b>Cuadro 3.</b> Análisis probit de las cepas parentales susceptible (SS) y resistente (RR) de <i>Boophilus microplus</i> y sus cruzas recíprocas (RS y SR) a cipermetrina, deltametrina y flumetrina.....	32
<b>Cuadro 4.</b> Porcentaje de mortalidad, dominancia efectiva y frecuencia del alelo R de las cepas parentales susceptible (SS) y resistente (RR) de <i>Boophilus microplus</i> y sus cruzas recíprocas RS y SR usando la concentración discriminante ( $CD=2XCL_{99.9}$ ) para cipermetrina, deltametrina y flumetrina en la prueba de paquete de larvas.....	33
<b>Cuadro 5.</b> Frecuencia de genotipos obtenidos por la prueba de PCR alelo específica (AS-PCR) en las cepas parentales de <i>Boophilus microplus</i> y sus cruzas recíprocas.....	36
<b>Cuadro 6.</b> Frecuencia de genotipos obtenidos por la prueba de PCR alelo específica (AS-PCR) en las cepas parentales de <i>Boophilus microplus</i> y sus retrocruzas. ....	36
<b>Cuadro 7.</b> Análisis probit de las cepas parentales susceptible (SS) y resistente (RR) de <i>Boophilus microplus</i> y sus retrocruzas a cipermetrina, deltametrina y flumetrina.....	40

**Cuadro 8.** Porcentaje de mortalidad, dominancia efectiva y frecuencia del alelo R de las cepas parentales susceptible (SS) y resistente (RR) de *Boophilus microplus* y sus retrocruzas usando la concentración discriminante ( $2XCL_{99.9}$ ) para cipermetrina, deltametrina y flumetrina en la prueba de paquete de larvas..... 41

**Cuadro 9.** Pruebas para comprobar la hipótesis de un solo gen controlando la resistencia a la cipermetrina, deltametrina y flumetrina utilizando la CD ( $2XCL_{99.9}$ ) y  $J^2$ ..... 44

**Figura 1.** Cipermetrina (a), deltametrina (b) y flumetrina (c) respuesta de la concentración-mortalidad de las cepas parentales susceptible (SS) y resistente (RR) y las dos F<sub>1</sub> (RS y SR) generadas de las cruzas recíprocas de las cepas parentales..... 31

**Figura 2.** Porcentaje de sobrevivencia de las cepas parentales susceptible (SS) y resistente (RR) de *Boophilus microplus*, sus cruzas recíprocas y retrocruzas utilizando la CD de cipermetrina (a), deltametrina (b) y flumetrina (c)..... 34

**Figura 3.** Prueba de PCR alelo específica (AS-PCR) para detectar la mutación en el gen que codifica para el canal de sodio..... 35

**Figura 4.** Correlaciones entre el porcentaje de alelos R y la sobrevivencia a la CD de cipermetrina (a), deltametrina (b) y flumetrina (c) en las cepas parentales de *Boophilus microplus* y sus retrocruzas..... 42

**Figura 5.** Correlaciones entre el porcentaje de genotipo RR y la sobrevivencia a la CD de cipermetrina (a), deltametrina (b) y flumetrina (c) en las cepas parentales de *Boophilus microplus* y sus retrocruzas..... 43

## I. INTRODUCCIÓN

La garrapata *Boophilus microplus* (*B. microplus*) es considerado uno de los ectoparásitos tropicales más importante en la ganadería bovina, por las pérdidas económicas que ocasiona y por transmitir enfermedades (Brossard y Wikel 2004). Recientemente, el método más usado para controlar a estos ectoparásitos es la aplicación de ixodicidas (Fragoso *et al.*, 1999). Uno de los ixodicidas más utilizado para controlar vectores de importancia veterinaria, agrícola y de salud pública son los piretroides sintéticos ya que poseen algunas ventajas como son: rápido metabolismo y baja toxicidad para los mamíferos; estabilidad en campo, elevada persistencia, rápido efecto de derribe y muerte en una amplia variedad de insectos y son efectivos contra cepas resistentes a organofosforados, ciclodienos y carbamatos (Elliot, 1976; Lee *et al.*, 1999; Hemingway *et al.*, 2004).

Los canales de sodio dependientes de voltaje son el sitio de acción de los piretroides y la resistencia hacia estos productos se encuentra asociada con mutaciones que ocasionan insensibilidad a estos compuestos. La resistencia Knockdown (*Kdr*) a DDT y piretrinas fue identificado por primera vez en la mosca doméstica (Soderlund y Knipple 2003; Shafer *et al.*, 2005; Brogdon y McAllister 1998; Dong, 2007; Soderlund 2008) y ha sido ampliamente estudiado a nivel molecular en numerosos insectos resistentes a los piretroides (Soderlund 2008; Soderlund y Knipple 2003). Mutaciones en el canal de sodio han sido reportadas en *Blatella germanica* (*B. germanica*), *Myzus persicae* (*M. persicae*), *Plutella xylostella* (*P. xylostella*), *Anopheles gambiae* (*A. gambiae*), *Haematobia irritans* (*H. irritans*) (Soderlund y Knipple 2003; Guerrero *et al.*, 1997; Zhiqi *et al.*, 2000).

En *B. microplus* dos mecanismos de resistencia a los piretroides han sido descritos: el incremento de la actividad metabólica mediada por enzimas que comprenden principalmente a las esterasas y la insensibilidad del sitio de acción (canal de sodio) (Nolan 1985; Miller *et al.*, 1999; Jamroz *et al.*, 2000; Hernández *et al.*, 2002). Sin embargo, el mecanismo más común en poblaciones de garrapatas resistentes a los piretroides a nivel de campo, son las mutaciones presentes en la secuencia del gen que codifica para el canal de sodio (Rosario- Cruz *et al.*, 2005).

A la fecha, se han reportado numerosos estudios con la finalidad de predecir el modo de herencia de la resistencia a los piretroides en varios insectos como mosquitos (Halliday y Georghiou 1985), la mosca del cuerno *H. irritans* (L), (Roush *et al.*, 1986), *P. xylostella* (Tabashnik *et al.*, 1992) y *Cydia pomonella* (*C. pomonella*) (Bouvier *et al.*, 2001). Sin embargo, las conclusiones obtenidas de estos estudios han sido realizadas con base en las mediciones de la respuesta fenotípica a las pruebas toxicológicas, sin tomar en consideración los genotipos presentes en las cepas estudiadas; por lo que, no pueden realizarse conclusiones generales que puedan ser derivadas de los datos obtenidos de diferentes especies.

Actualmente, no existe evidencia en *B. microplus* acerca de la forma en que es heredado a la progenie el alelo resistente del gen que codifica para el canal de sodio, por lo que, en el presente estudio se dió seguimiento a la mutación en el gen que le confiere resistencia a los piretroides y el modo de herencia del mismo en la progenie.

## **1.1 Hipótesis**

La presencia de una mutación (F1538I) en el gen que codifica para el canal de sodio de la garrapata *B. microplus* es la responsable de la resistencia a los piretroides, por lo tanto la manifestación fenotípica de la resistencia en la progenie dependerá de la frecuencia de alelos mutados en los individuos de la población.

## **1.2 Objetivo general**

Determinar la acción génica de la mutación (F1538I) en el canal de sodio de *B. microplus* en las cruzas dialélicas entre una cepa susceptible y una resistente a la familia de los piretroides y las retrocruzas de la F1 (RS y SR) con ambas cepas parentales (susceptible y resistente).

## **1.3 Objetivos específicos**

Evaluar el perfil toxicológico a los piretroides (cipermetrina, deltametrina y flumetrina) utilizando la prueba de paquete de larvas en las cepas parentales susceptible y resistente de *B. microplus*, sus cruzas y retrocruzas.

Determinar la frecuencia del alelo mutado por la prueba de PCR alelo específico de las cepas parentales, cruzas y retrocruzas de *B. microplus*.

Determinar la asociación entre el alelo mutado y la resistencia evaluada toxicológicamente en las cepas parentales, cruzas y retrocruzas de *B. microplus*.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Importancia global de las garrapatas

La garrapata *B. microplus* en México se encuentra distribuida en regiones tropicales y subtropicales abarcando zonas ganaderas importantes que ocupan el 53% del territorio nacional (Solís, 1991).

La importancia económica de las garrapatas es elevada para la ganadería bovina ya que pueden transmitir microorganismos patógenos como son protozoarios, virus, rickettsias y espiroquetas (Solorio y Rodríguez 1997; Jongejan y Uilenberg 2004). Además son un importante vector en salud pública, por las enfermedades que transmiten al humano como son la borreliosis, encefalitis y fiebres hemorrágicas (Jongejan y Uilenberg 2004; Rodríguez-Vivas *et al.*, 2007).

En lo que respecta a la garrapata *B. microplus*, ocasiona pérdidas en la ganancia de peso al ganado, ya que consumen de 1 a 3 ml de sangre durante todo su ciclo de vida en el mismo hospedero. Las picaduras provocan irritación, estrés y daño en la piel del bovino. Las lesiones ocasionadas en la piel originan puertas de entradas para agentes infecciosos como los antes mencionados (Castellanos, 1993; Cardozo y Franchi 1996).

Las garrapatas ejercen un efecto desfavorable directo sobre la ganancia de peso de los animales, se ha demostrado que en ganado de engorda cada hembra ingurgitada puede llegar a reducir la ganancia diaria de peso en 0.6 g y las pérdidas económicas atribuidas a este factor, han sido estimadas en 7.3 dólares/cabeza/año (FAO, 1984).

### 2.2 Ciclo biológico de *Boophilus microplus*

El ciclo biológico de *Boophilus spp* se caracteriza por utilizar un solo hospedero, y su huésped preferente son los bovinos, sin embargo, en ocasiones de manera esporádica puede infestar a los equinos, ovinos y caprinos; para completar su ciclo de vida. Consta de cuatro estadios biológicos, huevo, larva o

pinolillo, ninfa y adulto (Encinas *et al.*, 1999). Su ciclo de vida está compuesto de dos fases: no parasitaria y parasitaria (Encinas *et al.*, 1999).

La fase no parasitaria comprende a partir de que la hembra ingurgitada se desprende del hospedero en busca de lugares adecuados para la ovoposición, hasta la presencia de larvas en los pastizales. Se caracteriza por presentar varias etapas: preoviposición, oviposición, incubación y sobrevivencia larval. La duración de cada una de estas etapas, se encuentra condicionada por los factores climáticos, principalmente la humedad y temperatura (Núñez, 1982; Castellanos, 1993).

La fase parasitaria inicia cuando las larvas logran vencer tanto las barreras climáticas y las del hospedero, fijándose al bovino en donde completarán y realizarán los procesos fisiológicos (alimentación, muda y cópula) en las etapas de larva, ninfa y adulto (Solís, 1986; Camino, 1991). La duración de esta fase, es relativamente constante, se ha estimado que aproximadamente la duración es de 18 a 22 días y la alimentación, muda y cambio de estadio se lleva a cabo todo el tiempo en el bovino. El índice de mortalidad de las garrapatas en esta fase, está determinada por la resistencia del huésped (Castellanos, 1993; Núñez, 1982).

*B. microplus* cambia a la etapa adulto juvenil aproximadamente en el día 13 del ciclo, diferenciándose sexualmente. Una vez que pierde la exuvia, al siguiente día el macho se encuentra listo para copular. El macho es muy móvil y camina por el huésped en busca de hembras para aparearse, regularmente se le encuentra debajo de las hembras semirepletas. La hembra no es móvil como el macho y se fija en el huésped durante todo su ciclo de vida. La hembra termina su ciclo al ovopositar (Núñez, 1982).

### **2.3 Estructura del canal de sodio**



Las células excitables tienen en la membrana plasmática canales de paso específicos que son sensibles al voltaje, y tienen como función el transporte facilitado de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> (Mathews *et al.*, 2004; Raymond-Delpech *et al.*, 2005; Pasay *et al.*, 2008). Estos canales son proteínas transmembranales que presentan dos estados conformacionales: abiertos o cerrados según el potencial de membrana que posea la célula (Mathews *et al.*, 2004; Albert *et al.*, 2002; Catterall, 2000, Davies *et al.*, 2007; Dong, 2007; Narahashi *et al.*, 1998; Narahashi *et al.*, 2007) y son necesarios para que se realice la iniciación y propagación del impulso nervioso (Potencial de acción) en estas células (Catterall, 2000; Yu y Catterall 2003; Davies *et al.*, 2007; Dong, 2007).

Estudios recientes a nivel molecular de los canales de sodio en mamíferos han generado información acerca de la estructura y funcionamiento de estos canales dependientes de voltaje (Catterall, 2000) y describen a los canales de sodio como una subunidad alfa ( $\alpha$ ), que puede poseer una o más subunidades pequeñas beta ( $\beta$ ) (Yu y Catterall 2003, Davies *et al.*, 2007; Denac *et al.*, 2000). La subunidad  $\alpha$  se encuentra constituida por 4 dominios homólogos (DI-DIV) y cada dominio posee 6 segmentos transmembranales (S1-S6) (Denac *et al.*, 2000 Dong, 2007). La conexión entre los dominios y segmentos esta dada por orquillas intra y extracelulares. El segmento 4 (S4) de cada dominio sirve como un sensor que prende o activa al canal al detectar el voltaje; este segmento esta formado por cinco u ocho residuos de carga positiva (argininas o lisinas) seguido por dos residuos hidrofóbicos, los cuales forman arreglos helicoidales de cargas positivas en la membrana (Yu y Catterall 2003; Goldin, 2002).

El poro selectivo para los iones sodio está formado por el S5 y S6 de cada dominio y los aminoácidos aspartato, glutamato, lisina y alanina forman las orquillas que conectan el S5 y S6 del Dominio I, II, III y IV son importantes para la selectividad de estos iones (Goldin, 2002).

Las orquillas que unen el DI y DII, y el DII y DIII son largas, mientras que, los que unen al DIII y DIV son más cortos (Denac *et al.*, 2000). La orquilla intracelular que conecta al DIII y DIV es altamente conservado y esta compuesto

por un motivo formado por tres residuos: isoleucina, fenilalanina, metionina (IFM) y por su hidrofobicidad tiene un importante papel en la inactivación del canal de sodio (Denac *et al.*, 2000; Catterall, 2001; Dong, 2007).

En lo que respecta a los canales de sodio en Insectos, se han identificado dos genes putativos en *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*), uno llamado DSC1 que fue obtenido de una biblioteca de DNA genómico y posee una estructura similar a la subunidad  $\alpha$  (Salkoff *et al.*, 1987); este mismo gen, fue identificado en *B. germanica* (BSC1) (Liu *et al.*, 2001), sin embargo en un estudio realizado por Zhou *et al.*, (2004) descubrieron que BSC1 a pesar de tener la secuencia similar al canal de sodio dependiente de voltaje las propiedades son más similares a los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje, proponiendo una nueva familia de canales de cationes dependientes de voltaje; el otro gen “Para” codifica para un canal de sodio funcional en *D. melanogaster* (Soderlund y Knipple 2003).

## **2.4 Fisiología del canal de sodio**

Toda célula nerviosa posee un potencial de reposo y es definido como la diferencia de carga eléctrica entre ambos lados de una membrana. En una célula con potencial de reposo, puede observarse, que su parte interna estará cargada negativamente al compararse con el líquido intersticial, por lo que, la célula se encuentra eléctricamente polarizada. Un potencial de reposo posee un valor de -70 mV y la estructura anatómica que presenta cuando posee este valor es un estado cerrado (Mathew *et al.*, 2004; Davies *et al.*, 2007; Narahashi *et al.*, 2007).

Cuando una célula nerviosa recibe un estímulo lo suficientemente intenso, se lleva a cabo el potencial de acción (impulso nervioso) que se transmitirá a lo largo de la membrana, y su potencial es modificado a -40mV (umbral para que pueda abrirse el canal), por lo que, este voltaje es captado por los S4 que sirven como sensores y las hélices del S4 rotan, moviéndose hacia el exterior, ocasionando un cambio de conformación que permite que se abra el poro del canal y la entrada del flujo de iones sodio a favor del gradiente electroquímico (Yu

y Catterall 2003; Catterall, 2001; Lodish *et al.*, 2006). La entrada de cargas positivas al canal despolariza la membrana, y permite que se abran más canales de Na<sup>+</sup> y la entrada de más iones, ocasionando un cambio en el potencial de membrana hasta de aproximadamente +40mV en menos de un milisegundo. La permeabilidad de los iones Na<sup>+</sup> rápidamente se incrementan y el potencial de membrana se aproxima a +55mV (Mathew *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2000). En pocos segundos, el canal se inactiva para evitar la entrada de un flujo mayor de sodio (Yu y Catterall 2003; Catterall, 2001; Lodish *et al.*, 2006). La inactivación del canal es automática, y esto ocasiona que los canales se cierren rápidamente, incluso aunque la membrana se encuentre despolarizada; evitando con esto, que la célula este permanentemente con espasmos eléctricos (Yamagishi *et al.*, 2007).

Los canales permanecerán inactivados y no podrán volver a activarse hasta que su potencial de membrana recupere su valor inicial negativo en algunos milisegundos (Albert *et al.*, 2002).

Los canales de K<sup>+</sup> son también activados por el estímulo recibido, y estos canales ayudan a eliminar los iones sodio del medio interno, con la finalidad de que la célula recupere el potencial de membrana original, antes de que los canales de Na<sup>+</sup> se inactiven completamente. Este liberación de iones K<sup>+</sup> devuelve al interior de la membrana el estado relativamente negativo, permitiendo que la célula se repolarice (Albert *et al.*, 2002; Catterall, 2000).

Por la importancia que tienen los canales de sodio en la excitabilidad de las membranas, son efectivos sitios de unión para una variedad de neurotoxinas producidas por plantas y animales. Las neurotoxinas alteran varias propiedades del canal, incluyendo iones de conductancia, selectividad de iones, activación e inactivación (Catterall, 2000; Narahashi *et al.*, 1998).

## **2.5 Mecanismo de acción de los piretroides en el canal de sodio**

Dentro de las neurotoxinas que alteran las propiedades de los canales de sodio se encuentran las piretrinas, las cuales son insecticidas naturales derivados de la planta *Chrysanthemum cinerariaefolium*, que por poseer una excelente

propiedad de ocasionar muerte rápida en los insectos y baja toxicidad en mamíferos han sido de gran utilidad como productos ectoparasiticidas, sin embargo, el descubrimiento de otros productos similares a las piretrinas las han ido desplazando, tal es el caso de los piretroides sintéticos, los cuales son análogos sintéticos de las piretrinas, que poseen la ventaja de poseer moléculas más estables a la luz solar, se disuelven mejor en agua y poseen un efecto residual mayor que las piretrinas (Adams, 1995; Casida, 1980; Miyamoto, 1976; Raymond-Delpech *et al.*, 2007).

Los piretroides son ésteres halogenados clorados o bromados de una de las formas isoméricas del ácido crisantémico y una molécula de alcohol sintético. La estructura puede variar, ya que poseen numerosos átomos de carbonos asimétricos, pero la característica que les da su actividad insecticida y toxicidad consiste en los isómeros 1R $\alpha$ S y generalmente los que son más tóxicos son los 3-cis en comparación con los 3-trans. (Vijverberg y van den Bercken 1990).

Los piretroides pueden ser clasificados como tipo I y II, dependiendo de la presencia o ausencia del grupo ciano en la parte alcohólica. Estos dos tipos de piretroides tienen un modo de acción neurofisiológico y sitio blanco diferente (Soderlund y Bloomquist 1989).

Los piretroides tipo I actúan sobre los nervios periféricos ocasionando descargas repetitivas en las fibras nerviosas, esta inducción de picos múltiples son resultado de la entrada prolongada de los iones sodio; sin embargo, esta despolarización de la membrana no bloquea la conducción del impulso nervioso (Casida, 1980; Shafer *et al.*, 2005). Por otra lado, los piretroides tipo II actúan a nivel central y retardan el cierre de los canales de sodio (inactivación) por un período de tiempo más prolongado que los tipo I. Este retardo en el cierre del canal ocasiona despolarización del potencial de la membrana, bloqueando la conducción del impulso nervioso (Soderlund y Bloomquist 1989; Shafer *et al.*, 2005).

En estudios realizados para conocer la forma en que actúan los piretroides, se ha reportado que estos se unen a las subunidades alfas de los canales de sodio y presentan una mayor afinidad por el estado abierto del canal para fijarse y actuar (Catterall, 2001; Tan *et al.*, 2005, O'reilly *et al.*, 2006).

Una vez que los piretroides se unen al sitio receptor del canal, estabilizan el estado abierto (Tan *et al.*, 2005) provocando un retraso en el cierre del canal, después que ha pasado el impulso nervioso; esta entrada prolongada de sodio hacia la parte interna ocasiona descargas repetitivas en los nervios e hiperexcitabilidad causando parálisis y muerte en los insectos (Adams, 1995; Bloomquist 1996; Pasay *et al.*, 2008; Tan *et al.*, 2005; Shafer *et al.*, 2005).

Los piretroides pueden penetrar al organismo del insecto a través del tegumento y puede difundirse a todo el organismo en solución o disuelto en partículas de lípidos. Su penetración va a depender de las características del insecticida como son: la formulación, propiedades físicas y químicas y naturaleza del solvente (Miyamoto, 1976; Casida, 1980).

Los piretroides tienen dos tipos de efectos en los insectos: un efecto inicial rápido de abatimiento o derribo conocido como Knockdown (Kd), pérdida de movimiento y un efecto letal subsecuente (Miller, 1988).

## **2.6 Desarrollo de la resistencia a los insecticidas**

Los acaricidas utilizados continuamente provocan una fuerte presión de selección eliminando a los individuos susceptibles, ocasionando un fenómeno de resistencia al producto utilizado, ya que este, se convierte en el agente de selección más importante. La resistencia es un proceso evolutivo que aparece como resultado de la selección genética (Lee *et al.*, 2000). La velocidad de desarrollo de la resistencia dentro de una población depende principalmente de la

intensidad de selección, frecuencia inicial de genes que confieren la resistencia y el grado de dominancia del gen (Stone, 1972).

Se han identificado tres fases en el desarrollo de la resistencia a los ixodicidas que son: Establecimiento: esta fase surge como un mecanismo de preadaptación a través de mutaciones naturales e independientes del proceso de selección (FAO, 2001). En la fase de dispersión existe una sobrevivencia preferencial de individuos resistentes al aplicarse los ixodicidas. En esta fase predomina la condición heterocigótica y este período es relativamente corto. El alelo resistente se encuentra en una frecuencia baja y no son detectables las fallas en la efectividad de los productos (FAO, 2001). La fase de emergencia se presenta como resultado de una elevada tasa de presión de selección, y la duración es corta. El alelo resistente es común en la población por lo que, los ixodicidas dejan de ser efectivos gradualmente (FAO, 2001).

La resistencia a los acaricidas actualmente es uno de los grandes problemas en áreas tropicales en donde la producción bovina es una de las actividades de mayor importancia económica, debido a la múltiple resistencia a todas las familias de los acaricidas utilizados actualmente (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2007).

Debido a esta problemática, a partir de la década de los 80's, en varios estados de la República Mexicana se empezaron a realizar estudios sobre la resistencia a los acaricidas en *B. microplus*, monitoreando cepas de campo. Estos estudios dieron como resultados la presencia de una cepa resistente a los organofosforados "Tuxpan" y otra que fue resistente a los organofosforados y organoclorados llamada "Tempoal" (Santamaría *et al.*, 1999). Con los resultados obtenidos en este diagnóstico, se buscaron alternativas para controlar a esas cepas resistentes y fue así que el gobierno federal permitió la comercialización de nuevos productos como los piretroides y amidinas como métodos alternativos de control (Fragoso *et al.*, 1999). Sin embargo, los piretroides resultaron ser eficaces en el control de la mosca de los cuernos *H. irritans* que afecta al ganado bovino en zonas tropicales, y debido a esta ventaja fueron utilizados continuamente en zonas

ganaderas, por lo que, en poco tiempo se presentaron los primeros brotes de cepas de *B. microplus* resistentes a los piretroides, complicando cada vez más el control de las garrapatas con estos productos (Fragoso *et al.*, 1995).

Posteriormente las amidinas empezaron a cobrar popularidad como método de control, pero debido a su inestabilidad en los baños de inmersión, su comercialización se vio limitada; sin embargo, la presencia de resistencia a los piretroides en 1993, hizo que se incrementará el uso de este ixodicida, ya que demostró ser la alternativa más adecuada para el control de las cepas con doble resistencia (Aguirre, 1993; Ortiz *et al.*, 1995; Fragoso y Soberanes, 2001). Posteriormente a principios del 2001 en el estado de Tabasco se reportó el primer caso de resistencia hacia el amitraz en *B. microplus*. La cepa "San Alfonso" además de ser resistente al amitraz posee la característica de ser resistente también a los piretroides y organofosforados (Soberanes *et al.*, 2002).

Por lo anteriormente citado, se observa que en la República Mexicana el problema de resistencia hacia los ixodicidas ha evolucionado rápidamente, y existen a la fecha cepas resistentes a los organoclorados (OC), organofosforados (OF), amitraz y piretroides sintéticos (PS) (Santamaría *et al.*, 1999).

Es importante mencionar, que una vez que la resistencia se encuentra presente en una zona, los productores se enfrentan con la problemática de ineffectividad de los acaricidas que utilizan como métodos de control, es entonces, cuando el productor decide realizar algunas acciones para seguir utilizándolos, como son: incrementar la concentración recomendada y números de tratamientos; cambiar a otro producto con un ingrediente activo diferente. Estas acciones dan como resultado un gasto adicional en el control de las garrapatas.

## **2.7 Genética de la resistencia a los insecticidas**

La resistencia dentro de una población depende del número de genes asociados con la resistencia que se encuentran presentes y de las frecuencias alélicas de los mismos, así como de la selección de los alelos y sus variaciones mediante la aplicación de un insecticida (McKenzie, 2000; Oakeshott *et al.*, 2003).

Los principales mecanismos de resistencia, reportados en una amplia variedad de insectos son: el incremento en la tasa de detoxificación y las alteraciones en el sitio de acción (Miller *et al.*, 1999; Bisset, 2002; Dauterman y Hongson 1993). Sin embargo, existen otros mecanismos que confieren resistencia a los acaricidas, como son la resistencia a la penetración y por comportamiento (Bisset, 2002, Roush y Miller 1986).

El incremento en la tasa de detoxificación esta dada cuando niveles elevados de enzimas son capaces de detoxificar los acaricidas y ayudan a disminuir las dosis efectivas de estos, antes de que alcancen su sitio de acción, entre estas enzimas se pueden mencionar a las carboxilesterasas, glutations-S-transferasas y oxidasas de función múltiple (citocromo P 450, )(Oakeshott *et al.*, 2003). La insensibilidad en el sitio blanco es la causa más común de resistencia y es ocasionada por la presencia de mutaciones puntuales. Para que estas mutaciones sean seleccionadas favorablemente, es importante que la sustitución del aminoácido disminuya la unión con el acaricida, sin causar pérdida de la función primaria del sitio de acción. Por lo que, la sustituciones de los aminoácidos son limitadas y mutaciones idénticas son asociadas con la resistencia en otros insectos (Tan *et al.*, 2005).

En *B. microplus* se han encontrado dos mecanismos que confieren altos niveles de resistencia a los piretroides, uno es el incremento de la actividad de esterasas reportada en la cepa coatzacoalcos (Hernández *et al.*, 2002) y otro, es una mutación puntual, He *et al.*, (1999) investigando este mecanismo molecular de resistencia obtuvieron y secuenciaron un cDNA parcial *para*-homologo de 3599 pb del gen que codifica para un canal de sodio de cepas de garrapatas susceptibles y resistentes a los piretroides. Una mutación puntual fue detectada que da como resultado un cambio del aminoácido F1538I identificado en el dominio III del S6 altamente conservado de los canales de sodio (Guerrero *et al.*, 2001).

La resistencia a los piretroides representan uno de los problemas más importantes a nivel mundial, por el uso continuo de estos productos para el control de muchas especies de insectos (Field y Williamson, 2001).



La causa más común de resistencia, es la presencia de mutaciones puntuales en el sitio de acción de los piretroides y ha sido reportada en varias poblaciones de insectos (Guerrero y Pruet 2003).

En los insectos y artrópodos se ha descubierto un mecanismo que les confiere resistencia a los piretroides y DDT, la cual es denominada “Knockdown resistance”, este tipo de resistencia ocasiona una reducción en la sensibilidad hacia estos compuestos al presentar mutaciones en su sitio de acción que son los canales de sodio (Zhiqi *et al.*, 2000; Soderlund y Knipple 2003; Shafer *et al.*, 2005, Brogdon y McAllister 1998; Dong, 2007).

Una de las particularidades que presenta este tipo de resistencia, es que limita la efectividad de todos los piretroides y DDT, siendo esto de suma importancia a nivel de campo, ya que una vez detectada, es difícil mantener estos compuestos como un método de control químico para los insectos (Soderlund y Knipple 2003, Dong, 2007).

La resistencia Knockdown ha sido ampliamente investigada, y desde 1951 ha sido identificada y caracterizada en la mosca doméstica; pero en años recientes, se han identificado mutaciones responsables a la resistencia en los genes del canal de sodio de insectos (Soderlund y Knipple 2003).

Dos genes putativos han sido identificados en *D. melanogaster*, los genes *DSC1* y *Para* (Salkoff *et al.*, 1987). Del gen que codifica para el canal de sodio llamado “*Para*” se han realizado sondas para aislar segmentos de genes del canal de sodio de otras especies de insectos (Soderlund y Knipple 2003).

En la mosca *H. irritans* se han reportado dos mutaciones en el canal de sodio denominadas: Kdr que origina un cambio de Leucina a Fenilalanina en el residuo aminoácido 1014 (L1014F) y super-kdr que cambia de Metionina a Treonina en el residuo 918 (M918T) y el papel que desempeñan estas sustituciones de aminoácidos con la resistencia a los piretroides (Guerrero *et al.*, 1997; Wondji *et al.*, 2008).

Las mutaciones M918T y L1014F reportadas en la mosca doméstica han sido encontradas junto con un tercer sitio (T929) en un amplio rango de insectos (Field y Williamson, 2001).

La mutación L1014F ha sido localizada en el dominio II del segmento 6 y la mutación M918T se encuentra en la orquilla que conecta el segmento (S4) y el segmento 5 (S5). Es importante mencionar que la mutación denominada super-kdr no ha sido identificada en ausencia de la mutación L1014F (Soderlund y Knipple 2003, Wondji *et al.*, 2008).

La mutación L1014F ha sido identificada y reportada en otras especies como son *A. gambiae*, *B. germanica*, *Culex pipiens* (*C. pipiens*), *Musca domestica* (*M. domestica*), *Leptinotarsa decemlineata* (*L. decemlineata*), *M. persicae*, *P. xylostella* (Martínez-Torres *et al.*, 1998; Miyazaki *et al.*, 1996; Dong, 1997; Liu *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2000, Schuler *et al.*, 1998; Wondji *et al.*, 2008).

Al analizar las mutaciones presentes en el DIIS6 del canal de sodio se observa una reducción de la sensibilidad hacia los piretroides (Guerrero *et al.*, 1997, Liu *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 1999, Schuler *et al.*, 1998, Jamroz *et al.*, 1998).

Se ha reportado en el canal de sodio de la cucaracha, una mutación kdr en el dominio III del S6 de Fenilalanina a Isoleucina en el residuo 1519. Esta mutación fue previamente identificada por Hee *et al* (1999) en la garrapata que afecta al ganado bovino *B. microplus* confiriéndole resistencia a los piretroides (Tan *et al.*, 2005 Soderlund y Knipple 2003; Dong, 2007).

El sitio F1519 en la secuencia del canal de sodio de insectos, es importante para la unión con los piretroides, ya que en esta posición un residuo aromático Fenilalanina, Triptófano o Tirosina (F, W o Y) es necesario para que los piretroides actúen, sin embargo al encontrarse una mutación en este sitio, los insectos se hacen menos sensibles hacia estos acaricidas (Tan *et al.*, 2005).

En numerosos canales de sodio de insectos, la mutación L993F presente en el dominio IIS6 también se encuentra asociada con la unión a los piretroides.

Estos residuos aminoácidos específicos involucrados, forman parte del sitio receptor a los piretroides en canales de sodio de insectos (Catterall et al., 2003; Tan *et al.*, 2005). La inactivación del canal de sodio también puede ser afectada cuando existe una mutación de la Fenilalanina por varios residuos hidrofílicos (Yu y Catterall 2003).

Actualmente, se han realizados estudios de expresión *in vitro* de genes clonados y mutagénesis de sitio directo en los canales de sodio de vertebrados e invertebrados. Uno de los hallazgos encontrados en estos estudios ha sido que, un aminoácido afecta la selectividad a la toxicidad de los piretroides y los vertebrados son menos sensibles a los piretroides. Esto se debe particularmente, a que los vertebrados poseen un residuo que confiere resistencia a los acaricidas en los insectos. El estudio realizado para encontrar esta diferencia de aminoácido, consistió en comparar secuencias de canales de sodio de mamíferos e insectos, y los resultados demostraron que los sitios L1014 y T929 son aminoácidos fuertemente conservados, pero no están asociados con la selectividad a los piretroides. Sin embargo, en la posición 918 de los canales de mamíferos al introducirse una metionina por leucina, se incrementó 100 veces más la sensibilidad a los piretroides. Estos resultados demuestran la importancia que tiene ese aminoácido en esa posición para la selectividad y para que se realice la fuerte interacción con la molécula de los piretroides (Field y Williamson, 2001).

## **2.8 Modo de herencia de la resistencia a pesticidas en diferentes especies de insectos**

Varios investigadores han realizado estudios para conocer la forma en que se hereda la resistencia a diferentes compuestos y en numerosas especies como: *Helicoverpa armígera*, *Cydia pomonella*, *Rizopherta dominica*, *Aedes Aegypti*; *German cockroach* (Mebrahtu *et al.*, 1997; Bouvier *et al.*, 2001; Collins *et al.*, 2002).

La resistencia a los piretroides y la dominancia efectiva fue estudiada en la mosca de los cuernos, los resultados indican que la resistencia es heredada por

un solo gen, autosómico e incompletamente recesivo y que este tipo de resistencia es ocasionada por insensibilidad nerviosa (Roush *et al.*, 1986).

En *B. microplus* se han realizado investigaciones para conocer como se hereda la resistencia a diferentes insecticidas. Los estudios realizados en cepas australianas resistentes a diazinon y clorpirifos, demuestran que la resistencia en estas cepas, es ocasionada por dos genes complementarios mostrando dominancia incompleta (Stone *et al.*, 1982). Mientras que, en otro estudio realizado en cepas mexicanas la resistencia fue causada por varios genes (Harris *et al.*, 1988).

Recientemente se han realizado estudios para conocer el modo de herencia de la resistencia a la flumetrina y amitraz. En el trabajo realizado por Tapia *et al.*, (2003) encontraron que la resistencia a flumetrina fue autosómica y controlada por más de un gen, mientras que Li *et al.*, (2005) reportaron que la resistencia al amitraz en la garrapata *B. microplus* es heredada como una característica incompletamente recesiva y sugieren que más de un gen, son los responsables de la resistencia en la cepa brasileña estudiada. Li *et al.*, (2008) realizaron nuevamente un estudio genético y analizaron los mecanismos de resistencia a permetrina que se encontraban involucrados con la cepa brasileña "Santa Luiza" resistente a permetrina y amitraz. Los resultados de esta investigación sugieren que la resistencia a la permetrina fue heredado como una característica incompletamente recesiva.

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

El presente estudio fue realizado en la unidad de Artropodología del CENID-PAVET del INIFAP, ubicado en la carretera Cuernavaca-Cuautla Col. Progreso, Jiutepec, Morelos.

#### **3.1 Cepas de garrapatas**

Para la presente investigación se utilizaron dos cepas de garrapatas *B. microplus*. La cepa "B&H" evaluada toxicológicamente resistente a los piretroides cipermetrina, deltametrina y flumetrina en el laboratorio por la prueba de paquete de larvas. Esta cepa, fue seleccionada y presionada con permetrina para ser homocigótica resistente (RR) en el laboratorio de Texas (CFTRL) y enviada para su mantenimiento y análisis al laboratorio del CENID-PAVET en Jiutepec Morelos.

La cepa Media Joya susceptible (SS) utilizada en este experimento, fue colectada en un rancho en el estado de Jalisco, México y ha sido mantenida en el CENID-PAVET INIFAP desde 2001. Esta cepa se caracteriza por ser susceptible a los piretroides, amidinas y compuestos organofosforados y recientemente se ha utilizado como una cepa susceptible de referencia de América Latina.

Para determinar la frecuencia inicial del alelo mutado en ambas cepas se utilizó la prueba de PCR alelo específica (AS-PCR) descrita por Guerrero *et al.*, (2001) encontrando un 100% de alelos para la cepa "RR" y 2.27% para la cepa SS.

#### **3.2 Mantenimiento de las cepas**

La parte experimental de esta investigación estuvo dividida en dos partes:

Para la primera parte del experimento, se utilizaron dos bovinos de aproximadamente 180 kg de peso vivo, los cuales fueron alojados individualmente en infestaderos. Es importante mencionar, que se escogieron animales que anteriormente no hubieran sido expuestos a garrapatas, para favorecer las infestaciones.

A cada bovino se le asignó aleatoriamente cada una de las cepas mencionadas anteriormente (resistentes y susceptibles). Los bovinos fueron utilizados una sola vez y fueron removidos de los infestaderos después de colectarse las garrapatas ingurgitadas.

La infestación de los animales se llevó a cabo colocando en la línea media del dorso, 0.5 g de larvas de 15 días de edad (aproximadamente 10,000 larvas) de la cepa RR y SS. Una vez transcurridos 14 días pos infestación, se colectaron aproximadamente 300 metaninfas de cada uno de los bovinos y se transportaron al laboratorio en cajas de petri previamente identificadas, en donde fueron incubadas a  $27 \pm 1.5^{\circ}\text{C}$  y a 85-86% de humedad relativa (Cen *et al.*, 1998) hasta la ecdisis, para que pudieran ser sexadas con ayuda de un microscopio estereoscopio.

Una vez separadas por sexos, los machos y hembras de cada cepa fueron utilizados para llevar a cabo las cruzas recíprocas.

Una parte de las metaninfas de las cepas parentales SS y RR no se desprendieron de los bovinos, esto con la finalidad de que pudieran completar su ciclo biológico y se colectaran hembras ingurgitadas de estas cepas, para que a las larvas de éstas se analizaran toxicológicamente mediante la Prueba de Paquete de Larvas (PPL) y se les realizará la prueba AS-PCR.

### **3.3 Cruzas recíprocas y retrocruzas entre la cepa susceptible y resistente**

Una vez separados machos y hembras, se realizaron los cruzamientos de los adultos juveniles utilizando 200 machos RR x 200 hembras SS (razón 1:1); la progenie obtenida de esta craza fue denominada RS. La otra craza fue realizada con 200 machos SS x 200 hembras RR (razón 1:1), y su progenie fue denominada SR (Cuadro 1). Una vez realizadas las cruzas fueron transferidas a otros dos bovinos para llevar a cabo su compleción de alimentación y el cruzamiento efectivo.

A cada bovino receptor de las cruzas y previo a la infestación, se le colocaron dos mangas de tela, sobre una parte de piel rasurada a la altura de la sexta costilla de cada lado, dando forma de un círculo aproximadamente de 30 cm de diámetro. Los bordes de la tela y la piel de los bovinos se impregnaron con resistol 5000 ®. Las mangas fueron colocadas y una vez puestas se dejaron que se secaran durante todo el día. Al siguiente día, las cruzas recíprocas fueron colocadas aleatoriamente en los bovinos y las mangas fueron cerradas con ligas para evitar la salida de estas. El uso de las mangas en los bovinos fue utilizado con la finalidad de reducir el área de infestación y tener mayor control de las hembras repletas.

Al séptimo y octavo día de la infestación, se colectaron las hembras ingurgitadas de los respectivos cruzamientos y se trasladaron a una caja de petri. Las hembras ingurgitadas obtenidas de las cuatro cepas SS, RR, RS y SR fueron colocadas en cajas de cultivo celular con 24 pozos con tapas e incubaron a una temperatura de  $27 \pm 1.5$  °C y humedad relativa de 85-86% (Cen *et al.*, 1998) hasta la ovoposición. Después de 15 días se retiró la masa ovígera obtenida de cada hembra y los huevos fueron colocados en viales individuales. Los huevos se incubaron bajo las mismas condiciones descritas anteriormente, para permitir la eclosión de las larvas.

Un vial con larvas de 10 días de edad de cada cepa (SS, RR, RS y SR) fue utilizado para el ensayo de paquete de larvas y otro fue usado para la extracción de DNA para la prueba AS-PCR. El tercer vial sirvió para infestar nuevamente a otros bovinos con las cepas susceptible y resistente y poder realizar las retrocruzas que sirvieron para la segunda parte del experimento.

Para la segunda parte de éste experimento se llevó a cabo la siguiente metodología: Una vez obtenida la progenie  $F_1$  se realizaron cuatro retrocruzas.

La primera retrocruza fue realizada utilizando 250 mg de larvas RS x 250 mg de RR y para fines prácticos fue denominada R1, la segunda fue con 250 mg de RS x 250 mg de SS (R2), en la tercera se utilizó 250 mg de SR x 250 mg de larvas RR

(R3) y para la cuarta retrocruza se usaron 250 mg SR x 250 mg de SS (R4) (Cuadro 2). Cuatro bovinos fueron seleccionados para mantener las retrocruzas antes mencionadas y otros dos fueron infestados nuevamente con las cepas parentales SS y RR. Las infestaciones fueron realizadas sobre los bovinos sin el uso de mangas y aproximadamente 21 días posteriores, se empezaron a coleccionar las hembras ingurgitadas, y se siguió la misma metodología antes mencionada para realizar el diagnóstico toxicológico y molecular correspondiente de cada cepa.

### **3.4 Prueba de Paquete de Larvas**

Los acaricidas usados para los bioensayos fue la flumetrina (58.78% grado de pureza), deltametrina (99.5%) y cipermetrina (98%) piretroides de segunda generación (Santamaría, 1992). Se preparó una solución madre disolviendo el acaricida en una mezcla de aceite de oliva (solvente primario) y tricloroetileno (solvente volátil) en una proporción 2:1. La dosis alta utilizada en cada bioensayo fue preparada por dilución de la solución madre con el volumen apropiado de la mezcla de aceite de oliva y tricloroetileno, y las demás dosis fueron preparadas empleando un factor de dilución de 0.5.

Para la prueba toxicológica se utilizaron larvas de *B. microplus* de 10 días de edad de las cepas SS, RR, RS, SR, R1, R2, R3 y R4 usando varias diluciones de cipermetrina, deltametrina y flumetrina. Se impregnaron con cada dosis rectángulos de papel Whatman del No.1 de 8.5 x 7.5 cm, con tres repeticiones más un control sin ixodicida por cepa (Stone y Haydock, 1962). En cada paquete fueron depositadas aproximadamente 100 larvas. El tiempo de exposición fue de 24 horas en una estufa de incubación a  $27 \pm 2$  °C y 80% de humedad relativa. En cada paquete se contó el número de larvas vivas y muertas, para evaluar el porcentaje de mortalidad.

La concentración discriminante (CD) para los piretroides fue incluida dentro de las diluciones realizadas. La CD utilizada en la prueba se obtiene duplicando la concentración letal 99.9% y se obtiene el 100% de mortalidad de una cepa



susceptible de referencia, por lo que, la presencia de una larva viva de una cepa analizada, se interpreta como una muestra resistente.

### **3.5 Extracción de DNA genómico**

El DNA se purificó de cada una de las larvas que previamente fueron congeladas en hielo seco. Las larvas se transfirieron a una caja de Petri sobre hielo seco y se colocaron individualmente en tubos de microcentrífuga de 1.5 ml., conservados en hielo seco. Utilizando un pistilo se trituró a la larva aproximadamente durante unos minutos, esto con la finalidad de garantizar que la larva se rompiera en varios fragmentos. Se adicionó al tubo que contenía a la larva, 20 µl de buffer de muestra (Tris 100 mM, pH 8.3, 500 mM KCl). El contenido del tubo se centrifugó y fue colocado en baño maría por 3 minutos. Posteriormente, por segunda vez los tubos se centrifugaron a 4°C y 14,000 rpm durante un período de 2 minutos y se mantuvieron a una temperatura de -80°C hasta que se realizó la prueba de PCR (Guerrero *et al.*, 2001).

### **3.6 Análisis de la mutación en el gen que codifica para el canal de sodio**

Para realizar el análisis de la mutación en el gen que codifica para el canal de sodio, se utilizó la técnica de PCR alelo específico descrita por Guerrero *et al.* (2001). Para ello se utilizaron tres oligonucleotidos, FG 227(5'-TTGTTTCATTGAAATTGTCGA-3') antisentido para ambos alelos, FG-221(5'-TTATCTTCGGCTCCTTCT-3') sentido para el alelo silvestre y FG-222 (5'-TTATCTTCGGCTCCTTCA-3') sentido para el alelo mutado.

Se usaron reacciones de 20µl y las concentraciones por cada reacción fueron 20pmol de cada uno de los oligonucleotidos, 10 mM de tris pH 8.3, 50mM de KCl, 0.05 mM de cada dNTP, 1.75 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.1 µl de una mezcla de polimerasa Amplitaq (5U/ µl stock; Perkin-Elmer, Foster City, CA), y un anticuerpo TaqStart (stock de 1.1 µg/µl; Clontech, Palo Alto, CA) y 1 µl de DNA.

Se utilizó un termociclador marca Whatman Biometra personal programado a 96°C por 2 minutos en el primer ciclo, seguido de 37 ciclos consistentes en 1

minuto a 94 °C de desnaturalización, 60°C por un minuto de alineamiento y un minuto de extensión a 72°C, incluyendo un paso adicional de extensión a 72°C por 7 minutos. Los productos de la reacción fueron fraccionados en Ultrapure™ Agarose -1000 y se utilizó al 2.5%, disuelto en TBE 1X, adicionándole 1.5 µl de bromuro de etidio; posteriormente se visualizó por exposición en un transiluminador UV.

La interpretación del genotipo de la prueba de PCR, se realizó por análisis del gel, basado en la amplificación de la mutación (68pb) (substitución de la Phe-Ile en el S6 del dominio III del canal de sodio para-like). La amplificación del producto sólo en la reacción S, indica que es un individuo homocigoto susceptible. La amplificación solo en la reacción R, indica un homocigoto resistente y la detección del producto en ambas reacciones (S y R) indica un individuo heterocigoto (Guerrero *et al.*, 2001).

### **3.7 Análisis estadístico**

Se evaluó la mortalidad obtenida utilizando la concentración discriminante (CD) para la cipermetrina, deltametrina y flumetrina de cada cepa.

Para realizar los análisis estadísticos de las mortalidades de las cepas parentales cruzas y retrocruzadas del experimento, obtenidas en los bioensayos de paquete de larvas, se usó el programa Polo Plus Ver. 1 (LeOra software, 2002-2007), y este programa involucra la transformación probit del porcentaje de mortalidad y la transformación  $\log_{10}$  (dosis) para establecer los valores de la  $CL_{50}$  junto con sus límites de confianza al 95%.

Los datos de mortalidad obtenidos a la CD para cada piretroide de las cepas SS, RR, RS, SR, R1, R2, R3 y R4 fueron transformados a arco seno raíz cuadrada del porcentaje ( $\arcsin\sqrt{p}$ ) con el objetivo de cumplir con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas.

Un análisis de varianza factorial de dos vías fue utilizado, tomando como variable de grupo a los piretroides, como variable independiente a la cepa y como

variable dependiente la mortalidad, esto fue realizado con la finalidad de detectar diferencias estadísticas, entre las cepas susceptible, resistente, cruza recíprocas y retrocruzas y los tratamientos acaricidas. Las diferencias estadísticas entre las medias de los datos transformados para cada cepa fueron evaluadas por la prueba de Tukey utilizando el paquete estadístico SAS Ver.8.

Los índices de resistencia para cada cepa (IR) fueron calculados dividiendo los valores obtenidos de la CL<sub>50</sub> de las cepas RR, RS, SR, R1, R2, R3 y R4 entre la CL<sub>50</sub> de la cepa susceptible (SS) utilizada.

Para determinar la dominancia efectiva hacia la cipermetrina, deltametrina y flumetrina de este estudio se utilizó la fórmula descrita por Bourguet et al., (2000)

$$DML = (ML_{RS} - ML_{SS}) / (ML_{RR} - ML_{SS}) \text{ en donde:}$$

D<sub>ML</sub> varía entre 0 y 1 (0= sobrevivencia es recesiva y 1= sobrevivencia es dominante).

La dominancia efectiva prueba el nivel de mortalidad relativa (ML) para una concentración de insecticida dada y para calcular la dominancia efectiva de la mortalidad larval de cada acaricida fue usada la CD (2 X LC<sub>99.9</sub> de una cepa de referencia).

Para probar la hipótesis propuesta que plantea que la resistencia es monogénica, se utilizaron los resultados de mortalidad obtenida en la progenie de las retrocruzas y fueron comparados con los valores esperados usando la prueba de J<sup>2</sup>. Se utilizó el método de retrocruza simple comúnmente aplicado para examinar el modo de herencia de la resistencia a los pesticidas. La fórmula aplicada para probar la hipótesis fue la descrita por Sokal y Rohlf (1981) y a continuación se describe:

#### **Ecuación 1**

$$X^2 = \frac{(F_1 \cdot \hat{p}n)^2}{\hat{p}q n}$$

En donde:

$F_1$  = es el número observado de muertas en la retrocruza a una concentración dada.

$\hat{p}$  = es la proporción de muertas (basada en la ecuación 2)

$n$  = es el número total de las retrocruzas expuestas a una concentración dada.

$\hat{q} = 1 - \hat{p}$

## Ecuación 2

$$Y_x = 0.50 (W_{RS} + W_{RR})$$

$W_{RS}$  = Es la mortalidad de la RS obtenida a una concentración dada ( $F_1$ ).

$W_{RR}$  = Es la mortalidad de la RR obtenida a una concentración dada.

Para probar las asociaciones entre el alelo resistente y la sobrevivencia, y el genotipo RR y la sobrevivencia a la concentración discriminante de la cipermetrina, deltametrina y flumetrina en las cepas parentales y retrocruzas se realizó una prueba de correlación de Pearson utilizando el paquete estadístico SPSS ver. 13.

Cuadro 1. Metodología para obtener las cruzas recíprocas de *B. microplus*.

	CRUZA	
CEPAS	HEMBRAS (SS)	HEMBRAS (RR)
MACHOS *RR	RS ( $F_1$ )	RR
MACHOS *SS	SS	SR ( $F_1$ )

\*RR= Resistente \*SS= Susceptible

\*RS= ♂RRX♀SS

\*SR=♂SSX♀RR

Cuadro 2. Metodología para obtener las retrocruzas de *B. microplus*.

	RETROCRUZAS	
CEPAS	SS	RR
RS (F <sub>1</sub> )	RSXSS (R1)	RSXRR (R2)
SR (F <sub>1</sub> )	SRXSS (R3)	SRXRR (R4)

\*R1= ♂♀RSX♂♀SS \*R2= ♂♀RSX♂♀RR \*R3= ♂♀SRX♂♀SS \*R4= ♂♀SRX♂♀RR

## IV. RESULTADOS

### 4.1 Análisis toxicológicos de las cepas parentales y sus cruzas recíprocas

Los resultados toxicológicos obtenidos en la primera fase del experimento indican que los valores de la  $CL_{50}$  de la cepa SS obtenida de los bioensayos para cipermetrina, deltametrina y flumetrina fueron  $2.52 \times 10^{-6}$ ,  $0.228 \times 10^{-6}$  y  $0.0459 \times 10^{-6}$  mM/cm<sup>2</sup> respectivamente. La  $CL_{50}$  de la cepa resistente no pudo ser determinada debido a la baja mortalidad que presentó y los índices de resistencia fueron >2135, >28000, >30000 para los mismos piretroides antes mencionados (Fig.1).

La  $CL_{50}$  de las cruzas recíprocas RS y SR fueron  $22.7 \times 10^{-6}$  mM/cm<sup>2</sup>,  $2.0 \times 10^{-6}$  mM/cm<sup>2</sup>,  $0.122 \times 10^{-6}$  mM/cm<sup>2</sup> y  $38.5 \times 10^{-6}$  mM/cm<sup>2</sup>,  $4.91 \times 10^{-6}$  mM/cm<sup>2</sup>,  $0.342 \times 10^{-6}$  mM/cm<sup>2</sup> para cipermetrina, deltametrina y flumetrina respectivamente son presentados en el Cuadro 3.

En el Cuadro 3 también se puede observar los índices de resistencia para cada una de las cepas estudiadas en esta parte del experimento, y basados en estos datos la cepa SR fue 1.7, 2.5 y 2.8 veces más resistente que la cepa RS para cipermetrina, deltametrina y flumetrina respectivamente. Se encontraron diferencia estadísticamente significativas entre las cepas RS y SR ( $p < 0.05$ ).

En lo que respecta a la respuesta de la mortalidad usando la CD en la Prueba de Paquete de Larvas (PPL) muestra evidencias que la permetrina utilizada para seleccionar a las larvas de *B. microplus* resistentes, confiere resistencia a todas las clases de piretroides mostrando mortalidades bajas de 1.09%, 0.0% y 0.37% para cipermetrina, deltametrina y flumetrina. Por otra parte, la craza recíproca RS muestra una tasa de mortalidad de 83.23%, 100% y 100% para cipermetrina, deltametrina y flumetrina, mientras que la SR las mortalidades que presentan fueron 62.35%, 68.15% y 74.26% para los mismos piretroides, los datos son resumidos en el Cuadro 4.

En la Figura 2 se ilustra el porcentaje de sobrevivencia de las cepas parentales y cruzas recíprocas. Se observa que la cepa RS presentó un

comportamiento similar a la CD que la cepa susceptible para deltametrina y flumetrina mostrando un porcentaje de sobrevivencia del 0.0% para ambos ixodocidas; sin embargo el comportamiento para cipermetrina fue de 16.77%. La cruce SR mostró porcentajes de sobrevivencia diferentes a la cruce RS, siendo estos porcentajes de 37.65%, 31.85% y 25.74 para los mismos piretroides respectivamente.

#### **4.2 Dominancia efectiva de las cepas parentales y sus cruces recíprocas**

El Cuadro 4, también muestra la dominancia efectiva del nivel de mortalidad (DML) indicando que la herencia de la sobrevivencia en la cepa RS es una característica completamente recesiva (DML=0; la sobrevivencia es recesiva) para deltametrina y flumetrina; sin embargo solo parcialmente recesiva para cipermetrina (DML=0.169). Por otro lado, la sobrevivencia para la cepa SR es heredada como una característica parcialmente recesiva para cipermetrina (DML=0.380), deltametrina (DML=0.319) y flumetrina (DML=0.258). Así un valor bajo de dominancia efectiva, demuestra que la sobrevivencia tiende a ser recesiva (0=sobrevivencia recesiva; 1= sobrevivencia dominante).

#### **4.3 Frecuencia de alelos R en las cepas parentales y sus cruces recíprocas**

La frecuencia alélica obtenida en la primera parte del experimento es presentada en el Cuadro 4. La frecuencia inicial del alelo resistente para la cepa SS fue de 2.27%, mientras que la cepa RR el porcentaje fue del 100%.

Las cruces recíprocas presentaron una frecuencia de alelos resistentes del 55% para la cepa RS y un 73% para la cepa SR.

Para realizar los análisis de la mutación con la prueba de AS-PCR, se extrajeron DNA de 50 a 60 larvas individuales de cada una de las cepas estudiadas. Un total de 488 muestras fueron realizadas para detectar el alelo resistente (mutado) y la misma cantidad de pruebas fueron utilizadas para detectar el alelo susceptible (silvestre) (Fig. 3).

La frecuencia de genotipos RR, RS y SS para las cepas parentales, sus cruza recíprocas y retrocruzas son presentados en los Cuadros 5 y 6.



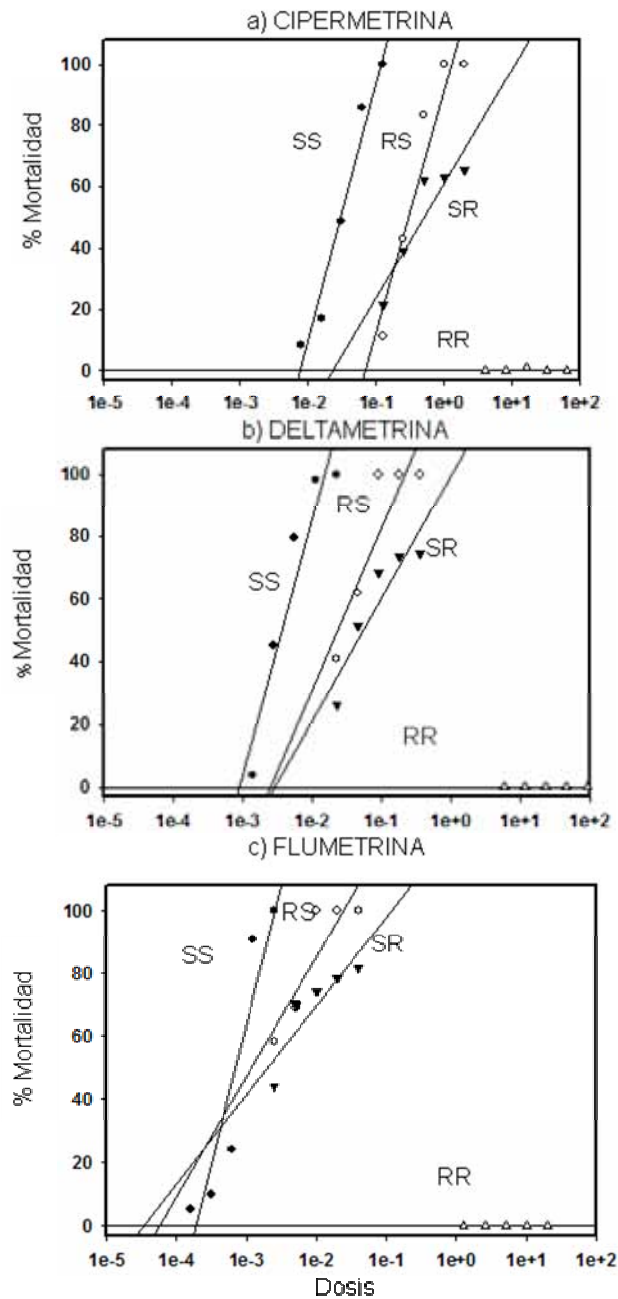


Figura 1. Cipermetrina (a), deltametrina (b) y flumetrina (c) respuesta de la concentración-mortalidad de las cepas parentales susceptible (SS) y resistente (RR) y las dos F<sub>1</sub> (RS y SR) generadas de las cruza recíprocas de las cepas parentales.

Cuadro 3. Análisis probit de las cepas parentales susceptible (SS) y resistente (RR) de *Boophilus microplus* y las cruizas recíprocas (RS y SR) a cipermetrina, deltametrina y flumetrina.

Cepa	Cipermetrina						Deltametrina						Flumetrina							
	n	Pend± DE	CL <sub>50</sub> <sup>a</sup> (95%IC)	X <sup>2</sup>	IR**	n	Pend± DE	CL <sub>50</sub> <sup>a</sup> (95%IC)	X <sup>2</sup>	IR**	n	Pend± DE	CL <sub>50</sub> <sup>a</sup> (95%IC)	X <sup>2</sup>	IR**	n	Pend± DE	CL <sub>50</sub> <sup>a</sup> (95%IC)	X <sup>2</sup>	IR**
SS	1,555	3.5±0.19	2.52x10 <sup>-4</sup> (2.27- 2.77x10 <sup>-5</sup> )	19.7	1	1,492	4.11±0.24	0.228x10 <sup>-6</sup> (0.207- 0.256x10 <sup>-5</sup> )	13.7	1	1,066	3.7± 0.19	0.0459x10 <sup>-6</sup> (0.0328- 0.0657x10 <sup>-5</sup> )	82	1					
RS	1,403	3.8±0.19	22.7x10 <sup>-4</sup> (20.1- 25.2x10 <sup>-5</sup> )	18.9	9	1,147	3.8±0.32	2.0x10 <sup>-6</sup> (1.52- 2.49x10 <sup>-5</sup> )	28.9	8.8	1,691	2.05±0.1	0.122x10 <sup>-6</sup> (0.102- 0.143x10 <sup>-5</sup> )	53	2.7					
SR	1,039	1.03±0.11	38.5x10 <sup>-4</sup> (25.4- 60.7x10 <sup>-5</sup> )	23.5	15.3	1,037	1.35±0.1	4.91x10 <sup>-4</sup> (2.78- 8.52x10 <sup>-5</sup> )	57.8	21.53	989	0.94±0.14	0.342x10 <sup>-6</sup> (0.204- 0.686x10 <sup>-6</sup> )	37	7.5					
RR			ND***	>2,136				ND***	>28,000				ND***	>30,000						

<sup>a</sup>Valores de la CL<sub>50</sub> (95% de IC) expresados en mM de ingrediente activo/cm<sup>2</sup>

\*\* Los índices de resistencia fueron calculados dividiendo la CL<sub>50</sub> de la cepa a probar entre la CL<sub>50</sub> de la cepa susceptible.

\*\*\*No determinado

Diferencias entre la CL<sub>50</sub> fueron designadas significativas cuando sus IC al 95% no traslapaban.

Cuadro 4. Porcentaje de mortalidad, dominancia efectiva y frecuencia del alelo R de las cepas parentales susceptible (SS) y resistente (RR) de *B. microplus* y sus cruza recíprocas RS y SR usando la concentración discriminante (2XCL<sub>99.9</sub>) para cipermetrina, deltametrina y flumetrina en la prueba de paquete de larvas.

Cepa	% Mortalidad a la CD			Dominancia Efectiva (DML)			Frecuencia alelica R
	Cipermetrina	Deltametrina	Flumetrina	DML Cipermetrina	DML Deltametrina	DML Flumetrina	
<b>SS</b>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	0	0	0	2.27
<b>RS</b>	83.23 <sup>b</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	0.169	0	0	55
<b>SR</b>	62.35 <sup>c</sup>	68.15 <sup>b</sup>	74.26 <sup>b</sup>	0.380	0.319	0.258	73
<b>RR</b>	1.09 <sup>d</sup>	0 <sup>c</sup>	0.37 <sup>c</sup>	0.989	1	0.996	100

\*Diferentes literales indican diferencias estadísticas significativas  $p < 0.05$

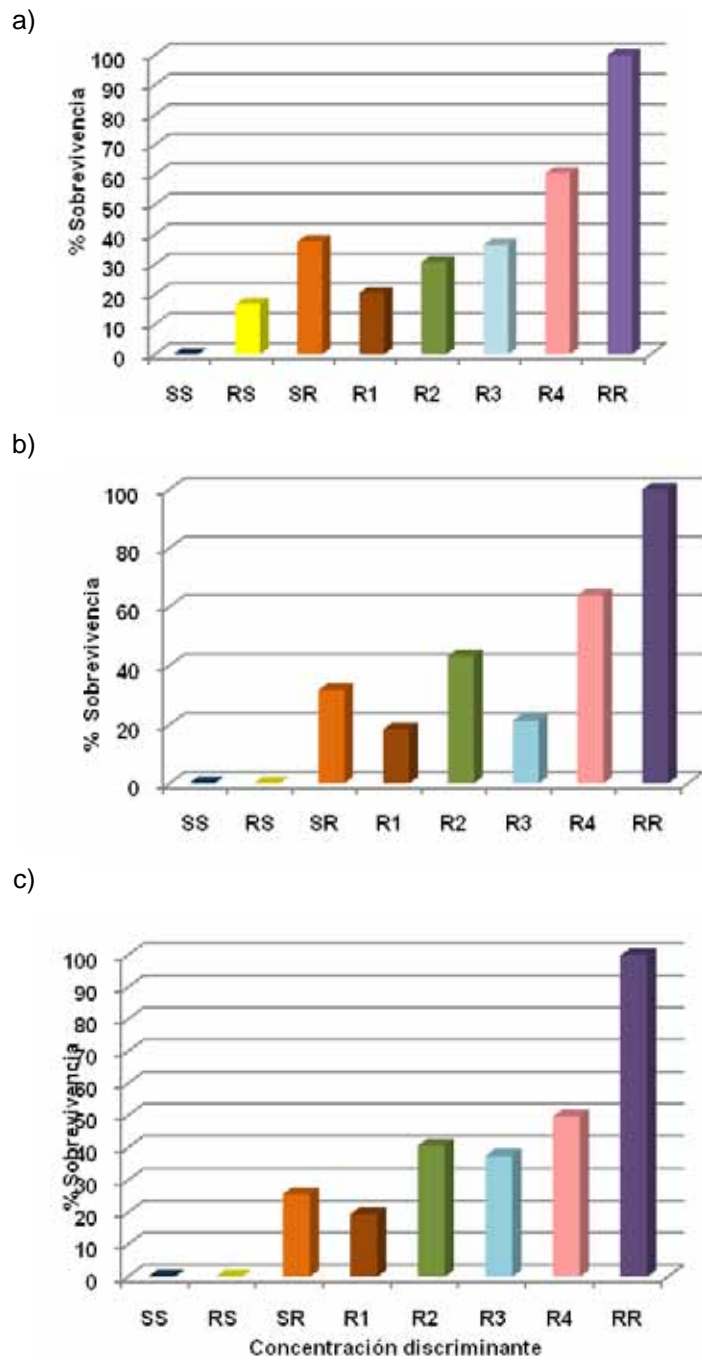


Figura 2. Porcentaje de sobrevivencia de las cepas parentales (SS) y resistente (RR) de *B. microplus*, sus cruzas recíprocas y retrocruzas utilizando la CD de cipermetrina (a), deltametrina (b) y flumetrina (c).

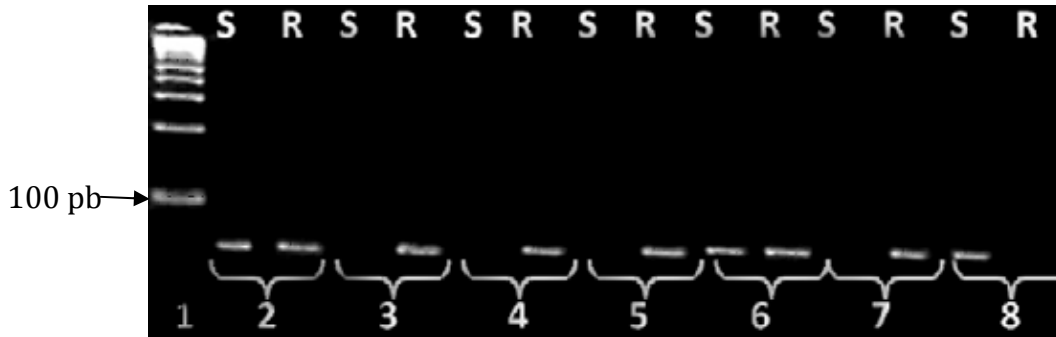


Figura 3 Análisis de PCR del DNA genómico extraído de larvas individuales de *Boophilus microplus* para la detección del alelo susceptible o mutado en el gen que codifica para el canal de sodio. Muestra 2 y 6 amplificaciones de ambos alelos (larvas heterocigotas), muestra 3, 4, 5, 7 (larvas homocigotas resistentes); Muestra 8 control (homocigoto susceptible). Los amplicones del tamaño esperado (68 pb) fueron visualizados en un gel de agarosa y teñidos con bromuro de etidio. El marcador de peso molecular se puede observar en el carril 1.

Cuadro 5. Frecuencia de genotipos obtenidos por la prueba AS-PCR en las cepas parentales de *Boophilus microplus* y sus cruzas recíprocas.

Cepas	Número de larvas analizadas	Número de larvas con genotipo específico			Porcentaje de larvas con genotipo específico		
		SS	RS	RR	SS	RS	RR
<b>SS</b>	66	63	3	0	95.45	4.55	0
<b>RS</b>	50	4	37	9	8	74	18
<b>SR</b>	50	0	27	23	0	54	46
<b>RR</b>	28	0	0	28	0	0	100

Cuadro 6. Frecuencia de genotipos obtenidos por la prueba AS-PCR en las cepas parentales de *Boophilus microplus* y sus retrocruzas.

Cepas	Número de larvas analizadas	Número de larvas con genotipo específico			Porcentaje de larvas con genotipo específico		
		SS	RS	RR	SS	RS	RR
<b>SS</b>	49	44	5	0	89.80	10.20	0
<b>R1</b>	47	11	24	12	23.40	51.07	25.53
<b>R2</b>	49	8	23	18	16.33	46.94	36.73
<b>R3</b>	50	3	31	16	6	62	32
<b>R4</b>	49	1	14	34	2.04	28.58	69.38
<b>RR</b>	50	0	5	45	0	10	90

#### 4.4 Análisis toxicológicos de las cepas parentales y sus retrocruzas

El Cuadro 7 muestra los valores de la respuesta concentración-mortalidad obtenidos de las cepas parentales y las retrocruzas. La  $CL_{50}$  de la cepa RR no pudo determinarse por su baja mortalidad. En el Cuadro 7 también puede observarse los índices de resistencia de estas cepas.

El Cuadro 7 presenta los resultados obtenidos del bioensayo PPL para el diagnóstico de resistencia utilizando la CD a cipermetrina, deltametrina y flumetrina en las cepas parentales estudiadas (SS, RR) y las cuatro retrocruzas (R1, R2, R3 y R4) resultantes de la segunda parte de este experimento.

Se muestra que de las retrocruzas realizadas con la cepa susceptible, la R1 (RSxSS) presenta mayor mortalidad al compararla con la R3 (SRxSS); este mismo comportamiento de mortalidad puede observarse al retrocruzarla con la cepa RR; es decir, en donde la  $F_1$  (RS) fue retrocruzada con susceptible y resistente, presentaron mayores porcentajes de mortalidad.

Al realizar la comparación de la mortalidad para cipermetrina y flumetrina en las retrocruzas y cepas parentales, se observa que la cepa R1 (RSXSS) es significativamente diferente a la cepa R3 (SRXSS) ( $P < 0.05$ ), sin embargo para la deltametrina no hubo diferencias estadísticas entre ellas, cuando se cruzaron las  $F_1$  (RS y SR) con la cepa SS. En lo que respecta a la cepa R2 (RSXRR) presentó el mismo patrón de respuesta toxicológica a la CD que la cepa R3 (SRXSS) no existiendo diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre ellas para cipermetrina y flumetrina, pero se observa que para la deltametrina si hubo una diferencia entre ellas ( $p < 0.05$ ), a pesar que una fue retrocruzada con la cepa susceptible y la otra con la cepa resistente. En lo que respecta a las cepas parentales, la cepa SS y RR, mostraron diferencias significativas con respecto a la retrocruzas realizadas.

En la Figura 2, se ilustra la sobrevivencia presentada en las cepas estudiadas. Se puede observar también que las cepas en donde la madre fue

resistente al retrocruzarla con las cepas parentales mostró un mayor porcentaje de sobrevivencia hacia los tres piretroides.

Los porcentajes de sobrevivencia para la cepa R4 (SR X RR) fueron de 60.54% para cipermetrina, 63.93% a deltametrina y 49.82% para flumetrina; mientras que, la sobrevivencia para la retrocruza R2 (RS X RR) fueron de 30.75%, 43.22% y 40.71% para cipermetrina, deltametrina y flumetrina respectivamente.

#### **4.5 Dominancia efectiva y frecuencia de alelos de las cepas parentales y sus retrocruzas.**

La dominancia efectiva para cada una de las retrocruzas puede observarse en el cuadro 8. Los resultados indican un comportamiento parcialmente dominante presentado en la retrocruza R4 (SRXRR) para la característica de sobrevivencia a cipermetrina (DML=0.605), deltametrina (DML=0.639) y para flumetrina (DML=0.498).

La frecuencia del alelo R de las cepas parentales y las cuatro retrocruzas son presentados también en el Cuadro 8. En esta segunda parte del experimento se observa un incremento del alelo R para la cepa parental SS, presentando un porcentaje de 5.51% y decremento de este mismo alelo para la cepa parental RR con un 95%.

#### **4.6 Análisis estadístico**

El cuadro 9 muestra los resultados obtenidos al realizar el análisis para probar la hipótesis de un solo gen como causante de la resistencia. Se observa que para la cipermetrina y flumetrina utilizando la concentración discriminante, un solo gen se encuentra involucrado, mientras que para la deltametrina la  $J^2$  calculada es mayor que la reportada en las tablas.

En la figura 4 se presentan las correlaciones observadas entre el porcentaje del alelo R y la sobrevivencia. Indicando correlaciones de  $r^2=0.882$ ,  $r^2=0.857$  y  $r^2=0.855$  para la cipermetrina, deltametrina y flumetrina respectivamente.



Encontrándose correlaciones significativas ( $p < 0.01$ ) entre la frecuencia de alelos R y la sobrevivencia hacia estos productos. También se realizaron correlaciones entre el genotipo RR y la sobrevivencia observada a cipermetrina, deltametrina y flumetrina y al analizarlas se encontraron correlaciones de  $r^2 = 0.934$ ,  $r^2 = 0.934$  y  $r^2 = 0.899$  respectivamente (Fig. 5).

Cuadro 7. Análisis probit de las cepas parentales susceptible (SS) y resistente (RR) de *B. micropilus* y las retrocruzas a cipermetrina, deltametrina y flumetrina.

Cepa	CIPERMETRINA					DELTAMETRINA					FLUMETRINA				
	n	P <sub>med</sub> ± DE	CL <sub>50</sub> * (95% IC)	X <sub>2</sub>	R <sup>**</sup>	n	P <sub>med</sub> ± DE	CL <sub>50</sub> * (95% IC)	X <sub>2</sub>	R <sup>**</sup>	n	P <sub>med</sub> ± DE	CL <sub>50</sub> * (95% IC)	X <sub>2</sub>	R <sup>**</sup>
SS	1,520	3.54 0.19	2.52x10 <sup>-5</sup> (2.27-2.77x10 <sup>-5</sup> )	19.7	1	1,492	4.11± 0.24	0.228x10 <sup>-5</sup> (0.207-0.258x10 <sup>-5</sup> )	13.7	1	1,000	3.7± 0.19	0.0459x10 <sup>-5</sup> (0.0328- 0.0657x10 <sup>-5</sup> )	82	1
R1	2,130	0.82± 0.07	7.23 x 10 <sup>-6</sup> (3.78-10.88 x 10 <sup>-6</sup> )	23.4	2.86	1,956	0.72± 0.07	0.545x10 <sup>-5</sup> (0.272-0.856x10 <sup>-5</sup> )	16.8	2.39	3,094	1.09± 0.08	0.136x10 <sup>-5</sup> (0.0688- 0.272x10 <sup>-5</sup> )	37.3	2.96
R2	1,413	0.85± 0.09	15.1x10 <sup>-5</sup> (10.09-19.1x10 <sup>-5</sup> )	8.0	5.89	1,969	0.43± 0.05	1.04 x10 <sup>-5</sup> (0.5-5-2.92x10 <sup>-5</sup> )	17.3	7.19	2,270	0.56± 0.05	0.403x10 <sup>-5</sup> (0.199- 0.546x10 <sup>-5</sup> )	11.5	8.91
R3	1,807	0.48± 0.08	12.0x10 <sup>-5</sup> (6.13-19.1x10 <sup>-5</sup> )	11.3	4.76	2,249	0.93± 0.06	1.31x10 <sup>-5</sup> (0.683-1.98 x10 <sup>-5</sup> )	35.9	5.75	2,342	0.67± 0.06	0.403x10 <sup>-5</sup> (0.272- 0.606x10 <sup>-5</sup> )	26.8	8.91
R4	2,260	0.74± 0.07	94.5x10 <sup>-5</sup> (75.6-123x10 <sup>-5</sup> )	7.8	37.65	2,240	0.76± 0.05	11.6x10 <sup>-5</sup> (9.97-14.1x10 <sup>-5</sup> )	4.9	50.8	1,904	0.47± 0.05	0.945x10 <sup>-5</sup> (0.683- 82.4x10 <sup>-5</sup> )	7.7	20.58
RR			ND***		>2,135			ND***		>28,000			ND***		>30,000

\*Valores de la CL<sub>50</sub> (95% de IC) expresados en mM de ingrediente activo/cm<sup>2</sup>.

\*\*Los índices de resistencia fueron calculados dividiendo la CL<sub>50</sub> de la cepa a probar entre la CL<sub>50</sub> de la cepa susceptible.

\*\*\*No determinado

Cuadro 8. Porcentaje de mortalidad, dominancia efectiva y frecuencia del alelo R de las cepas parentales susceptible (SS) y resistente (RR) de *B. microplus* y sus retrocruzas usando la concentración discriminante (2XCL<sub>99.9</sub>) para cipermetrina, deltametrina y flumetrina en la prueba de paquete de larvas.

Cepa	% Mortalidad a la CD			Dominancia Efectiva (D <sub>ML</sub> )			Frecuencia alelica R
	Cipermetrina	Deltametrina	Flumetrina	DML Cipermetrina	DML Deltametrina	DML Flumetrina	
<b>SS</b>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	0	0	0	5.1
<b>R1</b>	79.48 <sup>b</sup>	81.58 <sup>b</sup>	80.45 <sup>b</sup>	0.205	0.184	0.195	51.07
<b>R2</b>	69.25 <sup>bc</sup>	56.78 <sup>c</sup>	59.29 <sup>cd</sup>	0.307	0.432	0.407	60.2
<b>R3</b>	63.45 <sup>c</sup>	78.65 <sup>b</sup>	62.37 <sup>c</sup>	0.365	0.213	0.376	63
<b>R4</b>	39.46 <sup>d</sup>	36.07 <sup>d</sup>	50.18 <sup>d</sup>	0.605	0.639	0.498	83.67
<b>RR</b>	0 <sup>e</sup>	0 <sup>e</sup>	0 <sup>e</sup>	1	1	1	95

\*Diferentes literales indican diferencia estadística significativa p<0.05

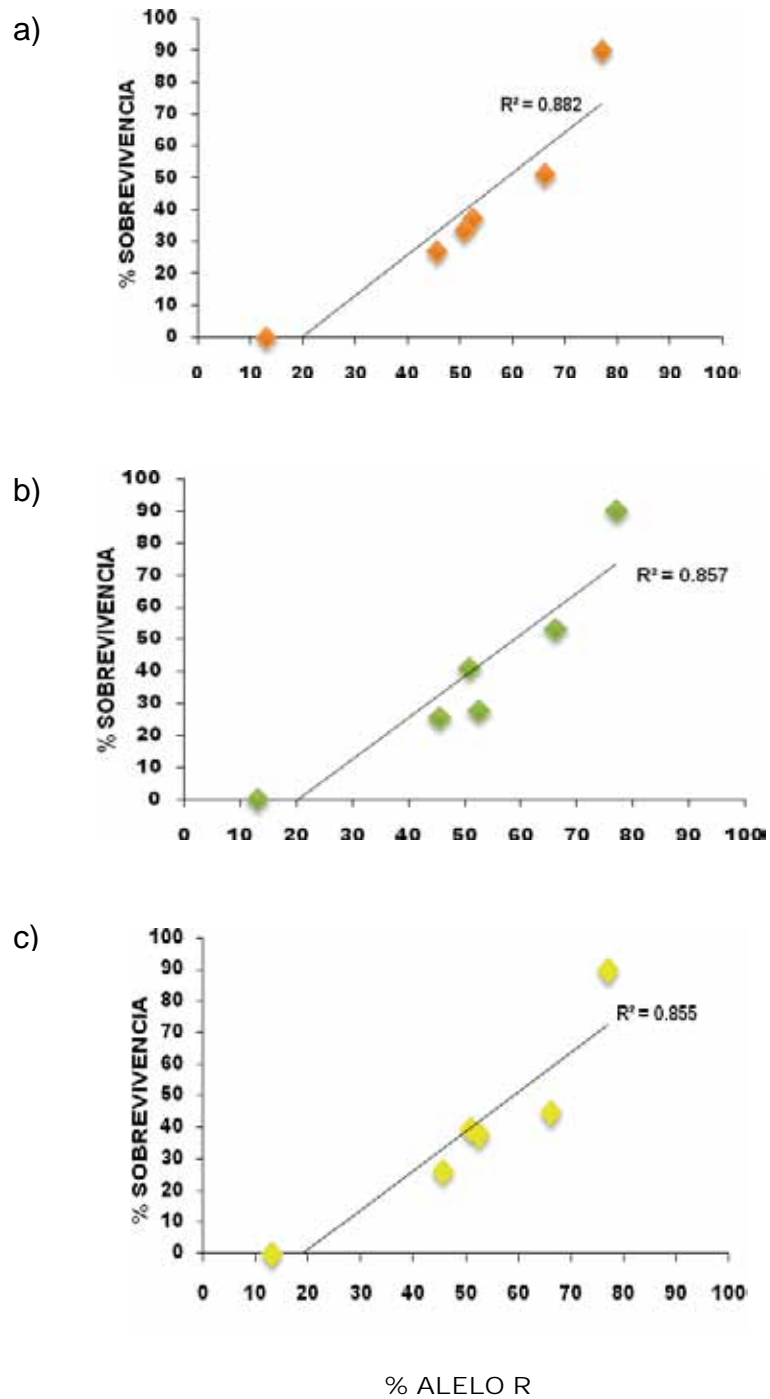


Figura 4. Correlaciones entre el porcentaje de alelos R y la sobrevivencia a la CD de cipermetrina (a), deltametrina (b) y flumetrina (c) de las cepas parentales de *B. microplus* y sus retrocruzadas.

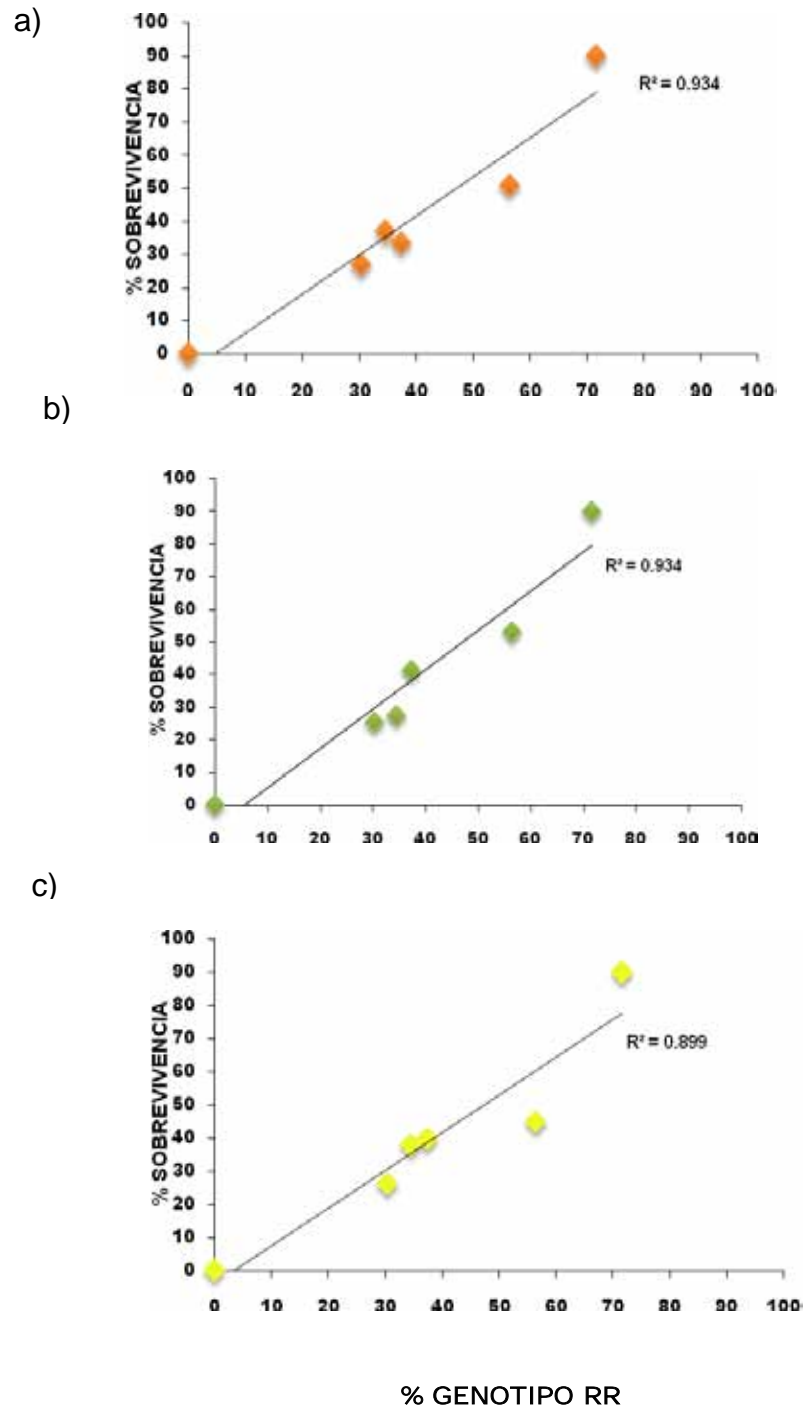


Figura 5. Correlaciones entre el porcentaje del genotipo RR y la sobrevivencia a la CD de cipermetrina (a), deltametrina (b) y flumetrina en las cepas parentales de *B.microplus* y sus retrocruzas.

Cuadro 9. Pruebas para comprobar la hipótesis de un solo gen controlando la resistencia a la cipermetrina, deltametrina y flumetrina utilizando la CD ( $2XCL_{99,9}$ ) y  $J^2$ .

CIPERMETRINA										
CD	Valores observados en las retrocruzas			FI- $\hat{p}n$	$(FI-\hat{p}n)^2$	$\hat{p}$	d	$\hat{p}q$	pqn	$J^2=(FI-\hat{p}n)^2/\hat{p}qn$
	TT	TM	TV							
0.5	478	224	254	2.41	5.8081	0.46358543	0.53641457	0.24867398	118.86	0.048865051
DELTAMETRINA										
0.09	502	235	267	-41.14	1,692.49	0.55009107	0.4499089	0.24749088	124.24	*13.62
FLUMETRINA										
0.01	572	316	256	20.88	435.97	0.51594747	0.48405253	0.24974568	142.85	3.05

\*Indica diferencia significativa

## V. DISCUSIÓN

En cepas de garrapatas *B. microplus* han sido reportados dos mecanismos de resistencia hacia los piretroides: El producido por la sustitución de la Phe →Ile en el S6 del dominio III del canal de sodio con un efecto *kdr* (He *et al.*, 1999; Miller *et al.*, 1999; Guerrero *et al.*, 2001), ocasionándole una modificación en la estructura del canal, que afecta el sitio de unión para las moléculas de los piretroides, y provocando en la garrapata la característica de resistencia por el mecanismo llamado insensibilidad del sitio blanco: Este es uno de los dos mecanismos que ocasionan una alta resistencia a los piretroides, de acuerdo a los estudios realizados en numerosas especies conocida como resistencia “Knockdown”. En un estudio realizado por Miller *et al.*, (1999) usando sinergistas encontraron patrones de resistencia de este tipo en las cepas San Felipe y Corrales, indicando un mecanismo de insensibilidad del sitio blanco.

El otro mecanismo de resistencia hacia los piretroides fue reportado en una cepa denominada Coatzacoalcos que mostró un mecanismo de sobreexpresión de una esterasa confirmado por análisis de Nothern. Esta cepa mostró una modificación de G →A en la posición 1120 y esta sustitución ocasiona un cambio del aminoácido, ácido aspártico a asparagina y crea un sitio de restricción Eco RI; induciendo un incremento de la hidrólisis de los piretroides (Hernández *et al.*, 2002).

La cepa RR utilizada en este estudio como la cepa resistente, fue presionada con permetrina y monitoreada con la prueba AS-PCR para detectar la mutación (Guerrero *et al.*, 2001), hasta obtener una frecuencia alélica del 100%. Sin embargo, a pesar que la cepa fue presionada con permetrina, la cual es clasificado como un piretroide tipo I; el patrón de resistencia desarrollado en esta cepa fue para todos los piretroides usados en este estudio (cipermetrina, deltametrina y flumetrina, piretroides tipo 2), demostrando con esto que la selección del alelo mutado del 100%, confiere resistencia a toda la clase de piretroides.

Estos resultados concuerdan a los reportados por Rosario-Cruz *et al.*, (2005) en Yucatán donde obtuvo correlaciones significativas entre la frecuencia del alelo resistente y la tasa de sobrevivencia hacia los mismos piretroides antes mencionados utilizando las mismas pruebas diagnósticas.

Además algunos autores mencionan que una de las particularidades que presenta este tipo de resistencia Knockdown, es que limita la efectividad de todos los piretroides y DDT, siendo esto de suma importancia a nivel de campo ya que una vez detectada, es complicado seguir utilizando a estos compuestos como un método de control químico para insectos (Soderlund y Knipple 2003, Dong, 2007).

La resistencia Kdr ha sido estrechamente relacionada con la resistencia a piretroides en *A. gambiae*, sin embargo, esta asociación no es aplicada a poblaciones sudanesas de *Anopheles arabiensis* (Brooke, 2008). Los resultados encontrados en este estudio, sugieren que una sola mutación puede producir resistencia a la familia de los piretroides, ya que la cepa RR mostró un 100% de sobrevivencia cuando se incrementaron las concentraciones de los piretroides usados, probablemente debido a la elevada frecuencia del genotipo homocigótico resistente, dando como consecuencia que la  $CL_{50}$  no pudiera ser calculada.

En México y Estados Unidos, se han realizado estudios en cepas de garrapatas *B. microplus* para conocer el modo de herencia de la resistencia a la flumetrina y amitraz, utilizando como prueba diagnóstica la prueba de paquete de larvas para evaluar la resistencia fenotípica en la progenie ( $F_1$ ), sin embargo, en estos estudios no fueron evaluados los genotipos de cada cepa.

Tapia *et al.*, (2003) en el trabajo que realizaron, reportan que la resistencia a la flumetrina se encuentra controlada por más de un gen, y al comparar las  $CL_{50}$  de las cruzas recíprocas RS y SR, las concentraciones fueron similares (0.004 y 0.0031  $\mu\text{g/g}$  respectivamente), no existiendo evidencia de efectos maternos ni ligamiento sexual en la resistencia a flumetrina. Los resultados obtenidos en esta investigación indican lo contrario, con respecto a los perfiles de resistencia de la cepa RS ( $\text{♂RR} \times \text{♀SS}$ ) demuestra que la flumetrina es controlada por un gen, ya



que esta cepa presentó para la flumetrina 100% de mortalidad y 100% para deltametrina, encontrando que la dominancia efectiva del nivel de mortalidad para ambos casos fue de cero ( $D_{ML}=0$ ), sugiriendo que la resistencia es heredada de una forma completamente recesiva para estos productos cuando el macho fue resistente; sin embargo, para la cipermetrina se observa que es parcialmente recesiva para esta misma cepa encontrando una dominancia efectiva de  $D_{ML}=0.169$ . En contraste, para la cepa en donde la hembra es resistente SR ( $\text{♂SS} \times \text{♀RR}$ ) la herencia de la resistencia para los tres piretroides tuvo un comportamiento parcialmente recesivo encontrándose valores en la dominancia efectiva para cipermetrina de  $D_{ML}=0.380$ ,  $D_{ML}=0.319$  para deltametrina y para flumetrina  $D_{ML}=0.258$ , por lo tanto, no se elimina la posibilidad de un efecto de la cepa materna, en donde la cepa resistente RR fue utilizada como madre, observándose además que en donde se utilizó a la hembra susceptible como madre la progenie mostró un fenotipo susceptible.

Similares resultados han sido encontrado en estudios realizados en otros insectos, como el reportado por Mebrahtu *et al.*, (1997) en *Aedes aegypti* en un estudio de herencia de resistencia a permetrina.

Así mismo, Li *et al.*, (2005) en una investigación que realizaron para conocer el modo de herencia al amitraz en la garrapata *B. microplus*, observaron que las  $CL_{50}$  de las cruzas recíprocas RS y SR fueron diferentes significativamente (0.0089 y 0.0219% respectivamente) encontrando un factor de resistencia de 3.7 y 9.1, por lo que la diferencia entre las  $CL_{50}$  de las larvas  $F_1$  de las cruzas recíprocas, indican que existe un efecto materno significativo a la resistencia al amitraz y la crusa en donde tuvieron como madre una hembra resistente, fue significativamente más elevada su  $CL_{50}$  que en la crusa en donde como madre estaba una hembra susceptible. Sin embargo, en otro trabajo realizado nuevamente por Li *et al.*, (2008), determinaron que la resistencia a la permetrina en la cepa de garrapata *Boophilus microplus* "Santa Luiza" fue heredada como una característica incompletamente recesiva, involucrando un solo gen mayor autosomal; sin descartar la posibilidad que otros genes menores podrían también

estar presentes y tener algún efecto en la expresión de la resistencia del gen mayor. En este estudio los valores de la  $CL_{50}$  de las cruzas recíprocas fueron de 0.0883 y 0.1320% con un factor de resistencia de 2 y 3 respectivamente, no encontrando diferencias significativas entre estos valores.

En la presente investigación para realizar los análisis de dominancia no se pudieron utilizar las mismas fórmulas, que las empleadas en los trabajos anteriormente citados, debido a que en estos experimentos utilizaron las  $CL_{50}$  de la cepa resistente. En la presente investigación al realizar los análisis toxicológicos no pudo determinarse la  $CL_{50}$  de la cepa homocigótica resistente. Es importante mencionar que en el presente estudio se utilizó la CD ( $2 \times CL_{99.9}$ ), ya que esta concentración es usada en la prueba toxicológica autorizada actualmente por la FAO, para diagnosticar una cepa resistente de una susceptible fenotípicamente.

Esta concentración a pesar de ser una dosis elevada, ha sido evaluada en estudios previos, y a demostrado tener correlaciones positivas con la frecuencia del alelo R (alelo mutado) (Rosario-Cruz *et al.*, 2005).

Miller *et al.*, (1999) reportan que la magnitud de la resistencia, es menor en poblaciones de *B. microplus* en la que se encuentran involucradas las esterases como principal mecanismo de resistencia a los piretroides, que en las poblaciones en donde el mecanismo responsable de la resistencia es la modificación del canal de sodio. Esto concuerda con lo reportado en la presente investigación, al no poder determinar la  $CL_{50}$  de la cepa RR que presentaba el 100% del alelo resistente.

Por otra parte, Roush y Miller (1986) mencionan que, el análisis de la concentración-mortalidad ( $CL_{50}$ ) no siempre es exitosa en distinguir un fenotipo resistente de uno susceptible, el cual limita la posibilidad de hacer decisiones en el manejo de la resistencia efectiva. Las concentraciones discriminantes son utilizadas para definir el estatus de resistencia, son menos laboriosas en el análisis y son las más utilizadas, aunque no necesariamente mejoran la calidad del manejo de la resistencia (McKenzie, 2000).

Para calcular la Dominancia efectiva (DML) de las cepas estudiadas en esta investigación, se utilizó la sugerida por Bourguet *et al.*, (2000) esta fórmula propone ser mejor, que aquellas en donde se aplica la CL<sub>50</sub>. Esto se debe a que las fórmulas en donde se utiliza la CL<sub>50</sub>, contribuyen poco para que la resistencia pueda ser retrasada a nivel práctico, ya que no es recomendable utilizar dosis que eliminen a los heterocigotos que servirían para retrasar la resistencia, si estos sobrevivieran.

Sin embargo, cuando son utilizadas diferentes concentraciones, se observa que la resistencia a los piretroides se encuentra sujeta a la concentración de la dosis utilizada, y a concentraciones bajas el comportamiento de la sobrevivencia será parcialmente dominante y a concentraciones altas la resistencia se comportará parcialmente recesivo, estos datos son importantes a nivel de campo, ya que al utilizarse la dosis recomendada para la aplicación de los ixodicidas, al no ser efectivos para controlar a los insectos, se va incrementando la concentración del producto recomendada por el fabricante para que nuevamente pueda ser utilizado y sirva para controlar a los insectos. Esta práctica es ampliamente aplicada a nivel de campo, pero como se mencionó anteriormente, al incrementarse las concentraciones se va a favorecer que la resistencia hacia estos productos, se herede de una forma dominante o parcialmente dominante (Bourguet *et al.*, 2000).

Basados en la respuesta toxicológica de las larvas de *B. microplus* hacia la concentración discriminante para cada acaricida y la frecuencia del alelo R de cada cepa se observó en primer lugar, que la presión de selección con permetrina para encontrar la mutación del canal de sodio en la cepa RR parece ser la responsable de la resistencia a los piretroides. Segundo que la cepa RS (♂RR X ♀SS) presenta ser susceptible a deltametrina y flumetrina (100% mortalidad para ambos) probablemente debido a que en la característica de resistencia se encuentre involucrado un solo gen, pero no a cipermetrina (83.23%) en donde probablemente otros mecanismo pudieran estar involucrados; tercero, se observa que la cepa ♂SS X ♀RR (derivada de un macho susceptible X hembra resistente)

la resistencia es heredada en una condición parcialmente recesiva para todos los piretroides, por las tasas de sobrevivencia obtenidas a la concentración discriminante con 37.65%, 31.85% y 25.74% para cipermetrina, deltametrina y flumetrina respectivamente; mostrando un patrón de herencia diferente cuando la hembra es resistente, probablemente debido a un mecanismo alternativo de herencia de resistencia por la hembra resistente.

No hay una explicación biológica fácil acerca de las diferencias estadísticas entre la  $CL_{50}$  obtenida para todos los piretroides en las cepas SS, RR, RS y SR ( $p < 0.05$ ), así mismo no hay diferencias entre las tasas de mortalidad (respuesta fenotípica) a flumetrina y deltametrina entre la cepa SS y RS ( $p > 0.05$ ) al utilizar la CD, mostrando un fenotipo susceptible para ambos pesticidas y probablemente un único mecanismo de resistencia. No hay evidencias para probar que solo un mecanismo de resistencia está involucrado en los datos obtenidos toxicológicamente; sin embargo hay una diferencia entre los índices de resistencia, indicando la participación de un mecanismo de resistencia alternativo, que podría explicar los índices de resistencia más elevados en la cepa RS, sin descartarse la presencia de otras mutaciones en el gen que codifica para el canal de sodio, mecanismos metabólicos o combinaciones entre estos.

Basados en los estudios genéticos realizados por Mendel, las cruzas recíprocas entre las cepas RR y SS producirán una progenie heterocigótica (RS y SR) mostrando un fenotipo susceptible cuando la condición de resistencia es debida a un gen recesivo autosómico. En nuestro estudio esta prueba es válida solo en el total de la progenie, debido a que no existe diferencia entre la progenie heterocigota (RS+SR, datos no mostrados) y la cepa susceptible, por lo que las tasas de mortalidad sugieren un modo de herencia recesivo. Sin embargo diferencias entre la frecuencia de alelos R de la cepa RS y SR fueron encontradas, indicando diferencias en el modo de herencias de ambas cepas RS y SR.

Los resultados toxicológicos obtenidos a la CD para cipermetrina en la cepa en donde se utilizó la RS retrocruzada con la cepas susceptible y resistente, presentó un patrón diferente de mortalidad que la cepa SR retrocruzada con susceptible y resistente, encontrándose diferencias significativas entre ellas ( $p < 0.05$ ). Estos resultados son difíciles de explicar ya que nuevamente en las retrocruzas en donde se utilizó la cepa en donde la hembra es resistente (SR) presenta mayores porcentajes de sobrevivencia, en comparación a donde se utilizó un macho resistente (RS): Sin embargo al analizar la frecuencia de alelos; también puede observarse que en la cepa SR retrocruzada con SS y RR, la frecuencia de alelos R fue mayor que la cepa RS al retrocruzarla con las cepas parentales.

En los resultados obtenidos en la segunda parte del experimento se realizó un análisis de correlación entre la frecuencia del alelo R determinado en las cepas estudiadas y el porcentaje de sobrevivencia a cipermetrina, deltametrina y flumetrina. Los resultados de estos análisis indican que existe una correlación significativa ( $p < 0.01$ ) y que la resistencia a los piretroides en las cepas en este estudio está fuertemente ligada con la mutación en el canal de sodio. Estos resultados obtenidos, concuerdan a los reportados por Rosario-Cruz *et al.*, (2005) quienes realizaron un estudio en cepas de campo del estado de Yucatán, en donde analizaron la respuesta fenotípica larval (PPL) a los piretroides de nueve poblaciones y en donde observaron correlaciones positivas entre la frecuencia del alelo R en el canal de sodio detectada por la prueba de AS-PCR y la sobrevivencia larval. Las correlaciones encontradas en estos estudios fueron para cipermetrina  $r^2 = 0.856$ ;  $r^2 = 0.887$  para deltametrina y  $r^2 = 0.849$  para flumetrina. Estas correlaciones reportadas son muy similares a las calculadas en este estudio. Es importante mencionar, que a pesar que los estudios fueron diseñados completamente en condiciones diferentes (campo y laboratorio), puede notarse que el comportamiento fue similar para ambos casos, y resaltan la importancia del alelo R hacia la resistencia a los piretroides.

Correlaciones significativas entre el alelo mutado y las concentraciones a los piretroides ha sido encontrada en otros insectos. Song *et al.*, (2007) trabajando con *C. pipiens pallens* observaron correlaciones entre la frecuencia alelica y la CL<sub>50</sub> estimada a deltametrina ( $r^2=0.747$ ), betacipermetrina ( $r^2= 0.967$ ) y esbioaletrin ( $r^2=0.947$ ). Por otra parte, Kwon *et al.*, (2004) encontraron que en *P. xylostella* la presencia de la mutación T929I en el canal de sodio tuvo una correlación significativa con los niveles de resistencia a cipermetrina ( $r^2=0.912$ ) y fenvalerato ( $r^2=0.810$ ).

Las correlaciones encontradas entre el genotipo RR y la sobrevivencia observada a cipermetrina, deltametrina y flumetrina, indican una fuerte asociación (correlación significativa  $p<0.01$ ) entre la expresión del fenotipo resistente en las cepas estudiadas y el genotipo (RR). Fuertes evidencias de correlación han demostrado los resultados encontrados entre la expresión del fenotipo resistente (PPL) y el genotipo con mutaciones en *A. gambiae* del oeste (Martinez-Torres *et al.*, 1998). Sin embargo, en otro estudio realizado en *A. arabiensis* de Sudán resistentes al DDT, se observó que la expresión del fenotipo resistente no presentó correlaciones con la mutación L1014F localizada en el gen que codifica para el canal de sodio (Matambo *et al.*, 2007). Este mismo comportamiento fue reportado por Xu *et al.*, (2006) en *C. quinquefasciatus* quienes no encontraron una correlación entre el genotipo alélico *Kdr* y la resistencia o susceptibilidad a los insecticidas.

En los resultados obtenidos respecto a la hipótesis de un solo gen utilizando la CD, se observa que para la cipermetrina y flumetrina las  $J^2$  no son significativas, lo cual nos dice que no hay evidencia suficiente para rechazar que se trata de una variable monogénica. Es decir, que el alelo R que se está analizando y monitoreando, es el causante de la resistencia a los piretroides en las cepas estudiadas. Sin embargo, para la deltametrina esto no sucede de igual forma, ya que la  $J^2$  fue significativa indicando que la resistencia hacia este producto podría ser poligénica. Estos resultados obtenidos en la respuesta fenotípica hacia la deltametrina son difíciles de explicar, ya que en estudios previos ha sido reportado

que la concentración discriminante permite distinguir el control de un solo gen del poligenético (McKenzie, 2000), y este comportamiento fue demostrado para la cipermetrina y flumetrina, pero no para deltametrina, por lo que, quizás otros factores inherentes pudieran estar influyendo en la respuesta a la deltametrina como algunos factores operacionales al momento de realizar la prueba, o que exista otro mecanismo que ayude a detoxificar a la deltametrina.

La dominancia efectiva calculada para las retrocruzas indica que, dado su comportamiento a la sobrevivencia, la cepa R4 (SRXRR) fue parcialmente dominante y también puede observarse que fue la cepa que menos mortalidad presentó en comparación con la cepa R2 (RSXRR). Las cepas que fueron retrocruzas con la cepa susceptibles presentaron mortalidades entre el 60 y el 80% y el comportamiento de la Dominancia efectiva fue parcialmente recesivo. Estos resultados refuerzan la importancia del concepto de refugio de mantener alelos susceptibles, ya que ellos pueden ayudar a diluir la resistencia a piretroides cuando la presión de selección es eliminada. Los resultados obtenidos en esta investigación demuestran que una cepa altamente resistente a los piretroides cuando es cruzada con una cepa susceptible, se observa que la resistencia decrece significativamente.

En lo que respecta a los índices de resistencia, la cepa R1 (RSXSS) de acuerdo a la clasificación de la FAO (1984) fenotípicamente es considerada una cepa susceptible ya que presentó índices de resistencia de 2.86, 2.39 y 2.96 para cipermetrina, deltametrina y flumetrina respectivamente; la FAO reporta que una cepa es considerada como susceptible cuando sus índices de resistencia se encuentran por debajo de 3. Sin embargo para las otras cepas R2, R3 y R4 son consideradas como resistentes ya que sus índices de resistencia estuvieron por encima de 5. Estos resultados fortalecen la importancia del concepto de refugio para mantener alelos susceptibles, ya que ellos pueden ayudar a diluir la resistencia piretroides cuando la presión de selección es eliminada.

Este es el primer estudio genético de *B. microplus* basado en el monitoreo de una mutación asociada con el fenómeno de resistencia. Es también relevante el uso de conocimientos para recuperar la susceptibilidad a los piretroides y mejorar los métodos de control basados en el uso de diagnóstico molecular, para prevenir la presión de selección de fenotipos resistentes, y promover la dilución del alelo mutado dentro del grupo de genes presentes en la población. Además la predicción de la resistencia a los piretroides basados en la frecuencia genotípica, dentro de una población resistente, también tendrá un impacto en el uso racional y rotacional de los insecticidas y de esta forma se podrán mejorar los programas de control.



## VI. CONCLUSIONES

- Los resultados obtenidos al calcular la dominancia efectiva en las cruzas recíprocas y retrocruzas indican que la resistencia a los piretroides es heredada de una forma parcialmente recesiva (con tendencia a la recesividad).
- La mutación localizada en el S6 del dominio III en el canal de sodio de *B. microplus* se encuentra asociada con la resistencia fenotípica a cipermetrina, deltametrina y flumetrina en las cepas estudiadas, al encontrarse una correlación significativa entre la sobrevivencia larval y la frecuencia del alelo R, lo cual sustenta el carácter monogénico de la resistencia a la familia de los piretroides, debida a la presencia de la mutación.
- La presencia de la mutación en el canal de sodio, es directamente proporcional con la tasa de sobrevivencia por lo cual es una limitante para el uso de los piretroides como método de control, ya que confiere resistencia cruzada a todos los piretroides utilizados como ixodicidas en México y puede ser seleccionada por el uso de cualquiera de los pesticidas analizados en este estudio.
- Los índices de resistencia obtenidos al cruzar y retrocruzar con la cepa parental SS decrecen significativamente, demostrando con esto la importancia de mantener una población en refugio (no tratada) que ayude a mantener alelos susceptibles en la población, para diluir la resistencia a los piretroides.
- Con base en los resultados obtenidos a partir de las retrocruzas de las líneas obtenidas en la F1 con las líneas parentales (SS y RR), se demuestra que la resistencia a los piretroides, esta condicionada por la presencia de la mutación y que esta alteración en el gen del canal de sodio se hereda de manera autosómica recesiva ( $p < 0.01$ ), lo cual se demuestra por los altos

coeficientes de correlación obtenidos entre la frecuencia de genotipos RR y la sobrevivencia larval ( $r^2=0.93$ ;  $r^2=0.93$  y  $0.89$  para la cipermetrina, deltametrina y flumetrina respectivamente).

## VII. REFERENCIAS

Adams R (1995) Veterinary pharmacology and therapeutics. 7a ed. Iowa State University Press/Ames. pp.923-925.

Aguirre JA (1993) Resistencia de las garrapatas hacia los productos ixodicidas. Campaña contra la garrapata. Programa de acreditación de Médicos Veterinarios Zootecnistas. México.D.F. 2:149-154.

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson DJ (2002) Biología molecular de la célula. 3era ed. Ediciones Omega. pp 565-584.

Bisset JA (2002) Uso correcto de insecticidas: control de la resistencia. Rev Cubana Med Trop 54(3):202-219.

Bloomquist JR (1996) Ion channels as targets for insecticides. Ann Rev Entomol 41:163-190.

Brogdon WG, McAllister JC (1998) Insecticide resistance and vector control. Emerg Infect Dis 4(4):605-612.

Brooke BD (2008) *Kdr* can a single mutation produce an entire insecticide resistance phenotype?. Trans R Soc Trop Med Hyg 102:524-525.

Bourguet D, Genissel A, Raymond M (2000) Insecticide resistance and dominance levels. J Econ Entomol 93(6):1588-1595.

Bouvier JC, Bues R, Boivin T, Boudinhon L, Beslay D, Sauphanor B (2001) Deltamethrin resistance in the codling moth (Lepidoptera: Tortricidae): inheritance and number of genes involved. Heredity 87:456-462.

Brossard M, Wikel S. K (2004) Tick immunobiology. Parasitology 129:161-176.

Camino LM (1991) Manejo y modificación del hábitat en el control de las garrapatas. En: II Seminario internacional de parasitología animal. Garrapatas y enfermedades que transmiten. Morelos, México 9 -11 octubre pp. 66-71.

Cardozo H, Franchi M (1996) Garrapata: Epidemiología y control de *Boophilus microplus*. En A Nari, C Field. Enfermedades parasitarias de importancia económica en bovinos. Bases epidemiológicas para su prevención y control. Uruguay: Hemisferio Sur. pp. 369-407.

Casida EJ (1980) Pyrethrum flowers and pyrethroid insecticides. Environ Health Perspect 34:189-202.

Castellanos HJL (1993) El género *Boophilus*. En campaña contra la garrapata. Instructivo técnico SAGAR-CNMVZ. México D.F. pp. 45-48.

Catterall WA (2000) From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. Neuron 26:13-25.

Catterall WA (2001) A 3D view of sodium channel. Nature 409:988-991.

Catterall WA, Goldin A, Waxman S (2003) International union of pharmacology XXXIX. Compendium of voltage-gated ion channels: sodium channels. Pharmacol Rev 55:575-578.

Cen AJ, Rodríguez VR, Domínguez AJ, Wagner G (1998) Studies on the effect on infection by *Babesia sp.* on oviposition of *Boophilus microplus* engorged females naturally infected in the Mexican tropics. Vet Parasitol 78:253-257.

Collins PJ, Dagnish GJ, Bengston M, Lambkin TM, Pavic H (2002) Genetics of resistance to phospine in *Rhyzopherta dominica* (Coleoptera: Bostrichidae). J Econ Entomol 95(4):862-869.

Davies TGE, Field LM, Usherwood PNR, Williamson MS (2007) DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels. IUBMB Life 59:151-162.

Dauterman WC, Hodgson E (1993). Biochemistry of insects. Academic Press New York. 541-577.

Denac H, Mevissen M, Scholtysik G, Schmiedeberg's N (2000) Structure function and pharmacology of voltage.gated sodium channels. Arch Pharmacol 362:453-479.

Dong K (1997) A single amino acid change in the para sodium channel protein is associated with knockdown-resistance (kdr) to pyrethroid insecticides in the *German cockroach*. Insect Biochem Mol Biol 27: 93-100.

Dong K (2007) Insect sodium channels and insecticide resistance. Invert Neurosci 7:17-30.

Encinas GA, Oleaga PA, Pérez SR (1999) Garrapatas duras. En: CM Cordero, VA Rojo, Ed. Parasitología Veterinaria. España: McGraw-Hill-Interamericana pp. 420-429.

Elliot M (1976) Properties and applications of pyrethroids. Environ Health Perspect. 14: 3-13.

Field LM, Williamson MS (2001) Wider implications of new discoveries on the molecular basis of insecticide resistance. Research report 2000-2001. Institute of Arable Crops. pp 1-5

Food and Agriculture Organization of the United States (FAO) (1984). Ticks and tick-borne diseases control. A practical field manual. FAO Vol.I-II. pp 621.

Food and Agriculture Organization of the United States (FAO) (2001). Servicio nacional de sanidad, inocuidad y calidad agroalimentaria. Centro nacional de servicios de constatación en salud animal. Curso-taller sobre diagnóstico de resistencia a ixodidas en garrapatas *Boophilus microplus*. Del 26 al 28 de septiembre. Juiltepec, Morelos. México. pp. 4: 35-37.

Fragoso SH, Ortiz EM, Soberanes CN, Santamaría VM, Ortíz NA (1995). Epidemiología de la resistencia a ixodidas en garrapatas *Boophilus microplus*, en la República Mexicana. En: III Seminario internacional de parasitología animal.

Resistencia y control en garrapatas y moscas de importancia veterinaria. Acapulco Gro. Méx. 11-13 Oct pp 45-57.

Fragoso SH, Ortiz EM, De Labra V, Ortiz NN, Rodríguez M, Redondo M, De la Fuente J, Hernández PV (1999) Evaluación de la vacuna contra la garrapata Bm86 (Gavac) para el control de *Boophilus microplus*. En: IV Seminario internacional de parasitología. Control de la resistencia en garrapatas y moscas de importancia veterinaria y enfermedades que transmiten. Puerto Vallarta, Jalisco, México 20-22 Octubre pp. 141-148.

Fragoso SH, Soberanes CN (2001) Control de la resistencia a los ixodicidas a la luz de los conocimientos actuales. En: XXV Congreso Nacional de Buiatria. Veracruz, Veracruz, México 16-18 Agosto pp. 40-48. Asociación Mexicana de Médicos Especialistas en Bovinos, A.C.

Goldin AL (2002) Evolution of voltage-gated Na<sup>+</sup> channels. J Exp Biol 205: 575-584.

Guerrero FD, Jamroz RC, Kammlah DM, Kunz SE (1997) Toxicological and molecular characterization of pyrethroid-resistant horn flies *Haematobia irritans*, identification of kdr and super-kdr point mutation. Insect Biochem Mol Biol 27:745-755.

Guerrero FD, Kunz SE, Kammlah (1997) Screening of *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae) populations for pyrethroid resistance-associated sodium channel gene mutations by using a polymerase chain reaction assays. J Med Entomol 35:710-715.

Guerrero FD, Davey RB, Miller RJ (2001) Use of an allele-specific polymerase chain reaction assay to genotype pyrethroid resistant strains of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). J Med Entomol 38 (1):44-50.

Guerrero FD, Pruet D (2003) Status and future prospects of molecular diagnosis of acaricide resistance in *Boophilus microplus*. Trends Entomol 3:97-103.

Halliday WR, Georghiou GP (1985) Inheritance of resistance to permethrin and DDT in the southern house mosquito (Diptera Culicidae). J Econ Entomol 78:762-767.

Harris RL, George JE, Ahrens EH, Davey RB, Bazan HO (1988) Selection for resistance to coumaphos in a strain of southern cattle tick (Acari:Ixodidae). J Econ Entomol 81:545-548.

He H, Chen AC, Davey RB, Ivie GW, George JE (1999) Identification of a point mutation in the para-type sodium channel gene from a pyrethroid-resistant cattle tick. Biochem Biophys Res Commun 261:558-561.

Hemingway J, Hawkes NJ, McCarroll RH (2004) The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. Insect Biochem Mol Biol 34:653-665.

Hernandez OR, Guerrero FD, George JE, Wagner GG (2002) Allele frequency and gene expression of a putative carboxylesterase encoding gene in a pyrethroid resistant strain of the tick *Boophilus microplus*. Insect Biochem Mol Biol 32:1009-1016.

Jamroz RC, Guerrero FD, Kammlah DM, Kunz SE (1998) Role of the *Kdr* and *super-kdr* sodium channel mutations in pyrethroid resistance: Correlation of allelic frequency to resistance level in wild and laboratory populations of horn flies (*Haematobia irriyans*). Insect Biochem Mol Biol 28:1031-1037.

Jamroz RC, Guerrero FD, Pruett JH, Oehler DD, Miller RJ (2000) Molecular and biochemical survey of acaricide resistance mechanisms in larvae from Mexican strains of the southern cattle tick, *Boophilus microplus*. J Insect Physiol 46:685-695.

Jongejan F, Uilenberg G (2004) The global importance of ticks. Parasitology 129:S3-S14.

Kwon HD, Choi RB, Park HM, Lee SH, Miyata T, Clark M, Lee SH (2004) Knockdown resistance allele frequency in field populations of *Plutella xylostella* in Korea. *Pestic Biochem Physiol* 80: 21–30

LeOra Software 2002-2007. A user's Guide to probit or Logit Analysis. Polo plus Ver. 1

Lee D, Yoonseong P, Brown TM, Adams ME (1999) Altered properties of neuronal sodium channels associated with genetic resistance to pyrethroids. *Mol Pharmacol* 55:584-593.

Lee HS, Yoon SK, Williamson SM, Goodson JS, Lee TM, Edman, DJ, Devonshire LA, Clark MJ (2000) Molecular analysis of kdr-like resistance in permethrin-resistant strains of head lice, *Pediculus capitis*. *Pestic Biochem Physiol* 66:130-143.

Li YA, Davey BR, Miller JR, George J (2005) Mode of inheritance of amitraz resistance in a Brazilian strain of the southern cattle tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Exp Appl Acarol* 37: 183-198.

Li YA, Davey BR, Miller JR, Guerrero FD, George J (2008) Genetics and mechanisms of a permethrin resistance in the Santa Luiza strain of *Boophilus microplus* (Acari:Ixodidae). *J Med Entomol* 45(3): 427-438.

Liu Z, Valles SM, Dong K (2000) Novel point mutation in the *German cockroach* para sodium channel gene are associated with knockdown resistance (kdr) to pyrethroid insecticides. *Insect Biochem Mol Biol* 30:991-997.

Liu Z, Chung I, Dong K (2001) Alternative splicing of the *BSC1* gene generates tissue-specific isoforms in the German cockroach. *Insect Biochem Mol Biol* 31:703-713.

Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott M P, Zipursky SL, Darnell J (2006) *Molecular cell biology*. Fifth edition. Freeman and Company. New York. pp. 277-281.



Matambo TS, Abdalla H, Brooke D, koekemoer LL, Mnzava A, Hunt RH, Coetzee M (2007) Insecticide resistance in the malarial mosquito *Anopheles arabiensis* and association with the *kdr* mutation. *Med Vet Entomol* 21:97-102.

Mathews CK, Van Holde KE, Ahern KG (2004) *Bioquímica*. 3era. Edición. Pearson Addison Wesley España.

Martínez-Torres D, Chandre F, Williamson MS, Darriet F, Bergé JB, Devonshire AL, Guillet P, Pasteur N, Pauron D (1998) Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (*kdr*) in the major malaria vector *Anopheles gambiae*. *Insect Mol Biol* 7:179-184.

McKenzie JA (2000) The character or the variation: the genetic analysis of the insecticide-resistance phenotype. [Bull Entomol Res](#) 90:3-7.

Mebrahtu YB, Norem J, Taylor M (1997) Inheritance of larval resistance to permethrin in *Aedes aegypti* and association with sex ratio distortion and life history variation. *Am J Trop Med Hyg* 56:456-465.

Miller RJ, Davey RB, George JE (1999) Characterization of pyrethroid resistance and susceptibility to coumaphos in Mexican *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol* 36:533-538.

Miller TA (1988) Mechanisms of resistance to pyrethroid insecticides. *Parasitol Today* 4:509-512.

Miyamoto J (1976) Degradation, metabolism and toxicity of synthetic pyrethroids. *Environ Health Perspect* 14:15-28.

Miyazaki M, Ohyama K, Dunlap DY, Matsumura F (1996) Cloning and sequencing of the para-type sodium channel gene from susceptible and *kdr*-resistant *German cockroaches* (*Blattella germanica*) and *house fly* (*Musca domestica*). *Mol Gen Genet* 252: 61-68.

Narahashi T, Ginsburg KS, Nagata K, Song JH, Tatebayachi H (1998) Ion channels as targets for insecticides. *Neuro Toxicol* 19(4-5): 581-590.

Narahashi T, Zhao X, Ikeda T, Nagata K, Yeh JZ (2007) Differential actions of insecticides on target sites: basis for selective toxicity. *Hum Exp Toxicol* 26:361-366.

Nolan J (1985) Mechanism of resistance to chemicals in arthropod parasites of veterinary importance. *Vet Parasitol* 18:155-156.

Núñez JL, Muñoz CM, Molteado LH (1982) *Boophilus microplus*: La garrapata común del ganado vacuno. Ed. Hemisferio Sur. Argentina. pp. 84.

Oakeshott JG, Horne I, Sutherland TD, Russell R (2003) The genomics of insecticide resistance. *Genome Biol* 4(1):202-204.

O'reilly OA, Khambay BP, Williamson SM, Field ML, Wallace AB, Davies GT, (2006) Modelling insecticide-binding sites in the voltage-gated sodium channel. *J Biochem* 396:255-263.

Ortiz EM, Santamaría VM, Ortiz NA, Soberanes CN, Osorio MJ, Franco BR, Martínez IF, Quezada DR, Frago SH (1995). Caracterización de la resistencia de *B. microplus* a ixodicidas en México. Memorias III Seminario Internacional de Parasitología animal. "Resistencia y control de garrapatas y moscas de importancia veterinaria" SAGAR-CANIFARMA-FAO-IICA-INIFAP.

Pasay C, Arlian L, Morgan M, Vyszynski-Morher D, Rose A, Holt D, Walton S, McCarthy J (2008) High-resolution melt analysis for the detection of a mutation associated with permethrin resistance in a population of scabies mites. *Med Vet Entomol* 22:82–88

Raymond-Delpech V, Matsuda K, Sattelle BM, Rauh JJ, Sattelle DB (2007) Ion channels: molecular targets of neuroactive insecticides. *Invert Neurosci* 5:119-133.

Rodriguez-Vivas RI, Rivas AL, Chowell G, Frago SH, Rosario CR, Garcia VZ, Smith SD, Williams JJ, Schwager SJ (2007) Spatial distribution of acaricide profiles (*Boophilus microplus* strains susceptible or resistant to acaricides) in southeastern Mexico. *Vet Parasitol* 146: 158-166.

Rosario-Cruz R, Guerrero FD, Miller RJ, Rodríguez-Vivas RI, Domínguez-García D I, Cornel AJ, Hernández-Ortiz R, George EJ (2005) Roles played by esterase activity and by a sodium channel mutation involved in pyrethroid resistance in populations of *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acari: Ixodidae) collected from Yucatan, Mexico. *J Med Entomol* 42(6):1020-1025.

Roush RT, Miller GL (1986) Considerations for design of insecticide resistance monitoring programmes. *J Econ Entomol* 79:293-298.

Roush RT, Combs LR, Randolph CT, Macdonald J, Hawkins JA (1986b) Inheritance and effective dominance of pyrethroid resistance in the horn fly (Diptera Muscidae). *J Econ Entomol* 79:178-1182

Santamaría VM, Soberanes CN, Ortiz NH, Fragoso SH (1999) Análisis de la situación actual mediante el monitoreo de susceptibilidad a Ixodidas en *Boophilus microplus* de 1993 a 1999 y medidas preventivas para retardar la resistencia al amitraz en México. En: IV Seminario Internacional de Parasitología Animal. Control de la resistencia en garrapatas y moscas de importancia veterinaria y enfermedades que transmiten. Puerto Vallarta, Jalisco México 20-22 Octubre pp. 103-112.

Salkoff L, Butler A, Wei A, Scavarda N, Giffen K, Ifune C, Goodman R, Mandel G (1987) Genomic organization and deduced amino acid sequence of a putative sodium channel gene in *Drosophila*. *Science* 237:744-748.

SAS Software Systems for Windows Version Eight.

Schuler TH, Martínez-Torres D, Thompson AJ, Denholm I, Devonshire AL, Duce IR, Williamson MS (1998) Toxicological electrophysiological and molecular characterization of knockdown resistance to pyrethroid insecticides in the diamondbackmoth, *Plutella xylostella* (L). *Pestic Biochem Physiol* 59:169-192.

Shafer T, Meyer DA, Crofton KM (2005) Developmental neurotoxicity of pyrethroid insecticides: Critical review and future research needs. *Environ Health Perspect* 13 (2):123-136.

Soberanes CN, Santamaría VM, Fragoso SH, García VZ (2002) Primer caso de resistencia al amitraz en la garrapata del ganado *B. microplus* en México. *Téc Pec Méx* 40 (1):81-92.

Soderlund DM, Bloomquist JR (1989) Neurotoxic actions of pyrethroid insecticides. *Annu Rev Entomol* 34:77-96.

Soderlund DM, Knipple DC (2003) The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticide. *Insect Biochem Mol Biol* 33: 563-577.

Soderlund DM (2008) Pyrethroids, Knockdown resistance and sodium channels. *Pest Manag Sci* 64:610-616.

Sokal RR, Rohlf (1981). *Biometry*. 2ed. Freeman, San Francisco.

Solís SS (1986) Ecología de garrapatas en México. Seminario Internacional de Parasitología Animal. AMPAVE-SARH. Cuernavaca, Morelos, México pp. 250-263.

Solís SS (1991) Ecología de las garrapatas *Boophilus*: Perspectivas de un panorama. II Seminario Internacional de Parasitología Animal. Garrapatas y enfermedades que transmiten. Morelos, México 9-11 Octubre pp. 19-30.

Solorio JL, Rodríguez VRI (1997) Epidemiología de la babesiosis bovina I. Componentes epidemiológicos. *Rev Biomed* 8:37-47.

Song F, Cao X, Zhao T, Dong Y, Lu B (2007) Pyrethroid resistance and distribution of kdr allele in *Culex pipiens pallens* in north China. *Int J of Pest Manag* 53(1): 25-34.

SPSS. Ver. 13 Paquete estadístico para Windows.

Stone BF (1972) The genetics of resistance by ticks to acaricides. *Aust Vet J* 48:345-350.

Stone BF, Youlton NJ (1982) Inheritance of resistance to chlorpyrifos in the Mt Alford strain and to diazinon in the gracemera strain of the cattle tick (*Boophilus microplus*). *Aust J Biol Sci* 35:427-440.

Stone BF, Haydock P (1962) A method for measuring the acaricide susceptibility of the cattle *B. microplus*. [Bull Entomol Res](#) 53: 563- 67.

Tabashnik BE, Schwartz JM, Finson N, Johnson MW (1992) Inheritance of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *J Econ Entomol* 85:1046-1055.

Tapia-Pérez G, García-Vázquez Z, Montaldo H, George JE (2003) Inheritance of resistance to flumethrin in the Mexican aldama strain of cattle tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Exp App Acarol* 31: 135-149.

Tan J, Liu Z, Wang R, Huang ZY, Chen AC, Gurevitz M, Dong K (2005) Identification of amino acid residues in the insects sodium channel critical for pyrethroid binding. *Mol Pharmacol* 67:513-522.

Vijverber HP, van den Bercken J (1990). Neurotoxicological effects and the mode of action of pyrethroid insecticides. *Crit Rev Toxicol* 21(2):105-126.

Wondji CS, Priyanka De Silva WAP, Hemingway J, Ranson H, Parakrama Karunaratne SHP (2008) Characterization of knockdown resistance in DDT- and pyrethroid-resistant *Culex quinquefasciatus* populations from Sri Lanka. *Trop Med Int Health* 13(4):548-555.

Xu Q, Wang H, Zhang L, Liu N (2006) Kdr allelic variation in pyrethroid resistant mosquitoes, *Culex quinquefasciatus* (S.). *Biochem Biophys Res Commun* 345(2): 774-780.

Yamagishi T, Li RA, Hsu K, Marbán E, Tomaselli GF (2007) Molecular architecture of the voltage-dependent Na channel: Functional evidence for  $\alpha$  helices in the pore. *J Gen Physiol* 118: 171-181.

Yu FH, Catterall W A (2003) Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome Biol* 4:207-209

Zhao Y, Park Y, Adams ME (2000) Functional and Evolutionary consequences of pyrethroid resistance mutations in S6 transmembrane segments of a voltage-gated sodium channel. *Biochem Biophys Res Commun* 278:516-521.

Zhiqi L, Valles SM, Dong K (2000) Novel point mutations in the *German cockroach para* sodium channel gene are associated with knockdown resistance (kdr) to pyrethroid insecticides. *Insect Biochem Mol Biol* 30:991-997.

Zhou W, Chung I, Liu Z, Goldin A, Dong K (2004) A voltage gated calcium-selected channel encoded by a sodium channel-like gene. *Neuron* 42:101-112.