

01694



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y  
DE LA SALUD ANIMAL

UN MODELO PARA PREDECIR EL TIEMPO QUE  
TARDA PARA DESARROLLARSE LA  
RESISTENCIA DE LAS GARRAPATAS *Boophilus*  
*microplus* A LOS ACARICIDAS

## TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:  
GRACIELA GUADALUPE TAPIA PÉREZ

TUTOR:  
ZEFERINO GARCÍA VÁZQUEZ  
COMITÉ TUTORAL:  
HUGO MONTALDO VALDENEGRO  
JOHN GEORGE



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.

## DEDICATORIAS.

A **Bárbara** con quien comparto sueños, éxitos, desafíos, recuerdos y alegrías. Escritora en ciernes, sensible y fuerte, inteligente, simpática e independiente que busca y encontrará su lugar en el mundo persiguiendo y alcanzando sus sueños; y

**Carlos** a quien muchas veces he llamado Maestro, alma antigua y sabia de quien he recibido más de lo que le he dado, de él aprendo cada día a descubrir y maravillarme por la vida

### **Ambos motivan mi existencia.**

A **Rafael Domínguez de la Peña**, por el milagro de coincidir y por creer en mí incluso más que yo misma, esta convicción ha sido mi más sólido apoyo y la fuente de energía cuando mis fuerzas han fallado. Nadie ha confiado tanto en mí y jamás agradeceré lo bastante. Gracias por el amor de ayer, de hoy y la ilusión de nuestro mañana.

A mi madre **Graciela Pérez Escamilla** que como una Catedral, se mantiene con ánimo a pesar de todo, es mi ejemplo de mujer íntegra. A quien agradezco su amor desinteresado de siempre.

*In memoriam* **Alberto Tapia Camacho**, mi padre, por quien me enamoré de los números. A quien nunca dejaré de convocar y que cuando vuelve, trae con él a la niña. A veces viene a buscarla y encuentra sólo a la señora medio insomne y olvidadiza en que me he convertido. Y Fernando Sánchez Marquina (por una petición expresa antes de su muerte).

A mis hermanos **Pedro, Alberto, Fausto y Juan** con quienes es una delicia convivir y recordar. Pato en especial por su ayuda en los detalles y sinfines del escrito.

A todos mis sobrinos, especialmente Coralie, familiares, familia política y amigos que creen en mí.

A **Laura Elena de la Peña** quien me recuerda a alguien muy querida y que tiene un doctorado en el absurdo cotidiano y una maestría en la vida en su haber.

## AGRADECIMIENTOS.

Deseo agradecer al Dr. Zeferino Garcia por la oportunidad de trabajar con él y su equipo de colaboradores. Con él aprendí que las crisis hay que verlas hacia adelante, ha sido como un hermano mayor para mí. A la MC Gabriela Granjeno, por brindarme su apoyo en las técnicas de bioensayo y producción de *B. microplus*. que fueron la base del desarrollo de este trabajo, así como el apoyo personal, en los momentos más difíciles, su amistad significa mucho para mí. Al equipo del Centro Nacional de Parasitología quienes me brindaron los conocimientos para realizar cruzamientos con *B. microplus*. También quiero agradecer al Dr Hugo Montaldo su ayuda para el análisis de los resultados de los cruzamientos y por 25 años de amistad. Al Biol. Edgar Castro Saines con quien fui aprendiendo y practicando las técnicas de cruzamiento en garrapatas.

Estoy agradecida con el Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas Forestales y pecuarias (INIFAP), donde me formé como practicante de investigación, y fui recibida para desarrollar la parte práctica de este proyecto.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca recibida durante el desarrollo del proyecto de Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal en mi querida Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

## RESUMEN.

Con el objeto de desarrollar un modelo de simulación para predecir la evolución de la resistencia a flumetrina en *B. microplus*, primero se examinó su modo de herencia, mediante un modelo F<sub>2</sub> con cruzas F<sub>1</sub> recíprocas, de las cepas Aldama (resistente) y Chiapas (susceptible). Se infestaron aleatoriamente becerros con larvas de seis cepas: SS (susceptible), RR (resistente), las cruzas recíprocas F<sub>2</sub> (RS , SR) y las F<sub>2</sub> (RSRS, SRSR). Estas se probaron con concentraciones seriadas de flumetrina (0.00075, 0.0015, 0.003, 0.006 y 0.012 µg/g). Se probó la hipótesis de herencia monogénica y se calcularon los factores de resistencia y dominancia efectiva. La resistencia en esta cepa resultó autosómica y controlada por más de un gen. La dominancia dependió de la concentración: fue casi dominante a la concentración más baja y casi recesiva con la más alta. La estrategia alta dosis-refugio se examinó con un modelo de simulación determinístico. Se probaron los porcentajes de refugio 4, 8 y 20, con migraciones de 2, 20, 50 y 100% con valores fijos de frecuencia del alelo de resistencia = 0.01, dominancia efectiva = 0.1, fertilidad = 50%, supervivencia de 91.98% y 0.01% para los resistentes y susceptibles respectivamente. Además se probó una respuesta inmunológica de 80% (por selección o vacuna) en los no tratados (refugio). La evolución de la resistencia se retrasó 822 generaciones con 20% de refugio y 20% de migración, mientras que con la respuesta inmunológica se alcanzó la resistencia en sólo dos generaciones, debido a la pérdida de susceptibles. Es necesario obtener valores reales para probar el modelo, así como evaluar el impacto económico y ecológico de esta estrategia. Aunque las simulaciones proporcionan evidencias de sus ventajas para retrasar la resistencia a acaricidas, se deben considerar las condiciones bajo las cuales aplican, para el manejo integral de esta plaga.

Palabras clave: Resistencia a acaricidas, *Boophilus microplus*, garrapata del ganado, modelo de simulación, dosis alta-refugio, genética de la resistencia.

## ABSTRACT.

In order to develop a simulation model to examine the acaricide resistance evolution, firstly it was evaluated the inheritance mode of resistance to flumethrin in the Mexican Aldama *Boophilus m.* strain. F<sub>2</sub> method was used, with reciprocal F<sub>1</sub> crosses between susceptible (Chiapas) and resistant (Aldama) strains. Six steers weighing 250 kg were randomly assigned for each six crosses: susceptible (SS), resistant (RR), F<sub>1</sub> reciprocal crosses (SR, RS) and F<sub>2</sub> (SRSR, RSRS). Bioassays tested all strains against the flumethrin concentrations (0.00075, 0.00150, 0.00300, 0.00600 and 0.012 µg/g). Single-gene hypothesis was test, and the resistant factor and effective dominance obtained. Flumethrin inheritance in Aldama strain was autosomal and controled for more than one gene. Flumethrin resistance depended upon the pesticide concentration used. Resistance was almost dominant at the lowest dose, conversely, at the higher dose it was almost completely recessive. Egg-mass shown maternal effects. A high-dose refuge strategy was modeled with a simple deterministic simulation model. 4, 8 and 20% refuge with different percentages of migration (2, 20, 50 and 100%) was tested with fixed 0.001 R allele frequencies, 0.1 dominance, 50% of female fertility, 91.98%, 0.01% resistant and susceptible larvae survival respectively. Additionally an immunologic response (from selection or vaccine) of 80% in refuge was tested with the same values for refuge and migration. Results of simulations indicated that resistance was delayed as late as 822 generations with 20% of refuge and 20% of migration. Conversely, with 80% of immunological response, only two generations was sufficient to resistance development. It is necessary to obtain more realistic values for the simulations. Economic evaluation and ecologic impact must be evaluated for this strategy. Although these simulations provide some evidences for this strategy advantages it must be considered the conditions upon that advantages apply for the Pest Integral Management in Mexico.

Key words: acaricide resistance, *Boophilus microplus*, simulation model, high dose-refuge, resistance inheritance, cattle tick.

INDICE	
DEDICATORIAS	II
AGRADECIMIENTOS	III
RESUMEN	IV
ABSTRACT	V
INDICE	VI
LISTA DE CUADROS	IX
LISTA DE FIGURAS	X
CAPITULOS	
I. INTRODUCCIÓN	1
Hipótesis	3
Objetivos	3
1. REVISIÓN DE LA LITERATURA.	
1.1 Caracterización de las garrapatas.	4
1.1.1 Garrapatas: Familia Ixodidae.	4

1.1.2. Ciclo de vida de las garrapatas Ixodidae.	5
1.2. Problemas causados por las garrapatas en la producción animal.	5
1.3. Distribución de <i>Boophilus microplus</i> en México.	7
1.4. Control de la garrapata <i>Boophilus microplus</i> en México.	9
1.5. Modo de acción de los acaricidas.	12
1.5.1. Organofosforados.	12
1.5.2. Organoclorados.	12
1.5.3. Piretroides.	12
1.5.4. Amidinas.	13
1.6. Importancia de la resistencia de <i>Boophilus microplus</i> a los acaricidas en México	14
1.7. Herencia de la resistencia a acaricidas.	15
1.8 Estudios de herencia de la resistencia a acaricidas en garrapatas <i>Boophilus microplus</i> .	17
1.8.1. Mecanismos de resistencia a los acaricidas.	17
1.8.2. Mecanismos de resistencia en garrapatas.	18
1.8.3. Estudios sobre mecanismos de resistencia en cepas mexicanas de garrapatas <i>Boophilus microplus</i> .	19
1.9. Genética poblacional de la resistencia.	21
1.10. Simulación de resistencia a acaricidas en <i>Boophilus microplus</i> .	24
1.11. La estrategia Dosis alta-Refugio.	25
II. MATERIAL Y MÉTODOS	27
1. PRIMERA FASE	
1. Modo de herencia de la resistencia a flumetrina en la cepa Aldama de <i>Boophilus microplus</i> .	27
1.1 Cepas de garrapatas	27
1.2. Acaricida	27
1.3. Cruzas	28
1.3.1. Cruzas. Primera etapa.	28

1.3.2. Cruzas. Segunda etapa	30
1.4. Bioensayos.	31
1.5. Variables reproductivas	32
1.6. Análisis de los datos.	32
1.6.1. Modo de herencia de la resistencia a flumetrina de la cepa Aldama de <i>Boophilus microplus</i> .	32
1.6.2. Variables reproductivas.	33
2. SEGUNDA FASE.	33
Modelo de simulación de resistencia de la cepa Aldama de <i>Boophilus microplus</i> a acaricidas.	
2.1. El modelo.	34
2.2. Migración	34
2.3. Supervivencia.	37
2.4. Tamaño de población.	38
2.5. Supuestos del modelo	39
2.6. Simulaciones	40
III. RESULTADOS	42
1. PRIMERA FASE.	
Caracterización de la resistencia a flumetrina en la cepa Aldama de <i>Boophilus microplus</i> .	
1.1. Número de genes controlando la resistencia.	42
1.2. Efectos maternos y ligamiento sexual.	42
1.3. Dominancia efectiva.	42
1.4. Variables reproductivas.	42
2. SEGUNDA FASE.	50
Modelo de simulación de resistencia de la cepa Aldama de <i>Boophilus microplus</i> a acaricidas.	
2.1 El modelo.	50
2.2 Efecto del porcentaje de refugio y migración sin vacuna en	50

animales no tratados.	
2.3 Efecto del porcentaje de refugio y migración con vacuna en animales no tratados.	50
2.4 Tamaño de población.	50
IV. DISCUSIÓN.	53
1. PRIMERA FASE. Caracterización de la resistencia a flumetrina en la cepa Aldama de <i>Boophilus microplus</i> .	
1.1 Número de genes controlando la resistencia	53
1.2 Efectos maternos y ligamiento sexual.	54
1.3 Factores de resistencia.	54
1.4 Dominancia de la resistencia.	54
1.5 Variables reproductivas.	55
2. SEGUNDA FASE.	55
2.1 Modelo de simulación de resistencia a acaricidas.	
2.2 Migración.	56
2.3 Porcentaje de refugio.	56
2.4 Vacuna.	56
V. REFERENCIAS	60
ANEXO 1	73
ANEXO 2	74

## LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Cruzas y cruzas recíprocas entre las cepas de <i>Boophilus microplus</i> Aldama (resistente a flumetrina) y Chiapas (susceptible a flumetrina)	29
Cuadro 2. Condiciones iniciales utilizadas para probar el modelo de Dosis alta-refugio en garrapatas <i>Boophilus microplus</i> .	41
Cuadro 3. Valores esperados de supervivencia obtenidos por el método de Collins (1967) y valores observados, y las pruebas de hipótesis para un sólo gen controlando la resistencia de la cepa Aldama de <i>Boophilus microplus</i> a flumetrina en cada una de las dosis ( Ji-cuadrada y sus valores de P).	44
Cuadro 4. Valores de $CL_{50}$ , $CL_{99}$ ( $\mu\text{g/g}$ ), intervalos de confianza 95% (para $CL_{50}$ ), pendientes y factores de resistencia utilizando flumetrina en contra de las cepas de <i>Boophilus microplus</i> , resistente (aldama), susceptible (Chiapas), sus cruzas recíprocas $F_1$ y las $F_2$ .	45
Cuadro 5. Mortalidad (%) y niveles de dominancia efectiva ( $D_{ML}$ ) en la cepas de <i>B. microplus</i> Aldama resistente (RR), Susceptible (SS) Chiapas y sus híbridos $F_1$ para cada dosis de flumetrina	47
Cuadro 6. Resultados de las pruebas de normalidad y homogeneidad de varianzas de las variables reproductivas.	48
Cuadro 7. Promedios de masa ovígera y porcentajes de eclosión de las hembras <i>Boophilus microplus</i> susceptibles, resistentes y sus cruzas recíprocas $F_1$ .	49

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Mapa de México mostrando el hábitat favorable estimado para *Boophilus microplus* en la zona 8
- Figura 2. Figura 2. En 1981 el Programa de la Campaña Nacional Contra la Garrapata estableció estaciones de cuarentena con baños a lo largo de las principales vías comerciales por las que circulaba el ganado. 11
- Figura 3. Modelo para evolución de resistencia en garrapatas *Boophilus microplus* con estrategia de alta - dosis refugio 36
- Figura 4. Curvas dosis-mortalidad de las cepas de *Boophilus m.* Aldama (resistente), Chiapas (susceptible), las cruza recíprocas F1 y las F2, con las distintas dosis de flumetrina. 46
- Figura 5. Número de generaciones que tarda en desarrollarse la resistencia a acaricidas con estrategia dosis alta-refugio, con distintos porcentajes de refugio (4, 8 y 20%) y migración. Con 95% de supervivencia en refugio. 51
- Figura 6. Número de generaciones que tarda en desarrollarse la resistencia a acaricidas con la estrategia dosis-refugio, en distintos porcentajes de refugio (4, 8, y 20%) y migración con vacuna (80% efectividad) 52

# UN MODELO PARA PREDECIR EL TIEMPO QUE TARDA PARA DESARROLLARSE LA RESISTENCIA DE LAS GARRAPATAS *Boophilus microplus* A LOS ACARICIDAS

## I. INTRODUCCION

El control químico tradicional de las garrapatas mediante tratamiento con acaricidas al ganado infestado, a tiempos regulares, ha traído como consecuencia una quimioresistencia y a su vez una modificación en las estrategias de control hacia una combinación de medidas médicas y agronómicas<sup>1</sup>. *Boophilus microplus* es una garrapata del ganado común en varios países con climas tropicales y subtropicales. Esta garrapata de un huésped transmite babesiosis al ganado y provoca pérdidas económicas directas e indirectas en la industria ganadera<sup>2,3,4</sup>. Un objetivo importante en el manejo de parásitos es retardar la aparición de resistencia del parásito a los acaricidas de modo que esto reditúe en beneficio de la producción. Los modelos de resistencia a plaguicidas pueden ser herramientas útiles para trabajar en torno a esos objetivos<sup>5</sup>.

Se han usado modelos matemáticos para describir la dinámica poblacional de los parásitos, y también para simular el manejo integrado de plagas mostrando el papel de algunas variables<sup>6</sup>. Algunos autores han estudiado la dinámica de poblaciones de *Boophilus* a través de modelos matemáticos, sin tomar en cuenta el desarrollo de resistencia a acaricidas<sup>7,8,9,10</sup>. Otros investigadores han usado modelos para evaluar la influencia de la resistencia a los acaricidas en la dinámica poblacional de la garrapata del ganado *Boophilus microplus*, el tiempo de la dispersión de la resistencia a nuevos acaricidas en poblaciones australianas de *B. microplus* se estimó en 4-7 años<sup>11</sup>. El modelo TICK2<sup>10</sup>, consideró la presencia o ausencia de resistencia a acaricidas en garrapatas de 1 y 3 huéspedes en Australia para la dinámica poblacional. Con otro modelo estocástico basado en la distribución de Weibull se evaluaron los efectos del número de aplicaciones del acaricida, el intervalo entre ellas y su efectividad residual<sup>12</sup>. El efecto de un reservorio de parásitos, se estudió con un modelo determinístico, en una población susceptible en *Boophilus microplus*, bajo tratamiento acaricida, así como el papel de la inmunidad natural o adquirida del ganado a este parásito<sup>7</sup>, pero este modelo

no consideró la resistencia al acaricida en la población tratada. Más recientemente, se evaluó con un modelo determinístico el efecto de la resistencia de *Boophilus spp.* en la dinámica de poblaciones del sur de E.U (Texas); además de probar el efecto del manejo del ganado con rotación y sin rotación de potreros <sup>13</sup>. En *Boophilus microplus*, no se ha establecido el tiempo en que se desarrolla la resistencia a un acaricida, en presencia de poblaciones susceptibles (refugios).

El conocimiento de las bases genéticas de la resistencia es crítico para entender la evolución de esa característica dentro de las poblaciones seleccionadas.

Cuando los pesticidas son agentes de selección, con igual eficacia de la droga y una frecuencia inicial equivalente de alelos resistentes, la resistencia se desarrollará más rápidamente cuando está determinada por un solo gen que si es poligénica. Esto ocurre porque cuando la estructura es poligénica hay más genotipos con alelos susceptibles (S) que no son eliminados completamente por el tratamiento antiparasitario y pueden contribuir a las generaciones futuras <sup>6,14</sup>. Los estudios en la biología molecular de *Boophilus microplus* realizados recientemente, muestran la variabilidad genética de los mecanismos de resistencia en garrapatas mantenidas en laboratorio <sup>15,16,17,18</sup>. Esa variación genética pudiera estar relacionada con los procesos evolutivos asociados con la adaptación al hábitat que las garrapatas del género *Boophilus* han sufrido debido a la separación biogeográfica <sup>16</sup>, aunque también pudiera estar relacionada a los distintos procesos de selección a los que han sido sometidas las diferentes cepas en los laboratorios donde se conservan <sup>19,20,21</sup>.

### **Hipótesis**

La a los acaricidas en *Boophilus microplus* está regulada por más de un gen.

Dado que los acaricidas son agentes de selección, es posible estudiar la resistencia a los acaricidas, mediante modelos matemáticos determinísticos.

### **Los objetivos del presente estudio fueron:**

i) Establecer la presencia de un gen mayor que regule la resistencia a la flumetrina, un acaricida piretroide en la cepa Aldama de la garrapata del ganado *Boophilus microplus*, por medio de un diseño  $F_2$ , así como determinar si la resistencia está ligada al sexo.

ii) Cuantificar los factores de resistencia de las cepas parentales de *Boophilus microplus* Aldama (RR) y Chiapas (SS) y sus cruzas recíprocas  $F_1$  y  $F_2$ .

iii) Determinar la dominancia funcional de la resistencia a flumetrina.

iv) Examinar la aptitud de las cruzas recíprocas  $F_1$  por medio de algunas variables reproductivas.

v) Obtener un modelo genético, determinístico, para predecir el número de generaciones en que aparece la resistencia, basado en la frecuencia de los alelos resistentes, en poblaciones de *Boophilus microplus* en presencia de una subpoblación no tratada con acaricidas (refugio), en el cual se pudieran evaluar diferentes dosis del acaricida y los efectos de la inmunidad del huésped, iniciando con distintas frecuencias del alelo resistente (R), con diferentes proporciones de apareamiento aleatorio entre los dos hábitats (migración).

## 1. REVISIÓN DE LA LITERATURA.

### 1.1 Caracterización de las garrapatas.

Las garrapatas son parásitos externos hematófagos de mamíferos, aves y reptiles en todo el mundo. Se han descrito aproximadamente 850 especies<sup>22</sup>

Hay dos familias de garrapatas, Ixodidae (garrapatas duras) y Argasidae (garrapatas blandas). Ambos son transmisores importantes de agentes de enfermedades tanto en humanos como en animales.

#### 1.1.1 Garrapatas: Familia Ixodidae.

Las garrapatas Ixodidae tienen distintas etapas de vida. Las larvas que emergen del huevo tienen seis patas y buscan a los huéspedes mediante una conducta llamada "búsqueda": hacen un arrastramiento a los tallos del césped o emperchan en los bordes de hojas en la tierra en una postura típica con las patas delanteras extendidas, sobre todo en respuesta a un huésped que pasa. También el dióxido de carbono, el calor o el movimiento, sirven como estímulo para desencadenar esta conducta. Enseguida estas garrapatas suben a un huésped que roza sus patas delanteras extendidas. Después que se alimentan de sangre de un huésped vertebrado, mudan a la fase de ninfa y adquieren ocho patas. Las ninfas se alimentan y mudan a la etapa siguiente y última: el adulto. Después de alimentarse una vez más, la hembra adulta con un tamaño aumentado se desprende y deposita miles de huevecillos en la tierra, muriendo después. Las garrapatas duras solo se alimentan de sangre durante estas tres etapas de su vida (ninfa, metaninfa y adulto). Estas garrapatas duras secretan una sustancia tipo cemento producida por las glándulas salivales, que literalmente las pega en el lugar mientras se están alimentando, la sustancia se disuelve una vez que la alimentación se ha completado. Las garrapatas Ixodidae se alimentan de sus huéspedes en períodos de tiempo que varían desde días a semanas, dependiendo de factores como la etapa de vida, tipo de huésped y especie de garrapata. La superficie externa, o cutícula de estas garrapatas crece para acomodar el

gran volumen de sangre ingerida, que, en las hembras adultas puede ser de 200-600 veces su peso sin alimentar<sup>23</sup>.

### **1.1.2. Ciclo de vida de las garrapatas Ixodidae.**

Estas garrapatas tienen una gran variedad de formas de vida con el objeto de optimizar sus oportunidades de contactar con un huésped para asegurar su supervivencia. Algunas de ellas se alimentan en un solo huésped en sus tres etapas de vida. A estas se les denomina garrapatas de un huésped.

De la familia de garrapatas duras, el género *Boophilus* de un solo huésped, completa su alimentación en aproximadamente tres semanas, preferentemente en ganado. De esas garrapatas la más importante es *Boophilus microplus*. Tiene un gnatostoma corto con pedipalpos pequeños que están situados dorsalmente, quelíceros y un hipostoma central que penetra la piel<sup>23</sup>. El daño que ocasionan es considerable pues sus sitios preferidos de alimentación son a menudo los de mayor importancia para determinar el valor comercial de la piel. Se encuentra en México, la mayor parte de África, América Central y Sur, Madagascar, Taiwán y Australia, mientras que en Estados Unidos ha sido erradicada. Infecta una gran variedad de animales incluyendo bovinos, ovinos, caprinos y caballos, aunque parece preferir a los bovinos. En Australia, *B. microplus* se considera el ectoparásito que más pérdidas causa en la producción de ganado<sup>24</sup>.

### **1.2. Problemas causados por las garrapatas en la producción animal.**

El efecto directo de las garrapatas en la producción resulta del daño en las pieles por la picadura, pérdida de sangre y el efecto de toxinas. El daño directo de la piel causado por la picadura y los abscesos que se desarrollan en esos sitios repercute en pérdidas considerables del valor de las pieles. En el caso de las vacas productoras de leche, estos abscesos generalmente están involucrados en el daño y la pérdida de uno o más cuartos de la glándula mamaria, con la consecuente pérdida de producción láctea.

Las picaduras de las garrapatas son una puerta de entrada a bacterias y moscas, predisponiendo al ganado a miasis e infecciones. La irritación causada por su picadura tiene un efecto depresivo sobre la producción de carne, reduciendo la ganancia de peso de 0.28 a 0.8 kg por garrapata por año en animales en crecimiento<sup>25</sup>.

*Boophilus microplus* transmite enfermedades como la babesiosis, causada por *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*, conocida también como 'fiebre de garrapata', todavía es una de las enfermedades más importantes del ganado bovino en climas tropicales, y ha causado grandes pérdidas económicas. La distribución de *Babesia spp.* sigue la distribución de los vectores como *Boophilus microplus*.<sup>26,27</sup> La importancia económica de la enfermedad transmitida por esta garrapata no se limita a las pérdidas causadas directamente por la pérdida de producción debida a mortalidad, o indirectamente por los costos de su control. Otro punto es la disminución de la producción potencial, pues, no obstante en algunas regiones el ganado se ha adaptado a los hemoparásitos locales, la producción es baja. Esta enfermedad también es una barrera para mejorar la productividad del ganado por la vía de introducir ganado genéticamente superior, debido a la susceptibilidad de éste a los hemoparásitos que causan una gran mortalidad, sobre todo en el ganado lechero importado de áreas libres de *Babesia spp.*<sup>28,3</sup>

En México se estimó en el año 1969, que las pérdidas anuales debidas a las garrapatas y a la babesiosis ascendían a unos 110 millones de kg de carne y 110 mil cabezas de ganado vacuno<sup>27</sup>. En el año 1983, en Australia, se encontró que las pérdidas de producción en la ganancia diaria debidas a *Boophilus microplus* en becerros en crecimiento F<sub>1</sub> (*Bos indicus* x *Bos taurus*) eran menores en otoño e invierno (0.47 g/garrapata repleta), cuando el ganado crece más lentamente (90 g/día), que en verano (0.72-1.52 g /garrapata repleta), cuando los becerros crecen más rápidamente (310-590 g/día)<sup>28</sup>. En el ganado productor de leche en lactación, se estimó que por cada hembra repleta de *B. microplus* se pierden 8.9 ml de leche y un gramo de peso<sup>3</sup>. En Queensland, Australia, el costo estimado por la infestación de garrapatas en la industria lechera (excluyendo costos asociados específicamente a babesiosis) fue en el año 2001,

de US \$4, 096, 000 anuales. Cerca del 49% de este costo está relacionado con costos de control y el 51% a pérdidas en producción<sup>4</sup>. De acuerdo con el manual oficial de la campaña contra la garrapata, en el siglo XIX se identificaron en México dos especies de garrapatas *Boophilus (microplus y annulatus)* y se declaró a la babesiosis como una barrera para el desarrollo de la ganadería<sup>29</sup>.

### 1.3. Distribución de *Boophilus microplus* en México.

Aproximadamente el 40% del territorio mexicano (197 255 000 Ha), está cubierto de pastos naturales y se aprovecha para la cría de ganado, principalmente para la producción de carne<sup>30</sup>.

El norte del país es árido, con precipitaciones que oscilan entre 250 y 400 mm al año<sup>31</sup>, en esta zona la cría eficaz del ganado requiere una elevada inversión para cubrir la alimentación suplementaria de los animales y el riego de los pastos. Mientras que en el área tropical del Golfo, la costa del Pacífico y las regiones del sudeste, con abundantes precipitaciones hasta de 3000 mm al año, permiten el establecimiento de pastos y la cría de la mayor parte del ganado vacuno en el país. Desafortunadamente las condiciones ecológicas en estas áreas favorecen el desarrollo de muchos parásitos externos e internos del ganado, entre las que destaca *Boophilus microplus*.

En la Figura 1 se muestran las predicciones de distribución en México de hábitats para *Boophilus microplus*, trazado a través de un método geoestadístico, utilizando imagen satelital. Aunque en este modelo no se tomaron en cuenta los tratamientos con químicos que se llevaron a cabo en esas zonas, el clima fue el factor que mayormente determinó la distribución geográfica de esta especie<sup>32</sup>.

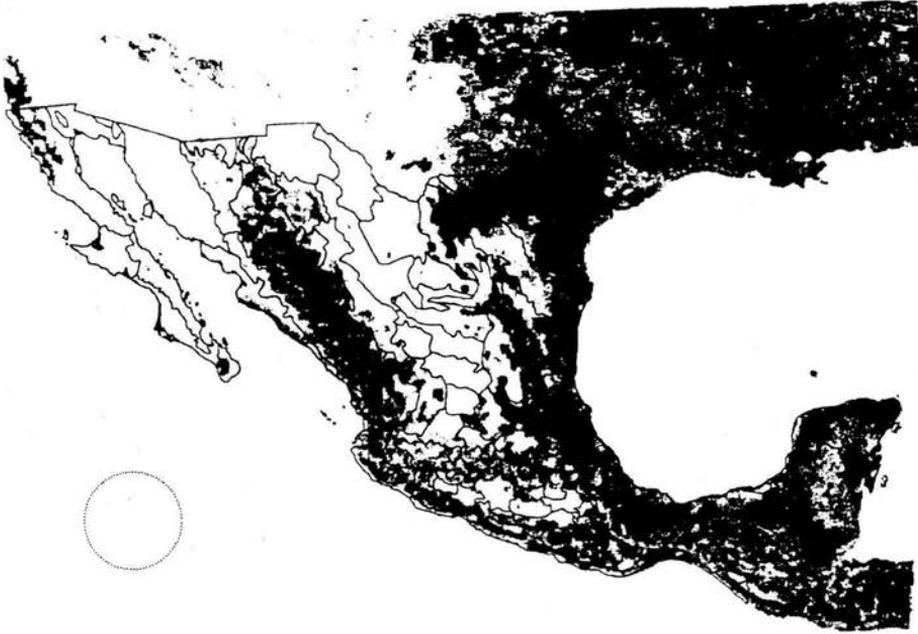


Figura 1. Mapa de México mostrando el hábitat favorable estimado para *Boophilus microplus* en la zona. También se incluye el sur de EUA en la parte superior de la figura. Lo más oscuro es lo más favorable<sup>32</sup>.

Los mejores hábitats comprendieron dos bandas que siguen la Sierra Madre oriental y la occidental, extendiéndose hacia las costas del Atlántico y Pacífico. Con excepción de algunas zonas poco propicias observadas alrededor del sur en las partes altas de la Sierra Madre, las zonas favorecedoras se extendieron desde Veracruz, Tabasco, Chiapas, Quintana Roo, y la Península de Yucatán. Los cambios más drásticos en la densidad del parásito se observaron en el este de México, a lo largo de Tamaulipas, Hidalgo, Puebla y San Luis Potosí. Exceptuando la península de Baja California, el desierto de Sonora y una gran parte de la región central del país, México es un país con grandes áreas cuyo hábitat favorece la proliferación de *B. microplus*. Estos resultados son muy parecidos a los que se encontraron en 1987, en México<sup>33</sup>.

#### **1.4. Control de la garrapata *Boophilus microplus* en México.**

En México, el control de este parásito comenzó oficialmente en 1924, cuando el artículo 92 del Reglamento de Policía Veterinaria Sanitaria estableció la necesidad de controlar el desplazamiento del ganado vacuno desde las áreas infestadas hacia las zonas libres de infestación de garrapatas *Boophilus spp.*, mediante la utilización de baños parasiticidas estratégicamente dispuestos en estaciones de cuarentena. Más tarde, en los últimos años del decenio 1920-29, los granjeros, con la aprobación de los gobiernos de los Estados de Chihuahua, Sonora y Tabasco, intentaron combatir las garrapatas haciendo pasar el ganado por baños de una solución de trióxido arsenioso al 0.18-0.22%<sup>29</sup>. En la década de 1960, los ganaderos de estos y otros Estados, principalmente Coahuila, Durango, Zacatecas, Guanajuato, Aguascalientes y Colima, quedaron totalmente convencidos de las ventajas técnicas y económicas que se podían derivar de un programa de erradicación de las garrapatas *Boophilus spp.* En 1969 Jalisco, Michoacán, San Luis Potosí, Sinaloa, Tamaulipas y Yucatán se unieron a los ya >> de comprometidos en la campaña, y durante los primeros años de la década de 1970 los Estados del sur y sureste entraron también en el programa que abarcaba así a toda la República Mexicana, creándose en 1975 el Fideicomiso Campaña Nacional Contra la Garrapata<sup>34</sup>. La Campaña se basó en la lucha química a través de la aplicación de

acaricidas mediante baños en el caso de los bovinos productores de carne, y mediante rociados en los bovinos productores de leche, a intervalos de 14 a 21 días, según las condiciones climáticas de la zona. Los acaricidas fosforados orgánicos fueron los principales productos utilizados para combatir las garrapatas. El programa estableció estaciones de cuarentena con baños a lo largo de las principales vías comerciales por las que circulaba el ganado<sup>29</sup> (Figura 2).

En los primeros años de la campaña se logró reducir las pérdidas de carne debidas a la infestación de garrapatas, de 30 806 toneladas en 1975, a 7 227 toneladas en 1979<sup>34</sup>. Entre 1975 y 1985 se incrementó considerablemente el número de baños de inmersión con un promedio anual de 2 253 unidades, lo que aumentó la cantidad de tratamientos de ganado infestado y el porcentaje del territorio nacional considerado libre de garrapata pasó del 36.6% en 1975 a 47.9% en 1985 con un avance de 22 millones de Hectáreas. A partir de 1984 las estrategias de la Campaña cambiaron como consecuencia de la extinción del Fideicomiso y la aparición de poblaciones de garrapatas resistentes a productos organofosforados en una región del Golfo de México y en la Península de Yucatán<sup>35</sup>.

Desde entonces, el control de las garrapatas *Boophilus* se ha realizado en forma individual, por los productores, con asesoría del Gobierno Federal. Actualmente se consideran libres de garrapatas *Boophilus* Aguascalientes, Sonora, Tlaxcala y el D.F. y parcialmente libres a Baja California, Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas, Durango, Zacatecas, San Luis Potosí, Guanajuato, Hidalgo, Estado de México, Puebla, Querétaro y Sinaloa<sup>36</sup>.

La erradicación de este parásito es muy difícil, excepto en islas, donde las campañas han tenido éxito. En islas grandes o en continentes la situación es diferente, aunque la erradicación en EUA es una notable excepción. En este caso, la erradicación fue posible a través de la aplicación de medidas legislativas severas. Una de las razones más importantes por las que falla un programa de erradicación es, tal vez, la resistencia de las garrapatas a los acaricidas<sup>37</sup>.



Figura 2. En 1981 el Programa de la Campaña Nacional Contra la Garrapata<sup>34</sup> estableció estaciones de cuarentena con baños a lo largo de las principales vías comerciales por las que circulaba el ganado<sup>29, 27</sup>

## 1.5. Modo de acción de los acaricidas.

Los modos de acción de los acaricidas varían desde su efecto físico y metabólico hasta la interferencia de la conducción nerviosa.

**1.5.1. Organofosforados.** Son compuestos que poseen un átomo de fósforo en el centro de la molécula, son derivados del ácido fosfórico, cuyos grupos hidroxilo están sustituidos por elementos como flúor, azufre, cloro, grupos amino y radicales orgánicos. Su principio activo está basado en el bloqueo de la enzima acetilcolinesterasa, mediante una fosforilación irreversible, la cual interviene en reacciones de impulsos nerviosos, impidiendo su transmisión normal desde las fibras nerviosas hasta los tejidos<sup>38</sup>.

**1.5.2. Organoclorados.** Los convulsivos que bloquean los canales de cloro, representan uno de los grupos más antiguos de insecticidas comerciales. Estos compuestos originalmente fueron policlorocicloalcanos lipofílicos ambientalmente estables, tales como el dieldrin y el endrin. De ellos, hoy solo se usan en cantidades apreciables los materiales más biodegradables, tales como lindano y endosulfán. La principal acción tóxica de los organoclorados la ejercen sobre el sistema nervioso, interfiriendo con el flujo de iones a través de las membranas de las células nerviosas, aumentando de esta forma la irritabilidad de las neuronas, siendo además inductores enzimáticos. El DDT y análogos prolongan el tiempo de apertura de los canales de Na<sup>+</sup>. El lindano, el toxafeno y los ciclodienos inhiben el flujo de cloro regulado por el ácido gamma amino butírico (GABA). Los organoclorados, a diferencia de los organofosforados y los carbamatos, no inhiben las colinesterasas<sup>38</sup>.

**1.5.3. Piretroides.** Las piretrinas naturales son extractos de las flores del crisantemo (*Chrysanthemum cinerariaefolium*). Existen seis piretrinas naturales que son ésteres de tres alcoholes ciclopentenolones (piretrolona, cinerolona y jasmolone). Los análogos sintéticos de 'primera generación' resultaron inestables a la luz, en la década de 1960-70 se lograron piretroides fotoestables como la permetrina cipermetrina y fenilvalerato, llamados de 'segunda generación', la deltametrina y flumetrina fueron piretrinas

logradas a partir de una sustitución en los componentes de la fórmula; la introducción del fenoxibencil (por ejemplo, permetrina) o ciertos alcoholes halogenados (por ejemplo, teflutrina) mejoraron la estabilidad química y permitieron el uso de los piretroides en el campo. Estos piretroides son más tóxicos a menores temperaturas una propiedad única entre los acaricidas. El DDT y los piretroides tienen dos tipos de efectos en los insectos: un efecto inicial rápido de abatimiento o derribo conocido como *kd* (*knockdown*), pérdida de movimiento y un efecto letal subsecuente. Los piretroides y el DDT son neurotoxinas. Producen lesiones similares en las terminales de los nervios motores de una variedad de especies de insectos, y pueden actuar tanto en los nervios periféricos como en el sistema nervioso central (la mayoría de los acaricidas pierden acción en los axones periféricos). Los piretroides que actúan preferentemente en los nervios periféricos se conocen como tipo I, mientras que aquellos con acción central (principalmente los piretroides con el grupo  $\alpha$ -ciano) son conocidos como tipo II. A nivel molecular, los piretroides pueden interactuar con los canales de sodio. Un incremento en la permeabilidad al sodio está correlacionado con lesiones funcionales de los canales de cloro controlados por GABA (ácido  $\gamma$ -amino butírico) y en el límite membranal de ATPasas<sup>39</sup>.

**1.5.4. Amidinas.** Debido a sus propiedades insecticidas y acaricidas, se han usado varios compuestos amidinas. El principal compuesto de esta serie era el clordimeform, pero se ha limitado su uso por su carcinogenicidad. El principal compuesto del grupo que se usa aún hoy es el amitraz, el cual pasa por una conversión metabólica y se convierte en un metabolito activo llamado U-40481 o BTS-27271, es ligeramente soluble en agua, pero es soluble en solventes orgánicos. Estos compuestos imitan la acción del neurotransmisor octopamina, el cual regula el comportamiento de excitación dentro del SNC y también tiene acciones sobre los tejidos periferales. La octopamina se liga a un receptor que eleva los niveles del segundo mensajero, el monofosfato de adenosina cíclico (MFA). Entonces, el MFA cíclico inicia procesos que originan excitación de las neuronas. En los artrópodos, las amidinas causan una sobreestimulación de las sinapsis octopaminérgicas, lo cual resulta en temblores,

convulsiones en los adultos. Estos compuestos causan una verdadera anorexia en los artrópodos y también bajan la reproducción<sup>38</sup>.

### **1.6. Importancia de la resistencia de *Boophilus microplus* a los acaricidas en México.**

La resistencia se define como la capacidad de un individuo para sobrevivir a concentraciones altas de algún tóxico que es letal para el resto de la población. La evolución de la resistencia ocurre a través de un proceso de acumulación genética (selección) cuya consecuencia es que una población se vuelva gradualmente menos susceptible al tóxico<sup>40,41</sup>.

Las garrapatas son importantes en la lista de organismos resistentes a pesticidas y desde los primeros informes de resistencia a una variedad de arsenicales, se han publicado ejemplos de resistencia a acaricidas de todas clases, incluyendo los organoclorados, los organofosforados, los piretroides y las amidinas en una extensa distribución geográfica mundial<sup>42,24</sup>.

En México, la resistencia de *Boophilus microplus* a los acaricidas organofosforados se hizo evidente a los pocos años de que comenzaron a utilizarse en forma extensiva y periódica, en 1981 (siete años después del establecimiento de la Campaña) se demostró el primer caso de resistencia al purificarse y caracterizarse la cepa "Tuxpan" resistente a organofosforados<sup>43,19</sup>. Posteriormente se caracterizó otra cepa resistente a organofosforados y organoclorados denominada "Tempoal". En 1986 se autorizó el uso de los acaricidas piretroides y amidinas para el control de la garrapata. Ocho años después se detectaron los primeros casos de resistencia a piretroides en cuatro Estados de México con la purificación de dos cepas denominadas "San Jorge" y "La Mora" con una marcada resistencia a piretroides y media a organofosforados<sup>20</sup>.

A partir de estos hallazgos, se inició un Programa Nacional de monitoreo, con el objeto de evaluar la situación de la resistencia en zonas ganaderas consideradas de alto riesgo. Como resultado de este programa se encontraron otros dos patrones de respuesta. El primero proveniente de una muestra de la zona sur de Veracruz con resistencia a

cipermetrina se denominó "Coatzacoalcos" y otra, con altos niveles de resistencia a flumetrina se denominó "Aldama"<sup>44</sup>. En Australia estos mismos patrones de resistencia habían aparecido hacia 1988 con la cepa "Lamington", con resistencia específica a flumetrina y "Parkhurst" a cipermetrina, deltametrina, fenvalerato y flumetrina<sup>1</sup>.

Entre 1994 y 1999 se hizo un seguimiento de 21 estados en México, de los cuales 15 tuvieron el mayor número de casos de doble resistencia, de los cuales Veracruz, Tamaulipas, San Luis Potosí, Tabasco y Chiapas obtuvieron la mayor cantidad de estos casos<sup>45</sup>.

Recientemente se ha informado sobre el primer caso de resistencia de la garrapata *Boophilus microplus* al amitraz en México, la cepa fue denominada "San Alfonso" y es resistente también a organofosforados y piretroides<sup>46</sup>.

Factores ambientales, científicos y económicos limitan a la industria química para desarrollar y comercializar una sucesión infinita de químicos con nuevos modos de acción para reemplazar a los que pierden valor por el desarrollo de resistencia de los parásitos. Como el problema de la resistencia a acaricidas se ha convertido en un gran obstáculo para los esfuerzos de control de las garrapatas y las enfermedades que transmiten en el ganado, es prioritario el desarrollo de estrategias y tecnología para su manejo<sup>47</sup>.

### **1.7. Herencia de la resistencia a acaricidas.**

Dos preguntas importantes al respecto son; ¿cuántos genes se relacionan con la resistencia? ¿hay muchos genes que confieren resistencia para algunos acaricidas, o sólo unos cuantos genes confieren resistencia a un amplio rango de acaricidas? Si hubiera sólo pocos genes principales que confieren la resistencia a acaricidas, sería posible caracterizar los mecanismos controlados por cada gen y una vez que esto se haya hecho, sería posible visualizar soluciones para las poblaciones resistentes al control químico<sup>47</sup>.

Primero se propuso que la resistencia era debida a varios *loci* en algunos casos, pero en otros podía estar gobernada solo por un gen mayor<sup>49</sup>. Durante los años 60's, se reconoció que la resistencia a acaricidas se debía a variantes alélicas en uno o dos *loci*<sup>50,51,52,53</sup>.

Más adelante, en la década de 1980, por un lado, se declaraba que en poblaciones de campo, la resistencia casi invariablemente era debida a un solo gen mayor<sup>54</sup>, mientras que por otro lado se sugería que los cambios ocurrían como resultado de la acumulación de mutaciones múltiples, cada una de ellas contribuyendo un poco al total, esto es, la resistencia a acaricidas debería ser poligénica<sup>55</sup>. A esta confusión se le dio una explicación en el sentido de que los estudios acerca del número de genes involucrados en la resistencia, se realizaban bajo selección en laboratorio; como los alelos que confieren altos niveles de resistencia son raros, para asegurar muestras de estos alelos a tan pequeñas frecuencias iniciales, sería necesario coleccionar billones de individuos<sup>56</sup>, por ello sería improbable que alguna cepa de laboratorio tuviera un alelo principal para resistencia a un pesticida al cual sus ancestros no se han expuesto, por lo que una cepa de laboratorio no desarrollaría resistencia monogénica. Mientras que en el campo, las intensidades de selección tan altas a que están expuestos los insectos favorecerían alelos de resistencia con efecto mayor<sup>57,58</sup>. Estas hipótesis se refutaron tras una revisión bibliográfica exhaustiva, al observarse que las intensidades de selección en el campo varían ampliamente, llegándose a traslapar con las de laboratorio, y de acuerdo con resultados basados en un modelo matemático<sup>59</sup>, las intensidades de selección típicas de laboratorio favorecieron la resistencia conferida por genes mayores. Otra explicación se ha dado en el sentido de que la evolución de la resistencia depende de cómo se canaliza la variación fenotípica y la genotípica subyacente durante una respuesta selectiva. Se favorecería una respuesta poligénica si la selección actuara dentro de la distribución fenotípica de los susceptibles, mientras que se podría predecir una respuesta monogénica si la selección se enfocara a mutaciones raras con fenotipos fuera de la distribución de susceptibles<sup>60</sup>. Los entomólogos han discutido si la resistencia es causada por un solo gen o muchos, y una propuesta razonable es que la resistencia es afectada por muchos genes, pero que la distribución de sus efectos a lo

largo de los *loci* no es uniforme, sólo uno o unos pocos *loci* dan cuenta de la mayoría de la resistencia <sup>14</sup>.

### **1.8. Estudios de herencia de la resistencia a acaricidas en garrapatas *Boophilus microplus*.**

Los primeros autores que trabajaron con dos cepas Australianas de *Boophilus microplus*; una resistente a diazinon y otra a clorpirifos (organofosforados), encontraron que la resistencia se debió a dos genes complementarios que mostraron dominancia incompleta<sup>61</sup>. Mientras que otros investigadores sugirieron que en una cepa de garrapatas *Boophilus microplus*, de origen mexicano, la resistencia fue multigénica debido a que en su estudio de selección la resistencia llegó arriba de la concentración que originalmente eliminaba al 100% de las garrapatas, con el argumento de que este resultado sólo pudo darse por una recombinación de genes que causaron un efecto aditivo<sup>62</sup>.

Sin embargo, investigadores que trabajaron con las cepas mexicanas Tuxpan, resistente a acaricidas organofosforados, y Tempoal, resistente a organofosforados y clorinados ciclodienos, encontraron una resistencia autosómica controlada por un gen simple<sup>63</sup>, lo cual coincide con los estudios donde se ha encontrado un sólo mecanismo de resistencia en la cepa Tuxpan, por la vía metabólica <sup>64,65,66</sup>.

#### **1.8.1. Mecanismos de resistencia a los acaricidas.**

La resistencia a acaricidas es básicamente el resultado de varios mecanismos, de los cuales los más importantes son: la reducción de penetración del tóxico por una acción física y los que tienen bases bioquímicas. Las dos maneras más importantes de la resistencia bioquímica son:

a) **Un aumento de la detoxificación por enzimas**, que ocurre cuando se evita que el insecticida alcance su sitio de acción debido a que las actividades de las enzimas esterasas, oxidasas y glutathion S-transferasas (GST) se encuentran modificadas<sup>67</sup> y

b) **Insensibilidad en el sitio blanco**, que ocurre cuando el insecticida ya no se une a su blanco debido a que los aminoácidos responsables de que el insecticida enlace en su sitio de acción, se encuentran alterados, por lo cual éste es menos efectivo o incluso inefectivo; el blanco de los organofosforados (Ops) (ej.: malatión) y carbamatos (ej.: propoxur) es la acetilcolinesterasa en las sinapsis de los nervios, mientras que el blanco de algunos organoclorados, DDT y piretroides sintéticos son los canales de sodio de la vaina de los nervios<sup>68</sup>.

### 1.8.2. Mecanismos de resistencia en garrapatas.

En *Boophilus microplus*, la reducción en la penetración del compuesto sólo se ha observado en una cepa de laboratorio y sólo con isómeros de cipermetrina. Sin embargo, no se ha observado con isómeros de permetrina<sup>69</sup>. Este mecanismo no parece ser importante en organofosforados debido a que las cepas resistentes y susceptibles de *B. microplus* han mostrado proporciones similares de penetración cuticular de Coumafós<sup>70,71</sup>. En cuanto a los mecanismos de detoxificación, se propuso que la baja de sensibilidad a los acaricidas y reducción en la reactividad normal hacia el sustrato pueden estar íntimamente relacionadas y podrían estar controladas por el mismo sitio alterado en AchE (acetilcolinesterasa)<sup>72</sup>.

Otros autores, plantearon que el incremento en la detoxificación metabólica puede estar relacionado con un aumento de la actividad de esterasa en *B. microplus* resistentes a organofosforados<sup>71,64</sup>. Aunque encontraron que la cantidad de productos metabólicos en una cepa resistente de *B. microplus* fue mayor que en la susceptible, ellos explicaron que la diferencia era insuficiente como para vincularla con la magnitud de la resistencia observada.

La insensibilidad del sitio blanco en la resistencia al efecto *knockdown* (kdr) se ha detectado en cepas de *B. microplus* resistentes al DDT, con resistencia cruzada con

piretroides<sup>67</sup>, este mecanismo parece ser común en poblaciones resistentes a organofosforados<sup>73,74</sup>.

### 1.8.3. Estudios sobre mecanismos de resistencia en cepas mexicanas de garrapatas *Boophilus microplus*.

Las diferentes cepas de *Boophilus microplus* tienen varios grados de resistencia a los diferentes acaricidas. Las cepas Tuxpan y Coatzacoalcos (Cz) son altamente resistentes a coumaphos, pero la primera ha sido seleccionada para resistencia a este organofosforado<sup>19</sup>, mientras que la Coatzacoalcos se seleccionó para resistencia al piretroide, permetrina<sup>75</sup>.

Como resultado, en la cepa Tuxpan el mecanismo de resistencia al organofosforado parece deberse mayormente a una actividad aumentada de esterasa<sup>64</sup>, específicamente carboxilesterasa<sup>66</sup>. En esta cepa no existen evidencias de cambios estructurales que le confieran la característica de insensibilidad de sitio blanco a los acaricidas organofosforados<sup>65</sup>.

Por otro lado, en la cepa Coatzacoalcos se han encontrado dos mecanismos de resistencia a acaricidas. El primero debido a una sustitución Phe→Ile en el canal de sodio dominio III segmento S6, con un efecto *kdr*<sup>75</sup>; el segundo, debido a una sustitución G→A en el nucleótido 1120, que probablemente codifique la esterasa CzEst9, que muestra una elevada actividad en esta cepa de *Boophilus microplus*, y que tiene como resultado una sustitución del aminoácido Asp → Asn y la creación de un sitio de restricción Eco RI<sup>77,66</sup>; es probable que esta mutación esté relacionada con un aumento de la hidrólisis de permetrina mediada por esterasa<sup>78</sup>. Mediante análisis de PCR-RFLP se detectó este alelo mutado en garrapatas individuales, la frecuencia de este alelo fue más alta en la cepa Cz<sup>79</sup>, a partir de estos hallazgos, se sugirió que la resistencia a piretroides en la cepa Cz debida a la esterasa CzEst9 puede depender más de la concentración de esta esterasa que de la presencia de un alelo mutado<sup>76</sup>.

El mecanismo que interviene en la resistencia a organofosforados en la cepa Tuxpan es diferente del que confiere a la cepa Cz un nivel bajo de resistencia a coumaphos<sup>66</sup>.

El mecanismo de insensibilidad de sitio blanco que consiste en una sustitución Phe→Ile en el canal de sodio dominio III segmento S6<sup>80,81</sup>, se ha detectado primordialmente en dos cepas altamente resistentes a permetrina: Corrales y San Felipe, que mostraron patrones polimórficos, estas cepas han sido seleccionadas para resistencia a permetrina durante varias generaciones<sup>75</sup>, y tienen una alta incidencia del alelo sustituido en el canal de sodio, lo cual indica un fuerte mecanismo kdr<sup>66,81</sup>.

La cepa Mora, altamente resistente a piretroides (cipermetrina, permetrina) y medianamente a organofosforados (coumaphos)<sup>20</sup>, muestra una actividad de esterasas aumentada, en comparación con la cepa susceptible<sup>65</sup>, aunque no se ha estudiado si en esta cepa también está presente la mutación del gen en el canal de sodio.

La cepa Cz tiene un nivel moderado de resistencia a permetrina comparada con las cepas que poseen la mutación del canal de sodio: San Felipe y Corrales<sup>75</sup>. La sustitución en el gen hipotético codificante de carboxilesterasa en *B. microplus*, conocido ahora como CzEst9 ocurre a mayor frecuencia en la cepa Cz que en la San Felipe<sup>78</sup>, la incidencia de este mecanismo de resistencia a piretroides mediado por esterasa en la cepa Cz<sup>79</sup> podría sugerir que garrapatas *Boophilus microplus* resistentes a organofosforados cuya resistencia es debida a un aumento de la actividad de carboxilesterasa, al ser seleccionadas con un acaricida de diferente mecanismo de acción, como lo es un piretroide, desarrolla la resistencia a este último a partir de un mecanismo mediado por esterasas, aunque también puede estar presente el mecanismo de resistencia de insensibilidad de sitio blanco.

Los estudios de los mecanismos genéticos de la resistencia en cepas mexicanas de *Boophilus microplus* arriba mencionados indican que la resistencia presenta heterogeneidad genética entre las diferentes cepas<sup>65,66,75,81</sup>. Lo cual sugiere que la resistencia se desarrolló independientemente en esas poblaciones<sup>82</sup> con distintas soluciones genéticas<sup>83</sup>.

De acuerdo con lo anterior, en las cepas mexicanas de laboratorio resistentes a los acaricidas organofosforados y piretroides, existen al menos dos mecanismos de resistencia, mediados por al menos dos genes; además, pareciera ser que la presencia de estos genes depende de la manera en que ocurre la selección, ya sea seleccionar para la resistencia a un solo acaricida o, una vez que la cepa es resistente a un acaricida, seleccionar para su resistencia a otro, con diferente mecanismo de acción<sup>75</sup>.

### **1.9. Genética poblacional de la resistencia.**

Dentro de cualquier ecosistema integrado por parásitos, existen dos sub-poblaciones<sup>84</sup>. Una de ellas se encuentra desarrollando su fase parasitaria, la otra es la que se mantiene en estado libre. Ambas sub-poblaciones son interdependientes. La sub-población de estadios libres (huevo y larvas) no está directamente afectada por la aplicación de acaricidas, o antihelmínticos, por lo cual se dice que se encuentra en 'refugio'<sup>85</sup>.

Esto ocurre siempre independientemente de la composición genotípica de la sub-población y de que existan individuos en muy baja frecuencia capaces de resistir niveles más altos del químico (etapa de desarrollo).

Muchos individuos en estado libre, pueden perderse como consecuencia de condiciones ambientales (calor, rayos solares, déficit de humedad), depredadores o, simplemente por que no tuvieron éxito con el huésped (bovino). Una vez en el animal, los individuos resistentes estarán también sujetos a pérdidas provocadas por la inmunidad del mismo. Finalmente, sólo aquellos individuos que han sido expuestos a químicos y que han desarrollado exitosamente su fase parasitaria, tendrán relevancia epizootológica ya que producirán nuevas generaciones que aumentarán la frecuencia de resistentes.

Es muy importante considerar la resistencia como un fenómeno de población más que individual. Dentro de la población de individuos resistentes pueden encontrarse individuos sensibles. Esto significa que, cuando la población en 'refugio' es pequeña, el uso de químicos puede llevar a una rápida selección de resistencia y al contrario, cuando

la población en 'refugio' es grande, la selección para resistencia es menor, de forma que los individuos susceptibles producirán un mayor efecto de dilución de la resistencia.

Ambas sub-poblaciones son dinámicas y varían cualitativa y cuantitativamente en sucesivas estaciones y años. La emergencia de la resistencia a químicos no sólo depende de la población de individuos sobrevivientes a los tratamientos, sino también del tamaño y la composición de las poblaciones en 'refugio' (susceptibles)<sup>85</sup>.

El tipo de evolución genética que sigue a la resistencia puede ser poligénica o monogénica, en el primer caso, la evolución es más gradual y lenta, mientras que si es determinada por un solo gen la selección es súbita y de aparición más rápida, esto ocurre porque cuando la estructura es poligénica hay más genotipos con alelos S (susceptibles) que no son eliminados completamente por el tratamiento antiparasitario y pueden contribuir a las generaciones futuras<sup>6</sup>.

Si se parte del criterio que la resistencia es monogénica, o sea que está ligada a un solo gen, pueden existir tres genotipos en una población:

1. Homocigóticos susceptibles (SS). Presentes muy frecuentemente en aquellas poblaciones donde no existe historia de aplicación del producto químico.
2. Heterocigóticos susceptibles-resistentes (SR).
3. Homocigóticos resistentes (RR). La frecuencia de individuos resistentes se incrementa de manera progresiva y el insecticida pierde su efectividad.

La resistencia a acaricidas, es entonces, una respuesta fenotípica resultado de la selección mediante los pesticidas, de genotipos específicos que regulan o refuerzan un mecanismo de defensa particular<sup>86</sup>.

No se sabe cuantos genes pueden causar resistencia. Los datos de esterases y citocromo P450s sugieren que muchos genes pueden producir el mismo tipo de resistencia<sup>87</sup>. Cómo se distribuyen los genes resistentes dentro y entre poblaciones tampoco es claro y requiere más estudios.

El cambio en la tasa de la frecuencia alélica en una población, depende de la frecuencia alélica inicial, la dominancia, la adaptación relativa de los distintos genotipos y la estructura de la población<sup>57</sup>.

De particular importancia es entender el flujo de los genes de resistencia y los costos biológicos de la resistencia porque sin esta información no será posible diseñar programas de control<sup>88</sup>.

Medir la frecuencia inicial de los alelos de resistencia en una población antes de la selección a un acaricida es muy difícil. El fenotipo de resistencia, se detecta sólo cuando la resistencia se ha desarrollado ya, es decir una vez que el acaricida se ha utilizado. Basándose en la teoría de que la frecuencia de cualquier alelo previa a la selección se mantiene en equilibrio entre la generación de nuevos alelos por mutación y la selección es en contra de los genotipos heterocigóticos (porque los homocigotos resistentes son tan raros que no se toman en cuenta), algunos autores han supuesto frecuencias iniciales del alelo R de 0.001<sup>89</sup>, o de 0.005<sup>90</sup>.

El nivel de dominancia a un pesticida puede cambiar, dependiendo de algunas variables ambientales, como la dosis. La mayoría de los genes que contribuyen a la resistencia de las toxinas son recesivos o muestran dominancia incompleta; y, tanto los individuos SS, como los SR son generalmente susceptibles a los acaricidas, sólo los homocigotos (RR) son difíciles de eliminar. La dominancia efectiva, determina el grado de dominancia a través del nivel de mortalidad (ML) para una concentración dada de acaricida<sup>91</sup>.

$D_{ML} = (ML_{RS} - ML_{SS}) / (ML_{RR} - ML_{SS})$ .  $D_{ML}$  varía entre 0 y 1 (0= la resistencia es recesiva y 1= la resistencia es dominante)<sup>91</sup>.

En una escala de evolución en el tiempo, aparentemente las plagas desarrollarán múltiples y diversos mecanismos para sobrevivir a temperaturas extremas, químicos y otras tensiones medioambientales. De esta manera, se esperaría que la mayoría de las plagas desarrollen resistencia a la mayoría de los plaguicidas si se sujetan a una selección sostenida y adecuada<sup>92</sup>. Se puede suponer que el desarrollo de la resistencia es casi inevitable y el punto no es si se desarrollará resistencia sino, cuándo tendrá lugar.

### 1.10. Simulación de resistencia a acaricidas en *Boophilus microplus*.

En el caso de *Boophilus microplus*, los modelos desarrollados para la dinámica de las poblaciones<sup>12,9,7</sup> muestran la importancia de las medidas de control en las plagas. Sin embargo no se han desarrollado modelos para conocer la evolución de la resistencia de este parásito a los acaricidas, como en otro tipo de plagas donde han sido utilizados para evaluar diferentes opciones para el manejo de la resistencia<sup>6,94,95,96</sup>. A través de ellos se ha mostrado por ejemplo que reducir el uso de pesticidas es uno de los elementos esenciales en cualquier programa de manejo de resistencia.

Con los resultados de los modelos de simulación en *B. microplus*<sup>7,8,9,10,13</sup> se puede decir que cuando no hay resistencia a acaricidas, ni la migración ni la inducción de inmunidad por parte del huésped son importantes<sup>7</sup>, sin embargo, cuando existen garrapatas resistentes a un acaricida, el que sobrevivan parásitos susceptibles, a partir de migraciones desde poblaciones no tratadas, es crucial para mantener la efectividad del mismo<sup>13</sup>.

El proceso de estimación de la influencia de los factores biológicos y operacionales que aumentan los genotipos resistentes en la población expuesta a acaricidas valora el riesgo de la evolución de resistencia<sup>93</sup>. Dentro de los factores genéticos y biológicos que no pueden manipularse están el número de genes de resistencia, su frecuencia en la población y otras características biológicas de la garrapata y el huésped. Sólo pueden controlarse las dosis del acaricida (concentración y frecuencia), la proporción de las garrapatas expuestas a los acaricidas (a través de la proporción de animales tratados) y otras prácticas que pueden alterar el crecimiento y adaptabilidad de los genotipos resistentes, como por ejemplo disminuir la 'tasa de encuentro' de las garrapatas con el huésped (bovino), o mantener poblaciones susceptibles<sup>7,95</sup>.

### 1.11. La estrategia Dosis alta-Refugio.

La estrategia dosis alta-refugio, consiste en exponer una parte de la población de garrapatas a una concentración alta de acaricidas, mientras se mantiene otra parte de la población en un refugio donde no se trata con acaricidas. Si estas poblaciones están a una distancia cercana, se espera que las garrapatas susceptibles (SS) que sobreviven en los huéspedes no tratados se apareen con los resistentes (RR) sobrevivientes de los huéspedes tratados, de forma que las crías heterocigóticas (SR) al ser tratadas con una dosis alta de acaricida no sobrevivan. Según la teoría de genética de poblaciones<sup>97,98</sup> y experimentos con la toxina de *Bacillus thuringiensis*<sup>93,99</sup>, esta estrategia retardará la resistencia si se implementa apropiadamente. Así, la estimación del riesgo de resistencia a un agente acaricida es similar a predecir la vida efectiva de una tecnología dada para controlar las garrapatas.

La estrategia dosis alta-refugio tiene tres supuestos esenciales<sup>100</sup>:

- i. Los genes de resistencia deben ser tan raros que más bien provengan de los individuos heterocigóticos (un individuo heterocigoto RS sólo tiene una copia de el gen de resistencia)
- ii. Los genes de resistencia deben ser casi recesivos en presencia de dosis altas del acaricida (dominancia efectiva)<sup>91</sup>. La supervivencia de los RS es baja.
- iii. Los adultos se aparean aleatoriamente, de forma que se obtenga una gran cantidad de heterocigóticos RS.

La meta de la estrategia dosis alta-refugio es asegurar que la dominancia efectiva de todos los alelos resistentes se aproxime a cero. Si el acaricida no elimina a los heterocigóticos, estos individuos serán más numerosos en la población, aumentando la tasa de evolución de la resistencia. Bajo estas circunstancias, los heterocigóticos se convierten en una gran fuerza para el desarrollo de la resistencia, a menos que se produzca un gran número de adultos susceptibles (SS) en refugios, para reducir la frecuencia de los alelos R. La idea es que se elimine a los RS, si estos individuos no se

aparean, entonces los adultos RR tendrán más posibilidades de aparearse con los individuos SS, dando como resultado individuos SR que pueden eliminarse por medio de la dosis alta del acaricida <sup>101</sup>.

Los factores críticos del sistema son entonces, el tamaño del refugio con respecto a la población tratada, la cantidad de garrapatas que se aparean aleatoriamente y que ovipositan aleatoriamente (distancia entre las dos poblaciones), la frecuencia de los alelos resistentes R y la mortalidad de los tres genotipos (SS, RR y RS) causada por el acaricida (dosis).

En *Boophilus microplus* no se ha desarrollado ningún modelo para probar esta estrategia de dosis alta-refugio, para lo cual es primordial determinar si en estas garrapatas se puede considerar también la dominancia efectiva, de tal forma que al aumentarse la dosis de un acaricida la resistencia a ese acaricida sea casi recesiva. En tal caso podría intentarse esta estrategia para retardar la aparición de resistencia.

De los modelos desarrollados para probar esta estrategia para retardar la resistencia de los parásitos del maíz y algodón transgénico para las toxinas de *Bacillus thuringiensis* <sup>97,102,103,104,105</sup>, el modelo más acorde a la dinámica del ciclo de *Boophilus microplus* es el desarrollado para *Ostrinia nubilalis* <sup>105</sup> que maneja parámetros como la migración tanto de machos como de hembras antes del apareo y la de hembras después del apareo, situación semejante a la de *Boophilus microplus*, pues las hembras repletas al desprenderse pueden distribuirse en el terreno de la misma manera en que se distribuyen los animales tratados o no tratados y las larvas en fase parásita pueden subir a los animales tratados o no tratados dependiendo de la manera en que estén distribuidos. Además en este modelo es posible introducir el efecto inmunológico natural o por vacuna en los animales no tratados con el acaricida, ya que este factor no influye en la selección de la resistencia al acaricida en cuestión.

## II. MATERIAL Y MÉTODOS

El proyecto se llevó a cabo en dos fases; primeramente se caracterizó mediante un experimento, el tipo de herencia de la resistencia a flumetrina. Esta fase se desarrolló en el Centro nacional de Parasitología ubicado en Jilotepec, Morelos. Posteriormente se elaboró un modelo determinístico con objeto de predecir el número de generaciones que tarda el alelo R (de resistencia) en alcanzar una frecuencia de alrededor de 0.5, que indica que la población es resistente<sup>105</sup>.

### 1. PRIMERA FASE.

**Modo de herencia de la resistencia a flumetrina en la cepa Aldama de *Boophilus microplus*.**

**1.1. Cepas de garrapatas:** Se utilizaron dos cepas de *Boophilus microplus*. La cepa susceptible (SS) se aisló de una población de campo en Chiapas y mostró ser susceptible a organofosforados y piretroides. La cepa resistente (RR) Aldama fue aislada originalmente de una población resistente a flumetrina en Tamaulipas, México, que desarrolló resistencia en respuesta a los tratamientos intensivos con flumetrina en esa zona<sup>43</sup>. Esta cepa se cultivó en el laboratorio del Centro Nacional de Parasitología ubicado en Jiutepec, Morelos, durante nueve generaciones, bajo presión de selección con flumetrina para eliminar los individuos susceptibles y mantener la resistencia. En cada generación se utilizaba para seleccionar la CL<sub>50</sub> (Concentración Letal 50%. Concentración del tóxico que elimina el 50% de los individuos) calculada con las larvas obtenidas. Las sobrevivientes continuaban su ciclo sobre un bovino.

**1.2. Acaricida:** Se utilizó flumetrina, un piretroide de tercera generación<sup>106</sup>. Se eligió este acaricida debido a que en las pruebas con paquete de larvas, hechas para los piretroides cipermetrina, deltametrina y flumetrina así como para el organofosforado coumaphos; la cepa Aldama sólo mostró resistencia a flumetrina.

Para formular las diferentes dosis utilizadas en el experimento se usó flumetrina en grado técnico de pureza al 58.78%. Primero se preparó una solución madre del acaricida, con una mezcla de aceite de olivo (solvente primario) y tricloroetileno (solvente volátil) a razón de 1:2. La dosis más alta utilizada para el bioensayo se preparó diluyendo la solución madre con el volumen adecuado de la mezcla aceite de olivo-tricloroetileno y las subsecuentes dosis se prepararon a través de diluciones en serie con la mezcla disolvente.

**1.3. Cruzas.** Con las larvas de las cepas Susceptible (SS), Resistente (RR), las cruzas recíprocas  $F_1$  (RS, SR) y las  $F_2$  (RSxRS y SRxSR), se aplicaron aleatoriamente<sup>1</sup> a un total de seis bovinos machos con un peso de 250 Kg. (Cuadro 1). Las cruzas recíprocas tuvieron como objetivo evaluar efectos maternos y de ligamiento sexual. Dado que se requería analizar las seis cepas al mismo tiempo, se obtuvieron en dos etapas:

**1.3.1. Cruzas. Primera etapa.** Se infestaron dos bovinos con 1 g de larvas (20 000 aproximadamente) cada uno<sup>107</sup>, de las cepas Chiapas (SS) y Aldama (RR), con un pincel de pelo de camello diferente para cada cepa, en la línea media del lomo de cada animal. Las larvas tenían 21 días de edad al momento de la infestación. Cada bovino se aisló en un corral individual dentro de un cobertizo. Siete días después se colectaron las metaninfas de cada una de las cepas, éstas se alojaron por separado en cajas de *petri* de 9 cm de diámetro, previamente marcadas con la cepa correspondiente, que se incubaron a  $25 \pm 2$  ° C y 90 % HR (Humedad Relativa) hasta que mudaron a adultas. Se separaron por sexos en frascos marcados con la cepa correspondiente, para hacer los cruzamientos; el sexo se determinó visualmente con ayuda de un microscopio de disección, durante ocho días consecutivos, conforme iban mudando a adultos, se fueron haciendo los cruzamientos entre 204 machos RR con 464 hembras SS (1: 2.27) (RS) y 226 machos SS con 494 hembras RR (1: 2.18) (SR), en otros frascos previamente marcados con la cruce correspondiente.

---

<sup>1</sup> Los números aleatorios se obtuvieron con una calculadora científica HP® modelo 30S

Cuadro 1. Cruzas entre las cepas de *Boophilus microplus* Aldama (resistente a flumetrina) RR y Chiapas (susceptible a flumetrina) SS.

Cepa	Cruzadas	
	Machos	Hembras
Aldama (Resistente) RR	R	R
Chiapas (Susceptible) SS	S	S
F <sub>1</sub> RS <sup>a</sup>	R	S
F <sub>1</sub> SR <sup>b</sup>	S	R
F <sub>2</sub> RSXRS <sup>c</sup>	RS	RS
F <sub>2</sub> SRXSR <sup>d</sup>	SR	SR

<sup>a</sup>F<sub>1</sub>: Progenie de cruzas entre 203 machos RR con 414 hembras SS (1: 2.06)

<sup>b</sup>F<sub>1</sub>: Progenie de cruzas entre 193 machos SS con 388 hembras RR (1: 2.01)

<sup>c</sup>F<sub>2</sub>: Progenie de cruzas entre machos RS con hembras RS.

<sup>d</sup>F<sub>2</sub>: Progenie de cruzas entre machos SR con hembras SR.

Los adultos marcados como RS y SR fueron transferidos a otros dos bovinos machos a los que previamente se les había colocado una manga en cada lado a la altura de la sexta costilla en la parte dorsal, con objeto de reducir el área de infestación y tener mayor control de las hembras repletas. Las mangas, de tela de jersey, se colocaron sobre un trayecto en la piel rasurada con una navaja de 3 cm del perímetro del círculo con un diámetro de 20 cm; los bordes de la tela y la piel del animal se impregnaron con Resistol 5000®. Por último se cerraron con una liga.

Ocho días después de la infestación con las cruzas mencionadas, se comenzaron a coleccionar las hembras repletas de los cuatro bovinos, esto se hizo durante los nueve días siguientes. Las hembras repletas se alojaron individualmente para su oviposición, en cada uno de los 24 pozos de cajas de policarbonato con tapa, que se incubaron a  $25 \pm 2^\circ \text{C}$  y 90% HR durante los 20 días siguientes. El día 21 después de la recolección, se seleccionaron aleatoriamente las masas ovigeras de 48 hembras en cada uno de los grupos genéticos, se pesaron con una báscula analítica y fueron colocados en viales de vidrio de 5 ml etiquetados y cubiertos con una torunda de algodón. Los huevos se incubaron en las mismas condiciones que las hembras hasta que eclosionaron, y se conservaron en la incubadora hasta que las larvas tuvieron 21 días de edad, para iniciar la segunda etapa.

**1.3.2. Cruzas. Segunda etapa.** Se infestaron cuatro bovinos machos de aproximadamente 250 Kg. con 1g de larvas (20,000 larvas)<sup>107</sup> de las cepas Aldama (RR) y Chiapas (SS) y las cruzas F<sub>1</sub> (cepas RS y SR), una cepa distinta en cada bovino. Las larvas, de 21 días de edad se colocaron a lo largo del dorso de cada animal sobre la línea media utilizando un pincel de pelo de camello. Cada bovino fue colocado en un corral individual dentro de un cobertizo. Las metaninfas de las cepas SS y RR se coleccionaron siete días después, fueron incubadas en cajas de *petri* de 9 cm de diámetro a  $25 \pm 2^\circ \text{C}$  y 90% HR hasta que mudaron a adultas, después de separarlas por sexos, se hicieron las cruzas recíprocas entre 203 machos RR con 414 hembras SS (1:2.06) (RS) y 193 machos SS con 388 hembras RR (1: 2.01) (SR). Estos cruzamientos se transfirieron a otros dos bovinos utilizando el mismo procedimiento que en la primera etapa.

Ocho días después de la infestación con los adultos, se procedió a recolectar las hembras repletas de los seis animales con las cepas RR, SS, RS, SR, RR x RS y SR x SR, siguiendo el procedimiento descrito en la primera etapa, cuando las larvas tuvieron 14 días de edad, se llevaron a cabo los bioensayos con flumetrina utilizando la prueba de paquete de larvas recomendado por la FAO<sup>108,109</sup>

**1.4. Bioensayos.** Las larvas de las cepas susceptible, resistente y su progenie híbrida F<sub>1</sub> y F<sub>2</sub> se probaron con cinco concentraciones de flumetrina (0, 0.0075, 0.00150, 0.00300, 0.00600 y 0.01200 µg/g) de la manera siguiente: para cada bioensayo se hicieron dos réplicas de cada dosis junto con el testigo que sólo contenía la mezcla aceite de oliva-tricloroetileno. Con estas concentraciones se impregnaron rectángulos de papel filtro Whatman No 1 cortados a 9 x 8 cm. Se identificaron cada uno de los papeles con la dosis respectiva y su réplica, la solución fue dispersada sobre él con una pipeta de 1 ml. Cada rectángulo se colocó en una charola sosteniéndose con una pinza tipo 'Bulldog', las charolas se pusieron a secar bajo una campana de aislamiento durante 2 h para que el solvente volátil (tricloroetileno) se evaporara totalmente y sólo quedara la mezcla aceite de oliva-flumetrina. Una vez secos los papeles se doblaron en el centro y se cerraron con pinzas 'Bulldog' en tres lados para formar así un paquete. Dentro de cada uno de estos paquetes se colocaron aproximadamente 100-200 larvas de 14 días de edad utilizando pinceles de pelo de camello. Se utilizaron diferentes pinceles para cada una de las distintas cepas. La base del pincel fue rodeada con cinta engomada (masking-tape) para evitar que las larvas subieran por el mango, el pincel se sacudía para que las larvas cayeran directamente al papel sin que el cepillo tocara el paquete, para evitar contaminación. Una vez dentro las larvas, el lado abierto se selló con otra pinza 'Bulldog' formando así un sobre totalmente cerrado. Los sobres se colocaron en charolas y se incubaron a 25 ± 2° C y 90% HR por 24h. Después de este tiempo, se abrieron los paquetes para registrar la mortalidad y supervivencia de las larvas. Todas las larvas activas se atraparon con el lado pegajoso de un rectángulo cinta engomada de aproximadamente 2 x 3 cm y se contaron con ayuda de un contador manual. Las larvas que quedaron en el papel filtro, se examinaron cuidadosamente, estimulándolas, ya sea con la punta de un lápiz o soplando muy levemente sobre ellas, si se movían,

eran contadas como vivas, las demás se contabilizaron como muertas. Para cada una de las cepas se registró el número de vivas y muertas en cada una de las dosis y sus réplicas.

**1.5. Variables reproductivas.** Para estimar el porcentaje de eclosión, todo el resto de la masa ovígera dentro de cada vial se congeló y homogeneizó. Después se tomó una muestra de aproximadamente 100 huevos de cada vial y se contaron los huevos eclosionados y no eclosionados, con ayuda de un microscopio de disección. Todos los conteos se llevaron a cabo por la misma persona.

### 1.6. Análisis de los datos.

**1.6.1. Modo de herencia de la resistencia a flumetrina de la cepa Aldama de *B. microplus*.** Para probar la hipótesis de un solo gen de resistencia, se utilizó la prueba no paramétrica de cruzamientos  $F_2$  propuesta por Collins<sup>110</sup>. Este método no requiere supuestos acerca de normalidad, interacciones epistáticas, homogeneidad de varianzas ni de escala óptima. Por lo cual el análisis de características cualitativas en cruzamientos entre dos líneas puede hacerse con los datos sin transformar. Los valores esperados para mortalidad bajo la hipótesis de un gen simple se calcularon para las  $F_2$  en cada dosis siguiendo la ecuación siguiente:

$$E(p_i F_2) = NF_2 [p_i P_1 + 2p_i F_1 + p_i P_2] / 4$$

Con la variable dicotómica  $i = 0, 1$ ;

$p_i P_1$  y  $p_i P_2$  = las proporciones del parental 1 (resistente) y 2 (susceptible);

$p_i F_1$  = las proporciones de los híbridos;

$NF_2$  = el total de individuos en  $F_2$

Se calculó el valor del estadístico de prueba:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^2 \left( O(p_i F_2) - E(p_i F_2) \right)^2 / E(p_i F_2) \text{ que se distribuye como } J_i$$

cuadrada con 1 grado de libertad.

Los resultados de los bioensayos se sometieron a un análisis probit<sup>110</sup> con el paquete SPSS Versión 10 que involucra la transformación probit del porcentaje de mortalidad y la transformación  $\log_{10}$  (dosis)<sup>112,113</sup> para establecer los valores de la CL<sub>50</sub> y la CL<sub>99</sub>, junto con sus límites de confianza al 95%. Además se calcularon las amplitudes de estos límites, para establecer la precisión de los valores de las Concentraciones Letales.

Las líneas de mortalidad se consideraron idénticas cuando no se rechazó la prueba de paralelismo a un nivel de probabilidad  $P > 0.05$ . Después de que se determinó la concentración letal de cada cepa, se calculó el factor de resistencia (FR), dividiendo los valores de CL<sub>50</sub> de RR, RS, SR, RSxRS and SRxSR entre la CL<sub>50</sub> de la cepa susceptible Chiapas (SS) utilizada como valor base.

Se obtuvo la dominancia efectiva<sup>91</sup> para la resistencia a flumetrina en la cepa Aldama de *B. Microplus*:

$D_{ML} = (ML_{RS} - ML_{SS}) / (ML_{RR} - ML_{SS})$ .  $D_{ML}$  varía entre 0 y 1 (0= la resistencia es recesiva y 1= la resistencia es dominante)<sup>91</sup>.

**1.6.2. Variables reproductivas.** Los pesos de la masa ovígera de cada hembra se examinaron mediante un análisis de varianza simple y prueba de Tukey de separación de medias. El mismo procedimiento se aplicó al porcentaje de eclosión pero con la transformación  $\arcsen \sqrt{p}$  para obtener normalidad y homogeneidad de varianzas, se llevaron a cabo pruebas de normalidad de Lilliefors, con el procedimiento Explore del paquete SPSS Versión 10 para las variables peso de masa ovígera y porcentaje de eclosión transformado<sup>114</sup>. La homogeneidad de varianzas se probó con el estadístico Levene dentro del procedimiento ANOVA del mismo paquete estadístico.

## 2. SEGUNDA FASE.

### **Modelo de simulación de resistencia de la cepa Aldama de *Boophilus microplus* a acaricidas.**

Para analizar el proceso de la evolución de la resistencia a los acaricidas en las garrapatas *Boophilus microplus*, se utilizó un modelo adaptado de Ives y Andow<sup>105</sup>, con

una población dividida en dos subpoblaciones de animales (hábitats), donde una de ellas no es expuesta a los acaricidas (refugio), mientras que la otra se trata con acaricidas.

**2.1. El modelo.** Cuando las hembras repletas caen, ovipositan indistintamente, y al eclosionar las larvas machos y hembras pueden migrar a ambos hábitats de acuerdo con su proporción. En los animales tratados existe una selección y una supervivencia dependiente del genotipo, mientras que en los animales no tratados la supervivencia es la misma además de no existir selección, aunque puede darse un tipo de inmunidad natural o por vacuna que no produce selección, pero disminuye la tasa de supervivencia (Figura 3).

Sea  $P(t) = \begin{pmatrix} p_1(t) \\ p_2(t) \end{pmatrix}$  el vector de frecuencias del alelo de resistencia en los animales tratados y no tratados (refugio) en la generación  $t$  ( $p_1(t)$  y  $p_2(t)$  respectivamente). Similarmente sea

$X(t) = \begin{pmatrix} x_1(t) \\ x_2(t) \end{pmatrix}$  el vector de las garrapatas en fase parásita en los animales tratados y no tratados (refugio) en la generación  $t$  antes de su migración, donde se supone una proporción de sexos 50:50.

**2.2. Migración.** El movimiento (migración) de machos y hembras entre los animales tratados y refugio está dado por las matrices  $M_m$  y  $M_h$ , cuyos elementos  $ij$ -ésimos ( $i, j = 1$  para los tratados y  $2$  para los no tratados) de acuerdo con la proporción de la población de machos y hembras en los animales tipo  $i$  que se mueven a los animales tipo  $j$ ,

específicamente: 
$$M_m = \begin{bmatrix} \frac{z_{1s}}{z_{1s} + z_{1d}} & \frac{z_{1d}}{z_{1s} + z_{1d}} \\ \frac{z_{2d}}{z_{2s} + z_{2d}} & \frac{z_{2s}}{z_{2s} + z_{2d}} \end{bmatrix} \quad (S1)$$

donde  $z_{1s}$  son el número de machos provenientes de los hábitats tratados que se suben en los animales tratados y  $z_{2s}$  son el número de machos provenientes de los hábitats no

tratados que se suben en los animales no tratados,  $z_{1d}$  y  $z_{2d}$  son el número de machos que se dispersan hacia los animales tratados y no tratados respectivamente. El número de machos que se quedan y se van de los hábitats tratados y no tratados son:

$$\begin{aligned}
 z_{1s} &= (1-r_{1m}+(1-Q)r_{1m})x_1(t) \\
 z_{1d} &= (1-Q)r_{2m}x_2(t) \\
 z_{2s} &= (1-r_{2m} + Qr_{2m})x_2(t) \\
 z_{2d} &= Qr_{1m}x_1(t)
 \end{aligned}
 \tag{S2}$$

donde  $r_{1m}$  y  $r_{2m}$  son las proporciones de machos que se dispersan de las áreas natales tratadas y no tratadas respectivamente, y  $Q$  es la proporción de animales no tratados. La matriz  $M_h$  se define similarmente para el movimiento de las hembras.

Animales tratados (1-Q)  
(Q)

Animales no tratados Refugio

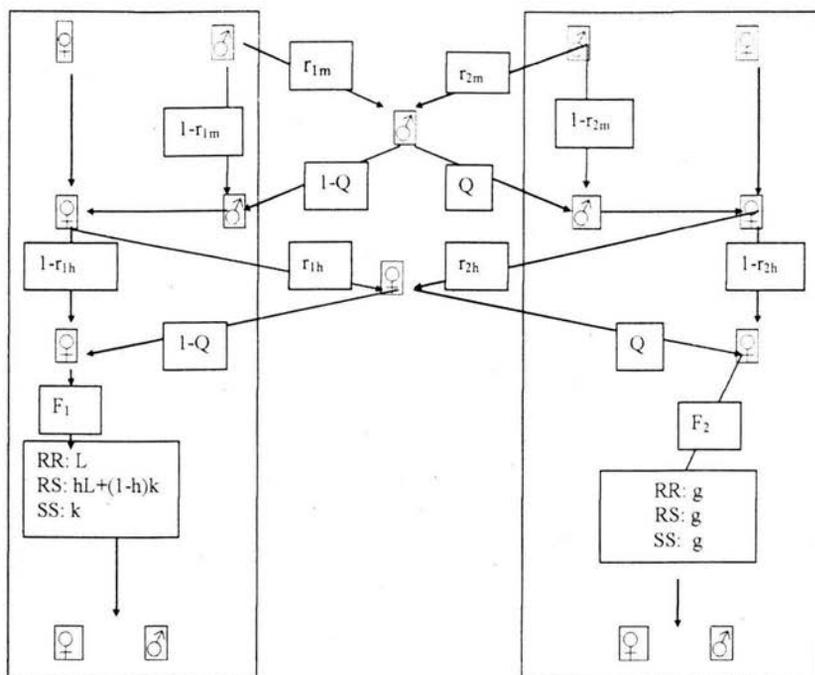


Figura 3. Modelo para evolución de resistencia en garrapatas *Boophilus microplus* con estrategia de alta - dosis refugio.

Una proporción del ganado no se trata con acaricidas (Q), son los llamados 'refugio'. Una proporción de machos  $r_{1m}$  y  $r_{2m}$  y hembras  $r_{1h}$  y  $r_{2h}$  migran desde sus hábitats originales, estas larvas en estado parásita se redistribuyen entre los animales tratados y no tratados en proporción a la cantidad de animales en cada grupo. Mudan a adultos y se aparean aleatoriamente en sus hábitats, de las hembras repletas, una fracción  $r_{1h}$  proveniente de los animales tratados y otra  $r_{2h}$  proveniente de los no tratados se dispersan y se redistribuyen para ovipositar en proporción a los hábitats. Las hembras producen huevos de acuerdo con su fecundidad  $F_1$  y  $F_2$ , éstos eclosionan y las larvas que suben a los animales que son tratados con acaricida sobreviven de acuerdo con su genotipo, los homocigóticos resistentes tienen una supervivencia de  $L$ , los homocigóticos susceptibles  $SS$  de  $k$ , y los heterocigóticos  $RS$  tienen una supervivencia de  $hL+(1-h)k$ , donde  $h$  es la expresión de dominancia de la resistencia. Las larvas de todos los genotipos en los animales no tratados tienen la misma supervivencia:  $g$ .

**2.3. Supervivencia.** La selección para resistencia está determinada por la supervivencia de las larvas RR, RS y SS en las áreas tratada y no tratada dado por:

Genotipo	SS	RS	RR
Supervivencia (tratados)	k	Lh +k(1-h)	L
Supervivencia (no tratados)	g	g	g

Donde L y k son las supervivencias respectivas de los fenotipos resistente y susceptible en los animales tratados, h es la dominancia funcional a la dosis dada y g es la supervivencia (debida a inmunidad del ganado natural, por selección o por vacuna) de ambos fenotipos en los animales no tratados.  $\Delta_{RR}$ ,  $\Delta_{RS}$  y  $\Delta_{SS}$  son las matrices cuyos elementos diagonales íesimos son las supervivencias de las larvas RR, RS y SS en los animales de tipo i (i = 1, 2; 1:tratados; 2:refugio).

$$\Delta_{RR} = \begin{pmatrix} L & 0 \\ 0 & g \end{pmatrix}$$

$$\Delta_{RS} = \begin{pmatrix} Lh + (1-h)k & 0 \\ 0 & g \end{pmatrix} \quad (S3)$$

$$\Delta_{SS} = \begin{pmatrix} k & 0 \\ 0 & g \end{pmatrix}$$

Sean  $W_{RR}$ ,  $W_{RS}$  y  $W_{SS}$  los vectores de los números relativos de las supervivencias de las larvas RR, RS y SS en los animales tratados y no tratados. Si se asume apareamiento aleatorio entre los genotipos de cada tipo de animales;

$$\begin{aligned}
W_{RR} &= \Delta_{RR} M_h (P(t) \times (M_m P(t))) \\
W_{RS} &= \Delta_{RS} M_h ((1 - P(t)) \times (M_m P(t)) + P(t) \times (1 - M_m P(t))) \\
W_{SS} &= \Delta_{SS} M_h ((1 - P(t)) \times (1 - M_m P(t)))
\end{aligned} \tag{S4}$$

- donde  $\times$  denota el producto Hadamard<sup>115</sup>.

La ecuación S4 se puede explicar de la siguiente forma. Considere la primera línea ( $W_{RR}$ ):  $M_m P(t)$  es el vector de las frecuencias de resistencia en garrapatas machos en ambos tipos de hábitats (tratados y refugio) cuando se dispersan, mientras que  $P(t)$  es la frecuencia de resistencia en hembras al momento de aparearse (antes de que se dispersen) en sus respectivos hábitats. Entonces,  $M_m P(t) \times P(t)$  es la frecuencia de hembras que producirán huevos homocigóticos RR en ambos tipos de hábitats. Durante la caída de las hembras, antes de la oviposición, las hembras se dispersan a través de los hábitats de acuerdo con  $M_h$ , por lo que la distribución de los huevos homocigóticos es  $M_h(M_h P(t) \times P(t))$ . La supervivencia de los huevos RR está dada por  $\Delta_{RR}$ . Las dos líneas que quedan se derivan similarmente de los genotipos heterocigóticos y homocigóticos susceptibles.

El cambio en las frecuencias de los alelos resistentes está dado por la ecuación recurrente

$$P(t+1) = (W_{RR} + W_{RS}/2) \times (W_{RR} + W_{RS} + W_{SS}) inv \tag{S5}$$

donde *inv* denota el reemplazo de los elementos  $p_{ij}$  del vector  $P(t+1)$  por sus recíprocos ( $1/p_{ij}$ ).

**2.4. Tamaño de población.** La tasa de evolución de la resistencia (ecuación S5) depende de los tamaños de las poblaciones tratada y en refugio, como los tamaños de

población aparecen en en las matrices dado el movimiento de los machos y hembras a través de los dos tipos de hábitats,  $M_h$  y  $M_m$ . El vector de números de larvas dentro de los hábitats tratado y no tratado de acuerdo con la migración y selección  $X'(t)$ , está dado por,

$$X'(t) = (DX(t)) \times (W_{RR} + W_{RS} + W_{SS}) \quad (S6)$$

Donde D es la matriz de la migración entre los tipos de hábitats y su fecundidad:

$$D = \begin{pmatrix} ((1-r_{ih}) + (1-Q)r_{ih})F_1 & (1-Q)r_{2h} \\ Qr_{ih}F_2 & ((1-r_{2h}) + Qr_{2f})F_2 \end{pmatrix}$$

Q es la proporción de animales en refugio o no tratados. (S7)

$DX(t)$  es la distribución de las hembras (por lo tanto de los huevos) después de la migración, y  $W_{RR}$ ,  $W_{RS}$  y  $W_{SS}$  dan los números relativos de cada grupo después de la mortalidad debida al tratamiento.

**2.5. Supuestos del modelo.** El modelo supone que no existen interacciones por dependencia de la densidad. Otro supuesto del modelo es que en ausencia del acaricida, la aptitud de los individuos asociada con los alelos susceptible y resistente no difiere. Un supuesto importante es que la supervivencia de los individuos susceptibles es tan baja que casi todos los alelos resistentes R provienen de los heterocigóticos RS. Aunque para el modelo se asume que el tamaño de la población de garrapatas no afecta la evolución de la resistencia <sup>102</sup>, las simulaciones fueron hechas con una población total de 350 000 larvas en fase parásita (Anexo 1). Sin embargo, para probar este supuesto se ensayaron tamaños de población de hasta 5 000 000, que no cambiaron los resultados.

**2.6. Simulaciones.** Para probar este modelo se utilizaron las condiciones expuestas en el Cuadro 2. El modelo de simulación para la figura 3, se desarrolló con el programa MATLAB® versión 5.2 (Anexo 2).

El modelo se corrió con  $Q = 4\%$ ,  $8\%$  y  $20\%$  de animales en refugio (no tratados), con distintos porcentajes de apareamiento aleatorio y de migración preoviposición ( $r_{ih} = r_{im}$ , para toda  $i$ ): 0.02, 0.2, 0.5, 1.0.

En la primer situación, la supervivencia de las garrapatas en los individuos no tratados fue de 95%. Mientras que en la segunda situación, con una vacuna con 80% de eficacia, la supervivencia de los no tratados fue de 20. Se contó el número de generaciones hasta que la frecuencia del alelo R llegó a 0.5 en el hábitat tratado (1-Q)

103, 105

Cuadro 2. Condiciones iniciales utilizadas para probar el modelo de Dosis alta-refugio en garrapatas *Boophilus microplus*.

Condición	Valor
Frecuencia inicial del alelo R	$P_i(t) = 0.001^{89}$
Densidad de los hábitats tratado y no tratado	1.25 ha/cabeza (unidad animal) <sup>7</sup>
Número de larvas en fase parásita totales/ha	350 000* <sup>7</sup>
Distribución de sexos de larvas en fase parásita	50:50 <sup>104</sup>
Supervivencia de garrapatas en animales no tratados con acaricida con vacuna (80% eficacia)	$g = 0.2^7$
Supervivencia de garrapatas en animales no tratados con acaricida sin vacunar (5% mortalidad)	$g = 0.95$
Proporción de migración	$r_{im}=r_{ih}$ para toda $i$ <sup>105</sup>
Fecundidad de las hembras	$F_1=F_2=50\%^7$
Supervivencia de garrapatas tratadas con una dosis alta	$L = 0.9198^{116}$
Dominancia efectiva.	$h = 0.1^{104, 116}$

\*Anexo 1

### III. RESULTADOS

#### 1. PRIMERA FASE.

**Caracterización de la resistencia a flumetrina en la cepa Aldama de *Boophilus microplus*.**

**1.1. Número de genes controlando la resistencia.** La resistencia a flumetrina en la cepa Aldama de *Boophilus microplus* estuvo probablemente controlada por más de un gen. Los valores de Ji-cuadrada resultantes de la prueba de Collins<sup>110</sup> rechazaron la hipótesis de un gen, excepto en la dosis 0.006 (P=0.301) (Cuadro 3).

**1.2. Efectos maternos y ligamiento sexual.** Las CL<sub>50</sub> de las cruzas recíprocas RS y SR fueron similares (0.004 y 0.0031 µg/g, respectivamente), lo mismo que las pendientes de regresión (2.69 vs 2.10)(P>0.05), por lo que no hubo evidencia de efectos maternos ni ligamiento sexual (Cuadro 4). Los bioensayos en las progenies de las cruzas F<sub>1</sub> entre RR y SS mostraron que a altas concentraciones, las mortalidades de F<sub>1</sub> y F<sub>2</sub> son parecidas a la cepa susceptible. Por el contrario, a menores concentraciones son más similares a la cepa resistente. En el punto medio del eje de las X de la gráfica, la mortalidad fue intermedia comparada con las cepas parentales (Figura 4).

**1.3. Dominancia efectiva.** El cuadro 5 muestra los resultados para el promedio de la dominancia efectiva D<sub>ML</sub>, la dosis comercial (0.003 µg/g) tuvo una dominancia incompleta (D<sub>ML</sub> = 0.594), mientras que fue casi recesiva (0.1376) en la dosis más alta y casi dominante (0.874) en la dosis más baja.

**1.4. Variables reproductivas.** Los análisis de normalidad y de homogeneidad de varianzas de los pesos promedio de masa ovígera resultaron convenientes para ser analizados con un análisis de varianza, así como los porcentajes de eclosión transformados a  $\sqrt{p}$  (cuadro 6). Los promedios de los pesos de la masa ovígera y el porcentaje de eclosión, de las cepas susceptible, resistente y sus cruzas recíprocas se muestran en el cuadro 7. Las diferencias observadas en la masa ovígera se debieron a la cepa de las hembras. Las hembras susceptibles y sus cruzas (RS) tuvieron pesos

( $P < 0.01$ ) más altos que los de las hembras resistentes y sus cruzas (SR), además en esta cepa sólo 16 de las 24 masas ovíferas eclosionaron (66.6%). Los porcentajes de eclosión fueron significativamente ( $p < 0.05$ ) más bajos en las cruzas  $F_1$  (SR y RS) que los de las cepas parentales.

Cuadro 3. Valores esperados de supervivencia obtenidos por el método de Collins<sup>110</sup> y valores observados, y las pruebas de hipótesis para un sólo gen controlando la resistencia de la cepa Aldama de *Boophilus microplus* a flumetrina en cada una de las dosis ( Ji-cuadrada y sus valores de P).

Dosis (µg/g)	Valores Observados en F <sub>2</sub>						
	Número de		Número de%	Mortalidad	E(P <sub>1</sub> F <sub>2</sub> ) <sup>a</sup>	E(P <sub>0</sub> F <sub>2</sub> ) <sup>a</sup> X <sup>2b</sup>	P
	supervi- vientes	muertos					
0.01200	217	636	74.5	250.17	602.83	6.22	1.20 x 10 <sup>-3</sup>
0.00600	446	644	59.0	429.32	660.68	1.07	3.01x 10 <sup>-1</sup>
0.00300	714	271	27.5	581.16	403.84	74.07	7.55 x 10 <sup>-18</sup>
0.00150	754	175	18.8	641.01	287.99	64.25	1.09 x 10 <sup>-15</sup>
0.00075	965	47	4.6	919.33	92.67	24.78	6.43 x 10 <sup>-7</sup>
0	486	4	0.8	464.35	25.65	19.29	1.12 x 10 <sup>-5</sup>

<sup>a</sup>Valores esperados :  $E(p_i F_2) = NF_2 [p_i P_1 + 2p_i F_1 + p_i P_2]/4$  donde  $i = 0, 1$ .  $p_i P_1$  y  $p_i P_2$ : son las proporciones de los parentales 1 (resistente) y 2 (susceptible).  $p_i F_1$ : las proporciones de los híbridos.  $NF_2$ : el total de individuos en F<sub>2</sub>

$$^b \chi^2 = \sum_{i=1}^4 (O(p_i F_2) - E(p_i F_2))^2 / E(p_i F_2) \approx X^2_{(1)}$$

Cuadro 4. Valores de  $CL_{50}$ ,  $CL_{99}$  ( $\mu\text{g/g}$ ), intervalos de confianza 95% (para  $CL_{50}$ ), pendientes y factores de resistencia utilizando flumetrina en contra de las cepas de *Boophilus microplus*, resistente (aldama), susceptible (Chiapas), sus cruzas recíprocas  $F_1$  y las  $F_2$ .

Cepa	$CL_{50}^a$ ( $\mu\text{g/g}$ )	Limites de confianza para la $CL_{50}$	Amplitud de los límites de confianza 95% (para $CL_{50}$ ) <sup>b</sup>	$CL_{99}^a$	Pendiente de la recta	$\chi^2_{(8)}^*$	P	Factor de resistencia <sup>c</sup>
Aldama RR	0.0900	0.0410 - 0.5970	0.5560	0.6500	1.49	15.15	0.056	81.81
Chiapas SS	0.0011	0.0009 - 0.0012	0.0003	0.0027	3.30	16.00	0.042	1.00
$F_1$ RS <sup>d</sup>	0.0040	0.0033 - 0.0052	0.0019	0.0120	2.70	44.18	0.000	3.63
$F_1$ SR <sup>e</sup>	0.0031	0.0022 - 0.0042	0.0020	0.0120	2.10	148.4	0.000	2.81
$F_2$ RSxRS <sup>f</sup>	0.0047	0.0043 - 0.0053	0.0010	0.0180	2.30	14.9	0.061	4.27
$F_2$ SRxSR <sup>g</sup>	0.0055	0.0044 - 0.0073	0.0029	0.0320	1.68	53.6	0.000	4.50

<sup>a</sup> Nivel de concentración en microgramos que elimina el 50% - 99% de las larvas. \* Si la Ji- cuadrada de bondad de ajuste es significativa, los intervalos de confianza se calculan con un factor para heterogeneidad. <sup>b</sup> (Limite Superior-Limite inferior) de  $CL_{95}$ . <sup>c</sup>  $CL_{50}$  de cada cepa dividida entre  $CL_{50}$  de la cepa Susceptible (SS) Chiapas. <sup>d</sup> progenie  $F_1$  de las cruzas entre 203 machos RR con 414 hembras SS (1 : 2.06) (RS). <sup>e</sup> progenie  $F_1$  de las cruzas entre 193 machos SS con 388 hembras RR (1 : 2.01) (SR). <sup>f</sup> progenie  $F_2$  de las cruzas entre machos  $F_1$  RS con hembras  $F_1$  RS. <sup>g</sup> progenie  $F_2$  de las cruzas entre machos  $F_1$  SR con hembras  $F_1$  SR

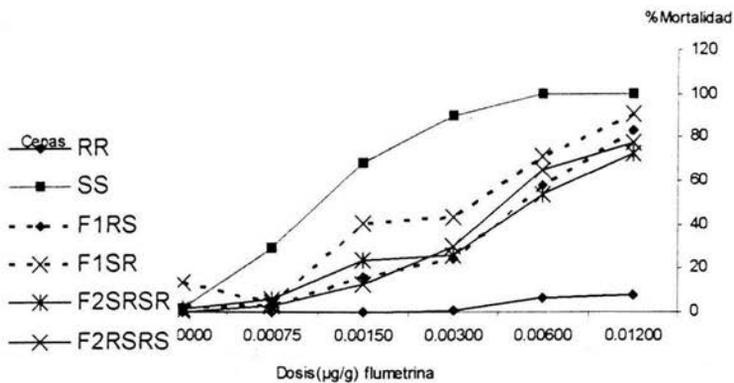


Figura 4. Curvas dosis-mortalidad de las cepas de *Boophilus m.* Aldama (resistente), Chiapas (susceptible), las cruzas reciprocas F1 y las F2, con las distintas dosis de flumetrina.

SS Cepa susceptible (Chiapas). RR Cepa resistente (Aldama). RS progenie F<sub>1</sub> de las cruzas entre 203 machos RR con 414 hembras SS (1 : 2.06). SR progenie F<sub>1</sub> de las cruzas entre 193 machos SS con 388 hembras RR (1:2.01). RRSR progenie F<sub>2</sub> de las cruzas entre machos F<sub>1</sub> RS con hembras F<sub>1</sub> RS. SRSR progenie F<sub>2</sub> de las cruzas entre machos F<sub>1</sub> SR con hembras F<sub>1</sub> SR.

Cuadro 5. Mortalidad (%) y niveles de dominancia efectiva ( $D_{ML}$ ) en la cepas de *oophilus microplus* Aldama resistente (RR), Susceptible (SS) Chiapas y sus híbridos  $F_1$  para cada dosis de flumetrina.

Dosis( $\mu\text{g/g}$ )	% Mortalidad			N( $F_1$ )	$D_{ML}^b$
	Aldama RR	Chiapas SS	$F_1^a$		
0.01200	8.02	100	87.30	821	0.138
0.00600	6.31	100	68.10	830	0.341
0.00300	0.84	90.06	36.60	933	0.599
0.00150	0.00	68.43	27.80	907	0.594
0.00075	0.00	29.94	3.70	758	0.874
0.00000	0.25	1.33	9.70	723	

<sup>a</sup> F progenie  $F_1$  acumulada de las cruzas reciprocas entre RR y SS

<sup>b</sup> Dominancia Efectiva  $D_{ML} = (ML_{RS} - ML_{SS}) / (ML_{RR} - ML_{SS})$ ;  $ML_{RS}$ ,  $ML_{SS}$  y  $ML_{RR}$  son los niveles de mortalidad de los homocigóticos resistentes, heterocigóticos y homocigóticos susceptibles, respectivamente.  $0 \leq D_{ML} \leq 1$ .

Cuadro 6. Resultados de las pruebas de normalidad y homogeneidad de varianzas de las variables reproductivas.

Prueba	Peso de la masa ovigera individual (g) (n = 192)	Porcentaje de eclosión transformado $\arcsen\sqrt{p}$ (n = 192)
Lilliefors	0.0128 <sup>a</sup> (0.103) <sup>b</sup>	0.20 (0.106)
Levene <sup>c</sup>	1.367 (0.259)	2.057 (0.112)

<sup>a</sup> estadístico de prueba. Ho: la variable sigue una distribución normal.

<sup>b</sup> valor de P

<sup>c</sup> prueba la hipótesis nula que la varianza del error de la variable dependiente es igual para todos los grupos g.l. 1=3, g.l. 2 = 188

Cuadro7. Promedios de masa ovigera y porcentajes de eclosión de las hembras *Boophilus microplus* susceptibles, resistentes y sus cruzas reciprocas.

Cepa	Medias del peso de la masa ovigera (g) (n)	Medias de porcentaje de eclosión <sup>c</sup> (n)
Aldama RR	0.148 <sup>a</sup> (48)	75.5 <sup>a</sup> (24)
Chiapas SS	0.195 <sup>b</sup> (48)	79.0 <sup>a</sup> (24)
RS <sup>d</sup>	0.184 <sup>b</sup> (48)	60.6 <sup>ab</sup> (23)
SR <sup>e</sup>	0.165 <sup>a</sup> (48)	43.3 <sup>b</sup> (16)

<sup>a, b</sup> Literales distintas denotan diferencias significativas  $P < 0.05$ . Se utilizó un Análisis de varianza para un criterio de clasificación con prueba de Tukey.

<sup>c</sup> El porcentaje de eclosión se transformó a  $\arcsen \sqrt{p}$  para hacer el análisis de varianza.

<sup>d</sup> progenie F<sub>1</sub> de las cruzas entre 203 machos RR con 414 hembras SS ( 1: 2.06 ) (RS)

<sup>e</sup> progenie F<sub>1</sub> de las cruzas entre 193 machos SS con 388 hembras RR (1: 2.01 ) (SR)

## 2. SEGUNDA FASE.

### **Modelo de simulación de resistencia de la cepa Aldama de *Boophilus microplus* a acaricidas.**

**2.1 El modelo.** El modelo está desarrollado para el caso en que el alelo R es raro ( $P \rightarrow [0,0]$ ) y la resistencia es recesiva ( $h \rightarrow 0$ ), sin embargo, las exploraciones numéricas con el modelo de simulación, mostraron que la ecuación funciona bien cuando la frecuencia inicial promedio de ambas poblaciones del alelo R  $p < 0.2$  y  $h \leq 0.1$  y la supervivencia de los susceptibles ( $k \rightarrow 0$ ).

**2.2 Efecto del porcentaje de refugio y migración sin vacuna en animales no tratados.** Las figuras 5 y 6 muestran los resultados de las simulaciones con 4, 8 y 20% de animales en refugio, sin vacuna (figura 5) y con vacuna de 80% de efectividad (figura 6). En la figura 5 se muestran los resultados de las simulaciones con el modelo descrito en la Figura 3, con la estrategia dosis alta-refugio indican que retrasó hasta 822 generaciones la aparición de la resistencia con 20% de animales en refugio y una migración del 20%, seguida por 791 generaciones con el 8% de refugio y el mismo porcentaje de migración, en cambio, con un porcentaje de migración del 50% y con el 4% de refugio, después de 539 generaciones se presentó la resistencia al acaricida.

**2.3 Efecto del porcentaje de refugio y migración con vacuna en animales no tratados.** Por el contrario, al agregarse a esta estrategia la aplicación de una vacuna con 80% de efectividad en los animales no tratados con acaricidas (refugio), la resistencia se desarrolló en dos generaciones (Figura 6), excepto cuando la migración llegó al 50%, en que el desarrollo de la resistencia fue de 22 generaciones.

**2.4 Tamaño de población.** El tamaño de la población inicial de larvas influyó muy poco en los resultados. Con una población inicial de 10 000 larvas sólo se tuvo una diferencia de 4 generaciones menos que con 350 000 en la corrida con 20% de migración y 20% de animales en refugio, sin embargo, con 5 000 000 de larvas iniciales, el resultado fue el mismo que con 350 000.

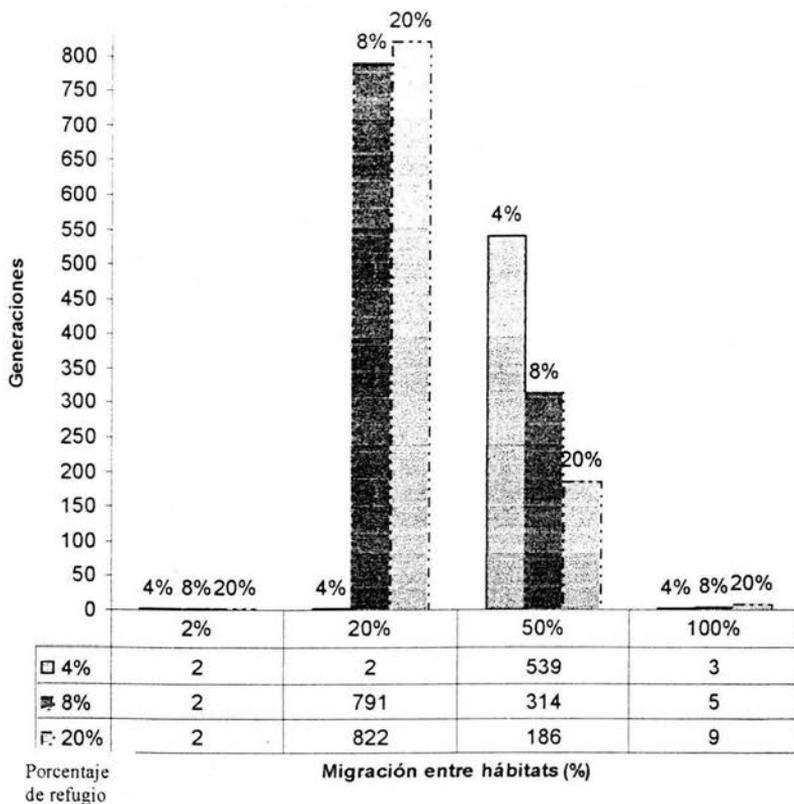


Figura 5. Número de generaciones\* que tarda en desarrollarse la resistencia a acaricidas con estrategia dosis alta-refugio, con distintos porcentajes de refugio (4, 8 y 20%) y migración (2, 20, 50 y 100%)\*\*. Con 95% de supervivencia en refugio.

\*El número de generaciones requeridas para que la frecuencia del alelo R en el hábitat tratado (1-Q) vaya de 0.001 a 0.5.

\*\*Las simulaciones se corrieron con la misma proporción de migración de machos y hembras.

Los valores utilizados en el modelo fueron: dominancia efectiva ( $h$ ) = 0.1, supervivencia de los resistentes en la dosis alta ( $L$ ) = 0.9198, supervivencia de los susceptibles en la dosis alta ( $k$ ) = 0.0001, frecuencia inicial del alelo R ( $p_1 = p_2 = 0.001$ ), número de larvas en fase parásita totales ( $X$ ) = 350 000 ( $x_1 = (1-Q)X$ ;  $x_2 = QX$ ) (Anexo 1), fecundidad de las hembras ( $F_1 = F_2 = 50\%$ )

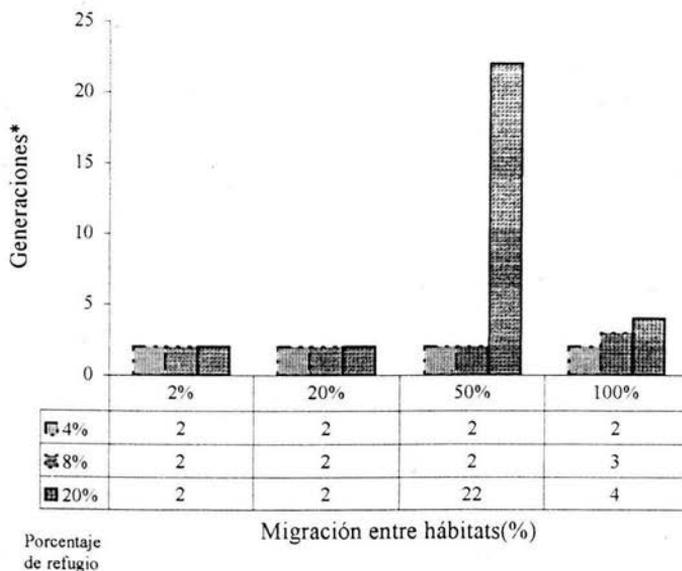


Figura 6. Número de generaciones\* que tarda en desarrollarse la resistencia a acaricidas con la estrategia dosis-refugio, en distintos porcentajes de refugio (4, 8, y 20%) y migración (2, 20, 50 y 100%)\*\* con vacuna (80% efectividad).

\*El número de generaciones requeridas para que la frecuencia del alelo R en el hábitat tratado (1-Q) vaya de 0.001 a 0.5.

\*\*Las simulaciones se corrieron con la misma proporción de migración de machos y hembras.

Los valores utilizados en el modelo fueron: dominancia efectiva ( $h$ ) = 0.1, supervivencia de los resistentes en la dosis alta ( $L$ ) = 0.9198, supervivencia de los susceptibles en la dosis alta ( $k$ ) = 0.0001, frecuencia inicial del alelo R ( $p_1 = p_2 = 0.001$ ), número de larvas en fase parásita totales ( $X$ ) = 350 000 ( $x_1 = (1-Q)X$ ;  $x_2 = QX$ ) (Anexo 1), fecundidad de las hembras ( $F_1 = F_2 = 50\%$ ).

#### IV. DISCUSIÓN.

##### 1. PRIMERA FASE. Caracterización de la resistencia a flumetrina en la cepa Aldama de *Boophilus microplus*.

**1.1 Número de genes controlando la resistencia.** Los resultados de la primera etapa de este estudio indican que la resistencia a flumetrina en la cepa Aldama de *B. microplus* fue autosómica y controlada por más de un gen.

Esta cepa mostró el mismo patrón de resistencia que la cepa Lamington caracterizada en Australia, con resistencia específica a flumetrina<sup>1</sup>. La hipótesis de un gen mayor fue rechazada excepto para la dosis 0.006. Estos resultados coinciden con el trabajo de Stone y Youlton<sup>61</sup> quienes encontraron que la resistencia a organofosforados se debió a dos genes complementarios que en conjunto exhibieron dominancia incompleta. Lo sorprendente en este estudio fue que en la dosis 0.006 no se rechazara la hipótesis de un gen mayor, dado que en la dosis más alta de 0.12 si fue rechazada. Esto confirma la complejidad de los mecanismos de resistencia en esta cepa de *B. microplus*. Aquí podrían haberse dado interacciones genéticas con efectos en direcciones opuestas, que cancelaron los efectos individuales<sup>116</sup>. Este resultado puede deberse aun error tipo II causado por muestreo.

Los mecanismos de resistencia de *B. microplus* hacia los piretroides parecen ser multifactoriales y varían entre cepas<sup>21,66,76</sup> lo cual sugiere que la resistencia se desarrolla independientemente en las poblaciones<sup>81</sup> con diferentes soluciones<sup>82</sup>. Esto ha sido visto en *Lucilia cuprina*<sup>58</sup> cuya evolución de la resistencia al diazinon estuvo controlada por un gen cuando se utilizó una dosis alta para la selección, mientras que cuando la selección para la resistencia se hizo con una dosis baja, la respuesta fue poligénica. Estos estudios sustentan la existencia de al menos dos diferentes genes<sup>117</sup>. Coincidiendo con los estudios de genética molecular hechos en *B. microplus*, donde se han encontrado al menos dos mecanismos de resistencia a piretroides<sup>65,66,76,78,79,81</sup> en cepas mexicanas de laboratorio.

**1.2 Efectos maternos y ligamiento sexual.** Los resultados de los bioensayos en las cruza recíprocas entre las cepas Aldama y Chiapas mostraron que no hubo evidencia de ligamiento sexual, ya que las diferencias entre las  $CL_{50}$  y las pendientes de la recta de las  $F_1$  no fueron diferentes estadísticamente ( $P < 0.05$ ), lo cual sugiere que la resistencia a flumetrina en la cepa Aldama de *B. microplus* fue autosómica. Esto también se ha encontrado en trabajos previos con resistencia a la toxina de *B. turingiensis* en *Heliothis virescens*<sup>90</sup>, *P. xylostella*<sup>82,118</sup> y con *Pectinophora gossypiella*<sup>119</sup>.

**1.3 Factores de resistencia.** El factor de resistencia para flumetrina de la cepa Aldama de *B. microplus* (81.81) fue diferente al de las cepas Coatzacoalcos (15.7), Corrales ( $>24,300$ ) y San Felipe ( $>24,300$ ), que fueron probadas con flumetrina después de 15 generaciones de selección con permetrina<sup>21</sup>. El factor de resistencia obtenido en este estudio también fue más alto que el obtenido después de siete generaciones de selección con permetrina (20.9)<sup>92</sup>. Las larvas  $F_1$  y  $F_2$  tuvieron factores de resistencia similares y más bajos que la parental Aldama. Los valores de resistencia bajos en la  $F_1$  comparados con los de las cepas resistentes también se ha observado en cepas resistentes a organofosforados<sup>61</sup>.

Los factores de resistencia se calcularon con la  $CL_{50}$  de una población dividida entre la  $CL_{50}$  de la población más susceptible. Esta práctica requiere que los valores  $CL_{50}$  para cada grupo se estimen con igual precisión<sup>111</sup>. En la cepa Aldama RR, esto no es cierto, ya que la amplitud del intervalo de confianza al 95% (0.556) fue más alto que el obtenido en la cepa susceptible, Chiapas (0.0003). Por lo cual este factor de resistencia debe ser tomado con reserva.

**1.4 Dominancia de la resistencia.** La dominancia efectiva, determina el grado de dominancia a través del nivel de mortalidad (ML) para una concentración dada de acaricida<sup>91</sup>, y el problema de la precisión de la  $CL_{50}$  no afecta su validez. En la práctica es mejor que usar la  $CL_{50}$  que tiene poco que aportar en el manejo de la resistencia a un acaricida, debido a que las estrategias para retrasar la resistencia a los acaricidas a menudo involucran el determinar si es factible técnicamente utilizar dosis que eliminen todos los heterocigóticos<sup>120</sup>. En el presente estudio, el alcance de la resistencia a flumetrina en la cepa Aldama de *B. microplus* dependió de la

concentración del acaricida utilizada. La resistencia fue casi dominante en la dosis más baja ensayada, mientras que fue casi completamente recesiva con la dosis más alta (Cuadro 3). Sin embargo en la dosis comercial, se observó una dominancia incompleta. Resultados similares se observaron en la resistencia de *P. xilostella* contra las toxinas de *B. thuringiensis*<sup>118,119</sup>. El grado de dominancia afecta las estrategias de manejo de la resistencia a acaricidas, una estrategia de alta dosis-refugio podría disminuir la resistencia pero sólo cuando los alelos resistentes están presentes en la población como heterocigóticos<sup>120</sup>. De lo contrario sólo se disminuiría el tiempo del desarrollo de la resistencia<sup>101</sup>.

**1.5 Variables reproductivas.** Los pesos de las masas ovígeras mostraron un efecto materno en este estudio. Los pesos de la cepa resistente y la cruce con hembras resistentes F<sub>1</sub> (SR), fueron más bajos que sus contrapartes SS y RS, este resultado es importante si se desea establecer la estrategia dosis alta-refugio, ya que las migraciones de las hembras susceptibles hacia los habitats resistentes serían más eficientes, debido a que se tendrían más crías heterocigóticas RS<sup>121</sup>, dado que sus masas ovígeras son más grandes que sus contrapartes (SR). Además se observó que un 36% de masas ovígeras no fueron viables en la cepa SR, aunque al comparar las que si eclosionaron, no se obtuvo evidencia estadística de que los porcentajes de eclosión son más altos en las cepas RS que en SR ( $p > 0.05$ ).

## 2. SEGUNDA FASE.

### 2.1 Modelo de simulación de resistencia a acaricidas.

Los resultados de las simulaciones con el modelo descrito en la Figura 3, indican que con la estrategia dosis alta-refugio se retrasó hasta 822 generaciones la aparición de la resistencia con 20% de animales en refugio y una migración del 20%, seguida por 791 generaciones con el 8% de refugio y el mismo porcentaje de migración (Figura 5). Por el contrario, al agregarse a esta estrategia la aplicación de una vacuna con 80% de efectividad en los animales no tratados con acaricidas (refugio), la resistencia se desarrolló en pocas generaciones (Figura 6), debido a la disminución en la producción de individuos susceptibles<sup>101</sup>.

La supervivencia de los individuos heterocigóticos (SR) impacta fuertemente en la dinámica precoz de la evolución de la resistencia, debido a que los alelos de resistencia RR son muy raros en las poblaciones que no se han expuesto a acaricidas<sup>122</sup>, tanto los individuos susceptibles (SS) como los heterocigóticos (SR y RS) son fácilmente eliminados por los insecticidas cuando el alelo R es recesivo, pero si el acaricida no elimina a los heterocigóticos, estos individuos serán más numerosos en la población, incrementando la tasa de evolución de la resistencia<sup>91</sup>.

**2.2 Migración.** Las simulaciones también sugieren que el aislamiento entre los animales tratados y no tratados, no debe ser completo ( $\leq 2\%$ ), pero la mezcla completa entre ellos ( $>50\%$ ) tampoco tiene buenos resultados, en el primer caso, se incrementa la proporción de larvas en fase parásita que se quedan en sus propios hábitats y por lo tanto se aparean entre ellas mismas. Al reducirse la migración, sin llegar al completo aislamiento, se reduce la mortalidad de los susceptibles, comparado con el caso de mezcla completa (100% migración), debido a que pocas larvas en estado parásita suben a los animales que van a ser tratados con acaricida a dosis alta. Resultados similares se encontraron con otro modelo de simulación para la toxina de *Bacillus thuringiensis*<sup>98</sup>.

**2.3 Porcentaje de refugio.** El tamaño del refugio aquí también es esencial, para producir estos adultos susceptibles que ovipositarán huevos de los cuales emergerán larvas parásitas susceptibles. En todos los casos, excepto para cuando la migración fue de 50%, un tamaño de refugio de 4% en los animales sin vacunar resultó ineficaz (Figura 5).

**2.4 Vacuna.** El uso de una vacuna con un 80% de eficiencia resultó desalentador debido al pequeño número de garrapatas susceptibles que sobreviven en este caso.

A medida que la población susceptible persiste en los refugios y que hay un movimiento suficiente entre hábitats (animales tratados y no tratados), el número de huevos susceptibles que son ovipositados por las hembras producirán un número adecuado de adultos susceptibles para retrasar la resistencia.<sup>103</sup>

Las simulaciones en este estudio se hicieron con valores tomados de otros trabajos<sup>7,105,115</sup>, pero se recomienda hacer un análisis de sensibilidad con valores obtenidos con *Boophilus microplus* en condiciones de campo. Para obtener la frecuencia del alelo R, se podría utilizar alguno de los métodos recomendados por

Andow and Alstad<sup>122</sup>. También se debe determinar la distancia adecuada entre los animales tratados y no tratados para asegurar que un 20% de las garrapatas migren entre estos hábitats. Asimismo se recomienda ampliar las simulaciones con migraciones distintas para cada uno de los hábitats, así como probar otros porcentajes de animales en refugio (no tratados con acaricidas) y menores valores de dominancia efectiva (h), que correspondería con dosis más altas a la probada aquí (equivalente a un poco más de cuatro veces la dosis comercial), con las que tal vez sería posible el uso de una vacuna con una eficiencia del 80%, igualmente se debe probar el uso de vacunas menos eficientes (60%) pues éstas producirían un mayor número de susceptibles sin comprometer tan fuertemente la producción en los animales no tratados<sup>105,123,124</sup>. Asimismo es importante medir el efecto de costo de aptitud de los genes de resistencia ya que si los tiempos de desarrollo de las fases parásitas en los animales tratados son distintos que los de los no tratados, no se podría asegurar un apareo aleatorio debido a una asincronía temporal de los adultos<sup>121</sup>. Igualmente, la tasa de mortalidad relativa de las garrapatas resistentes en ambos tipos de animales durante el invierno, podría afectar por la pérdida de alelos resistentes en la población total. En la primera fase de este trabajo, se observó un costo de aptitud en los híbridos, ya que las poblaciones SR (macho susceptible-hembra resistente), mostró tener el peso de la masa ovígera y el porcentaje de eclosión más bajos (cuadro 5). Dado que la evolución de la resistencia se debe principalmente a los heterocigóticos<sup>41</sup>, un cambio en la subestructura de la población puede llevar a cambios en la homocigocidad que a su vez llevarían a cambios en la adaptación al acaricida utilizado<sup>98</sup>.

Por último, se debe hacer una evaluación económica de esta estrategia, con respecto a mantener animales sin tratamiento, así como evaluar su impacto ecológico, ya que requiere utilizar dosis de acaricidas cuyos residuos podrían dañar el ambiente o volver resistentes otro tipo de plagas del ganado para las cuales la dosis utilizada para *Boophilus microplus* no es suficientemente alta<sup>123</sup>.

El modelo utilizado aquí supone que la resistencia a acaricidas es controlado por un solo gen, pero en la primera parte del trabajo se encontró que en la cepa Alama de *Boophilus microplus* la resistencia a flumetrina fue autosómica y controlada por más de un gen. En estudios de simulación se ha mostrado que los

refugios son más efectivos para manejar la resistencia poligénica que la monogénica<sup>98</sup>, por ello es prudente utilizar los modelos de un solo gen, en presencia de refugio<sup>101</sup>.

La resistencia a flumetrina en la cepa Aldama de *Boophilus microplus* parece ser autosómica y estar gobernada por más de un gen. Los resultados de la dominancia efectiva de la resistencia a flumetrina y los de supervivencia de los híbridos SR, cumplen con los supuestos para plantear su control a través de la estrategia dosis alta-refugio. Aunque los resultados de las simulaciones proporcionan alguna evidencia de las ventajas de la estrategia dosis alta-refugio, deben ser consideradas las condiciones bajo las cuales esas ventajas aplican, para su uso dentro del marco del manejo integrado de esta plaga en México.



## V. REFERENCIAS.

1. Nolan J, Wilson J., Green P E, Bird P E. Synthetic pyrethroid resistance in field samples in the cattle tick. *Aust Vet J* 1989 ; 66 : 179-182.
2. Yin Y, Lu H, Luo J. Babesiosis in China. *Trop Anim Health Prod* 1997; 29: 11S-15S.
3. Jonsson N N , Mayer D G , Matschoss A L, Gree P E, Ansell J. Production effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation of high yielding dairy cows. *Vet Parasitol* 1998.; 78,1: 65-77.
4. Jonsson N N, Davis R, De Witt M. An estimate of the economic effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on Queensland dairy farms. *Aust Vet J* 2001;79:826-31.
5. Hoy M. Multitactic resistance management: an approach that is long overdue?. *Fl Entomol* 1995; 78 (3): 443-451.
6. Barnes E H, Dobson R J, Barger I A. Worm control and antihelminthic resistance: Adventures with a model. *Parasitol Today* 1995; 11: 56-63.
7. Beugnet F, Chalvet-Monfray K, Sabatier P. Use of mathematical model to study the control measures of the cattle tick *Boophilus microplus* population in New Caledonia. *Vet Parasitol* 1998;77:227-288.
8. Labarta V, Rodriguez M, Penichet M, Leonart R, Lorenzo-Luaces L, de la Fuente J. Simulations of control strategies for the cattle tick *Boophilus microplus* employing vaccination with a recombinant Bm86 antigen preparation. *Vet Parasitol* 1996; 63: 131-160.
9. Mount G A, Haile D G, Davey R B, Cooksey L M. Computer simulation of *Boophilus* cattle tick (Acari:Ixodidae) population dynamics. *J Med Entomol* 1991; 28: 223-240.
10. Weidhaas D E, Haile D J, George J E, Osburn R L, Drummond R O. A basic model for use in computer simulations of *Boophilus* tick biology and control. *Adv Agric Technol* 1983. S- 32: 1-20.

11. Sutherst R W, Norton G A, Barlow N D, Conway G R, Birley M, Commins H N. An analysis of management strategies for cattle tick (*Boophilus microplus*) control in Australia. *J Appl Ecol* 1979; 16: 359-382.
12. Popham T W and Garris G I. Considerations when modeling alternative eradication strategies for *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acari: Ixodidae) in Puerto Rico. *J Agric Entomol* 1991; 8 (4): 271-289.
13. Corson M S, Teel P D and Grant W E. Influence of acaricide resistance on cattle-fever tick (*Boophilus spp*) infestations in semi-arid thornshrublands: a simulation approach. *Exp Appl Acarol* 2001; 25: 171-184.
14. Groeters F R and Tabashnik B E. Roles of selection intensity, major genes, and minor genes in evolution of insecticide resistance. *J Econ Entomol* 2000; 93: 1580-1587.
15. Hernandez R, Chen A C, Davey R B, Ivie G W, Wagner G G, George J E. Comparison of genomic DNA in various strains of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol* 1998; 35: 895-900.
16. Passos D T, Ferreira C A S, da Silva S S, Ritcher M F, Ozaki L S. detection of genomic variability in different populations of the cattle tick *Boophilus microplus* in southern Brazil. *Vet Parasitol* 1999; 87: 83-92.
17. Baxter G D, Barker S C. Comparison of acetylcholinesterase genes from cattle ticks. *Int J Parasitol* 1999; 29: 1765-1774.
18. De la Fuente J, García-García J C, González D M, Izquierdo G, Ochagavía M E. Molecular análisis of *Boophilus spp.* (Acari: Ixodidae) tick strains. *Vet Parasitol* 2000; 92: 209-222.
19. Neri O S, Aburto S, Aguirre E J. Caracterización toxicológica de dos cepas de garrapatas *Boophilus annulatus* y *B. microplus*. *Memorias de IV Reunión Anual de Parasitología Veterinaria*; 1983. *Fac. Med. Vet. Y Zoot. UNAM, México*, 1983.
20. Ortiz E.M, Santamaria V M, Ortiz N A, Soberanes C N, Osorio M J, Franco B R, Martínez I F, Quezada D R, Fragoso S H. Caracterización de la resistencia de *B. microplus* a ixodidas en México. *III Seminario*

Internacional de Parasitología Animal. Resistencia y Control en Garrapatas y Moscas de Importancia Veterinaria. Acapulco, México. 1995: 58-66.

21. Miller R J, Davey R B, George J. Characterization of pyrethroid resistance and susceptibility to coumaphos in Mexican *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). J Med Entomol 1999; 35:533-538.

22. Furman D P, Loomis E C. The Ticks of California. University of California Publications, Bulletin of the California Insect Survey, Vol. 25. University of California Press, California 1984.

23. Sonenshine D E. Biology of Ticks. New York: Oxford University Press, 1991.

24. Kemp D H, Thullner R, Gale K R, Nari A, Sabatini G A. Acaricide Resistance in the Cattle-Ticks *Boophilus microplus* and *B. decoloratus*: Review of Resistance Data; Standardisation of resistance tests and recommendations for integrated parasite control to delay resistance. Report to The Animal Health Services, AGAH, FAO, 1998.

25. McCosker P J. Global aspects of the management and control of tick of veterinary importance. In: J.G. Rodriguez. Recent Advances in Acarology. Vol II. Academic Press, 1979.

26. Gugliemone A A, Aguirre H , Späth E J .A, Gaido A B , Mangold A J, de Ríos L G. Long-term study of incidence and financial loss due to cattle babesiosis in Argentinian dairy farm. Prev Vet Med 1992; 12:307-312.

27. Woodham C B, Gonzalez O A, López L A , Guereña M R. Progresos en la erradicación de las garrapatas *Boophilus* en México 1960-1980. Rev Mund Zoot 1983;48: 18-24.

28. Sutherst R W, Maywald G F, Kerr J D, Stegemen, D A. The effect of the cattle tick *Boophilus microplus* on the growth of *Bos indicus* X *Bos taurus* steers. Aust J Agric Res 1983; 34: 317-327.

29. Secretaria de Agricultura y Recursos Hidráulicos. Manual Para Médicos Veterinarios de la Campaña Nacional Contra la Garrapata. México, 1980.

30. Secretaría de Agricultura Ganadería y Recursos Pesqueros y Alimenticios. URL: <http://www.sagarpa.gob.mx/Dgg/FTP/sitbox98.pdf>
31. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. Censo Ganadero. México, 1990.
32. Estrada-Peña, A. Geostatistics and remote sensing using NOAA-AVHRR satellite imagery as predictive tools, in tick distribution and habitat suitability estimations for *Boophilus microplus* in South America. *Vet Parasitol* 1999; 81:73-82.
33. Trápaga J. La campaña contra la garrapata *Boophilus spp.* en México. logros, problemas y perspectivas. In: The eradication of ticks. FAO Animal Production and Health 1987; 75: 28-44.
34. Fideicomiso Campaña Nacional Contra la Garrapata. Evaluación de la Primera Etapa. Campaña Nacional Contra la Garrapata 1975-80. México, 1981.
35. Castellanos H J L, Solís S S. La Campaña Contra la Garrapata en México. Segundo Seminario Internacional de Parasitología Animal. Garrapatas y Enfermedades que Transmiten. Morelos, México. 1992:111-115.
36. García-Bustamante A. Situación actual de la Campaña Nacional Contra la Garrapata en México. IV Seminario Internacional de Parasitología Animal. Control de la Resistencia en Garrapatas y Moscas de Importancia Veterinaria y Enfermedades que Transmiten. Puerto Vallarta, Jal. México, 1999: 47-54.
37. Jongejan F, Uilenberg G. Ticks and control methods. *Rev Sci Tech* 1994; 13: 1201-26.
38. Bloomquist J R. Insecticides : chemistries and characteristics. Available from : URL : <http://ipmworld.umn.edu/chapters/bloomq.htm>
39. Miller T A. Mechanisms of resistance to pyrethroid insecticides. *Parasitol Today* 1988 ; 4:509-512.
40. Stone B F. The genetics of resistance by ticks to acaricides. *Aust Vet J* 1972; 48: 345-50.

41. International Life Sciences Institute. An evaluation of insect resistance management in Bt field corn: a science-based framework for risk assessment and risk management. ILSI Press. Washington, 1999: 31-37.
42. Food and Agricultural Organization of the United Nations. Acaricide resistance. In "Ticks and Tick-borne disease control, a practical field manual". Vol. I, Tick control. 1984: 246-299.
43. Centro Nacional de Parasitología. Informe de los trabajos con la cepa "Tuxpan" de *Boophilus microplus*. Departamento de Constatación. CENAPA. F.C.N.C.G. México, 1983:
44. Ortiz E M, Santamaría V M., Frago S H Resistencia en garrapatas *Boophilus microplus* a los ixodicidas en México. XIV Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias. México, 1994:186.
45. Santamaría V M, Soberanes C N, Ortiz N A, Frago S H, Osorio M J, Martínez I. F, Franco B R, Delabra V G, Quezada D R, Giles H I, Ortiz E. M. Análisis de la situación actual mediante el monitoreo de susceptibilidad a ixodicidas en *Boophilus microplus* de 1993 a 1999 y medidas preventivas para retardar la resistencia al amitraz en México. IV Seminario Internacional de Parasitología Animal. Jalisco, México. 1999: 103-112.
46. Soberanes C N, Santamaría V M, Frago S H y García V Z. Primer caso de resistencia al amitraz en la garrapata del ganado *Boophilus microplus* en México. Tec Pec Mex 2002; 40: 81-92.
47. Castellanos H J L. Estrategias para el manejo de poblaciones de garrapatas *Boophilus microplus* resistentes a los ixodicidas y el uso de alternativas no convencionales para su control. XXIII Congreso Nacional de Buiatría. Aguascalientes, México. 1999: 265-273.
48. Plapp F W. Genetics and biochemistry of insecticide resistance in arthropods: prospects for the future. In: Pesticide Resistance: Strategies and Tactics for Management. Washington, D. C: Natl Academy Press. 1986.
49. Roush R T, McKenzie J A. Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance. Ann Rev Entomol 1987; 32: 361-80.

50. Brown A.W. A. 1967. Genetics of insecticide resistance in insect vectors. In: J. Wright. R. Genetics of insect Vectors of Disease. New York: Elsevier. 1987: 505-52.
51. Georghiou G P. Genetics of resistance to insecticides in houseflies and mosquitoes. Exp Parasitol 1969; 26:224-55.
52. Helle W. Resistance in the acarmina : mites. Adv Acarol 1965; 2:71-93.
53. Milani R. Genetic studies on insecticide-resistant insects. Misc Publ Entomol 1960; 25:219-56
54. Whitten M J, McKenzie A. The genetic basis for pesticide resistance. In Proc. 3<sup>rd</sup> Australias. Conf. Grassl. Invert. Ecol. K. E. , Lee Ed. Adelaide , Australia: S.A. Government Printer, 1982: 1016.
55. Moore J A. Science as a way of knowing- Evolutionary biology. Am Zool 1984.24:467-534.
56. Roush R T and Miller G L. Considerations for design of insecticide resistance monitoring programs. J Econ Entomol 1986. 74: 142-47.
57. Roush R T, McKenzie J A. Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance. Annu Rev Entomol. 1987; 32: 361-380.
58. McKenzie J A G, Parker A G, Yen J L.. Polygenic and single gene responses to selection for resistance to diazinon in *Lucila cuprina*. Genetics. 1992; 130: 613-620.
59. Groeters F R, Tabashnik B E. Roles of selection intensity , major genes, and minor genes in evolution of insecticide resistance. J Econ Entomol 2000; 93:1580-87.
60. McKenzie J A. The character or the variation: the genetic analysis of the insecticide-resistance phenotype .Bull Entomol Res 2000; 90: 3-7.
61. Stone B F, Youlton N J. Inheritance of resistance to chlorpyrifos in the Mt Alford strain and to diazinon in the Gracemere strain of the cattle tick (*Boophilus microplus*). Aust J Biol Sci 1982.35: 427-440.

62. Harris R L, George J E, Ahrens E H, Davey R B, Bazan H O. Selection for resistance to coumaphos in a strain of southern cattle tick (Acari: Ixodidae). *J Econ Entomol* 1988; 81:545-548.
63. Aguirre-Esponda J, Santamaría V M, Sobrino A L, Ortiz N A, Ortiz E M y Neri O S.. Estudios acerca de la genética y mecanismos de resistencia en garrapatas Ixodidae con origen en México. En Segundo Seminario Internacional de Parasitología Animal. Garrapatas y Enfermedades que transmiten. Oaxtepec, Morelos, México, 1991: 78-95.
64. Rosario-Cruz R., Miranda-Miranda E, García-Vázquez Z, Ortiz-Estrada. Detection of esterase activity in susceptible and organophosphate resistant strains of the cattle tick *Boophilus microplus* (Acari:Ixodidae). *Bull Entomol Res* 1997; 87:197-202.
65. Rosario-Cruz R, García-Vázquez Z, George J E. Detección inmunoquímica de esterases en dos cepas de la garrapata *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) resistentes a ixodicidas. *Tec Pec Mex* 2000; 8:203-210.
66. Jamroz R C, Guerrero F D, Pret J H, Oeler D D, Millar R J. Molecular and biochemical survey of acaricide resistance mechanisms in larvae from Mexican strains of the southern cattle tick. *Boophilus microplus*. *J Ins Physiol* 2000; 46: 685-695.
67. Nolan J and Schnitzerling H.J. Drug resistance in arthropod parasites. In: Campbell C and Rew R.S. (eds). *Chemotherapy of parasitic diseases*. Plenum, New York, 1986: 603-620.
68. Brogdon W G and McAllister J C. Insecticide resistance and vector control. *Emerg Infect Dis* 1998; 4:605-613.
69. Schnitzerling J J, Nolan J, Huges S. Toxicology and metabolism of some synthetic pyrethroids in larvae of susceptible and resistant strains of the cattle tick *Boophilus microplus* (Can). *Pest Sci* 1983. 14:64-72.

70. Shunter C A, Roulston W J, Schnitzerling H J. A mechanism of resistance to organophosphorus acaricides in a strain of the cattle tick *Boophilus microplus*. Aust J Biol Sci 1968;21: 97-109.
71. Bull D L, Ahrens E H. Metabolism of coumaphos in susceptible and resistant strains of *Boophilus microplus* (Acari:Ixodidae). J Med Entomol 1988; 25: 94-98.
72. Roulston W J, Nolan J. Resistance in *Boophilus microplus* to cholinesterase inhibition and alteration in the site of action. Environ Qual Saf (Suppl. 3) 1975; 416-420.
73. Nolan J, Schnitzerling H J, Schuntner C A. Multiple forms of acetylcholinesterase from resistant and susceptible strains of the cattle tick *Boophilus microplus* (Can) Pest Biochem Physiol 1972; 2:85-94.
74. Wright F C, Ahrens E H. Cholinesterase Insensitivity: A mechanism of resistance in Mexican strains of *Boophilus microplus* (Acari:Ixodidae) against coumaphos. J Med Entomol 1988;25: 234-239.
75. Miller R J, Davey R B, George J. Characterization of pyrethroid resistance and susceptibility to coumaphos in Mexican *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). J Med Entomol 1999;35:533-538.
76. Guerrero F, Li A Y, Hernandez R. Molecular diagnosis of pyrethroid resistance in Mexican strains of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). J Med Entomol. 2002;39: 770-776.
77. Pruettt J H, Guerrero F D and Hernandez R. Isolation and identification of an esterase from a mexican strain of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). J Econ Entomol 2002; 95(5): 1001-1007.
78. Hernandez R, He Haiqui, Chen A C, Waghela S D, Ivie G W, George J E, Wagner G G. Identification of a point mutation in an esterase gene in different populations of the southern cattle tick, *Boophilus microplus*. Ins Biochem Mol Biol 2000; 30: 969-977.
79. Hernandez R, Guerrero F D, George J E, Wagner GG. Allele frequency and gene espression of a putative carboxyl esterase-encoding

gene in a pyrethroid resistant strain of the tick *Boophilus microplus*. In: Biochem Mol Biol 2002; 32: 10009-1016.

**80.** He H A, Chen A C, Waghela S D, Ivie G W, George J E, Wagner G G. Identification of a point mutation in the para-type sodium channel gene from a pyrethroid-resistant cattle tick. Biochem Biophys Res Commun 2002; 61: 558-561.

**81.** Guerrero F D, Davey R B, Miller R J. Use an allele-specific polymerase chain reaction assay to genotype pyrethroid resistant strains of *Boophilus microplus* (acari: Ixodidae). J Med Entomol 2001; 38: 44-50.

**82.** Tabashnik B E., Liu Y-B, Malvar T, Heckel D G, Masson L, Ballester V, Granero F, Ménsua J LFerré J. Global variation in the genetic and biochemical basis of diamondback moth resistance to *Bacillus thuringiensis*. Proc Natl Acad Sci 1997; 94:12780-12785.

**83.** French-Constant R H, Steichen J, Rocheleau TA, Aronstein K, Roush RT. A single amino acid substitution in a  $\gamma$ -aminobutyric acid subtype A receptor locus associated with cyclodiene insecticide resistance in *Drosophila* populations. Proc Natl Acad Sci 1993; 90: 1957-61.

**84.** Nari A, Cardoso H. Enfermedades causadas por parásitos internos. I. Nematodos gastrointestinales. In: Bonino J., Durán del Campo y Nari J.J. Enfermedades de los Lanares. Montevideo, Uruguay: Hemisferio Sur, 1987: 1-57.

**85.** Waller P J. Resistance to antihelmintics and their implications for animal production. In: Anderson N. and Waller P.J. Resistance in Nematodes to Anthelmintic Drugs. Australia, Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization. 1985: 1-11.

**86.** French-Constant R, Daborn P J, Le Goff G. The Genetics and genomics of insecticide resistance. Trends Gen 2004.20 (3): 163-170.

**87.** Scott J. The molecular genetics of resistance: resistance as a response to stress. Fl Entomol 1995; 78(3):399-414.

**88.** Slatkin M. Gene flow and population structure. In: Real L. Ecological Genetics. Princeton: 1994.

89. Georgiou P and Taylor C. Factors influencing the evolution of resistance. In: Pesticide Resistance: Strategies and Tactics for Management. Washington, D.C: National Academy Press, 1986.
90. Gould F, Anderson A, Reynolds A, Bumgarner L, Moar W. Selection and genetic analysis of a *Heliothis virescens* (Lepidoptera:Noctuidae) strain with high levels of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. J Econ Entomol 1995; 88: 1545-59
91. Bourguet D, Genissel A, Raymond M. Insecticide resistance and dominance levels. J Econ Entomol 2000; 93, 6: 1588-1595.
92. Davey, R B, George J. In vitro and in vivo evaluations of a strain of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) selected for resistance to permethrin. J Med Entomol 1998; 35:1013-1019.
93. Tabashnik B E. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. Annu Rev Entomol 1994; 39: 47-79.
94. Tabashnik B. Computer simulation as a tool for pesticide resistance management. In Pesticide Resistance: Strategies and Tactics for Management. Washington, D.C: National Academy Press, 1986
95. Tabashnik B E. Modelling an evaluation of resistance management tactics. In: Roush R T, Tabashnik. Pesticide resistance in arthropods. New York: Chapman and Hall, 1990.
96. Birch C P D, Shaw M W. When can reduced doses and pesticide mixtures delay the build-up of pesticide resistance? A mathematical model. J Apl Ecol 1997; 34: 1032-1042.
97. Alstad D N, Andow D A. Managing the evolution of insect resistance to transgenic plants. Science 1995.; 268: 1894-1896.
98. Carpio M A. Evaluating resistance managements strategies for multiple toxins in the presence of external refuges. J Econ Entomol 1998.;91: 1021-1031.
99. Gould F. Testing Bt refuge strategies in the field. Nat Biotechnol 2000; 18:266-267

100. RRC. Supplement to: Bt Corn and European corn borer: Long term success through resistance management, NCR-602, 1998. Available for: URL: [http:// www.agrobios.com/docroor/articles/01-298a.pdf](http://www.agrobios.com/docroor/articles/01-298a.pdf)
101. Gould F. Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: integrating pest genetics and ecology. *Annu Rev Entomol* 1998; 43: 701-726.
102. Secchi S, Hurley T M, Hellmich R L. Managing European corn borer resistance to Bt corn with dynamic refuges. Center of Agricultural and Rural Development. 2001. Available for: URL: [http:// www.card.iastate.edu](http://www.card.iastate.edu).
103. Carpio, M A. Source-sink dynamics between transgenic and non-transgenic habitats and their role in the evolution of resistance. *J Econ Entomol* 2001; 94: 698-705.
104. Storer N P, Peck S L, Gould F, Van Duyn J W , Kennedy G G. 2003. Sensitivity analysis of a spatially-explicit stochastic simulation model of the evolution of resistance in *Helicoverpa zea* (Lepidoptera:Noctuidae) to Bt transgenic corn and cotton. *J Econ Entomol* 2001; 96:173-187.
105. Ives A R, Andow D A. 2002. Evolution of resistance to Bt crops: directional selection in structured environments. *Ecol. Lett.* 5: 792-801.
106. Solomon K R. Acaricide resistance in ticks. *Adv Vet Sci Comp Med* 1983; 27: 273-294.
107. De Campos P M. Daily mean number of eggs laid by the southern cattle tick (Acari: Ixodidae) compared with mean egg mass weight. *J Econ Entomol* 1998; 91: 153-158.
108. Stone B F and Haydock K P. A method for measuring the acaricide susceptibility of the cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini). *Bull Entomol Res* 1962; 53: 563-578.
109. Anonymous. Recommended methods for detection and measurement of resistance of agricultural pest to pesticides: tentative method for larvae of cattle ticks, *Boophilus spp.* FAO Meth. 1971:7 (9): 15-18.
110. Collins R L. A general nonparametric theory of genetic analysis. I. Application to the classical cross. *Genetics*. 1967; 56:169-170.

111. Robertson J L, Preisler HK. Pesticide Bioassays with Arthropods. U.S.A: CRC Press. 1991.
112. Finney D J. Probit analysis: a statistical treatment of the sigmoid response curve, 2<sup>nd</sup> ed. London: Cambridge University Press, 1964.
113. Throne J E, Weaver D K, Baker J E. Probit Analysis: Assessing goodness-of-fit based on backtransformation and residuals. J Econ Entomol 1995; 88:1513-1516
114. Montgomery D C. Diseño y Analisis de Experimentos. México: Grupo Editorial Iberoamerica, 1991.
115. Searle S R. Matrix Algebra Useful for Statistics, New York: John Wiley and Sons, Inc., 1982.
116. Tapia-Pérez G, García-Vazquez Z, Montaldo H, George J. Inheritance of resistance to flumethrin in the Mexican Aldama strain of the cattle tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). Exp Appl Acarol 2003; 31: 135-149.
117. Lynch M, Walsh B. Genetics and Analysis of Quantitative Traits. Canada: Sinauer Associates Inc, 1998.
118. Sayyed A H, Haward R, Herrero S, Ferré S, Wright D J. Genetic and biochemical approach for characterization of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in a field population of the diamondback moth, *Plutella xylostella*. Appl Environ Microbiol 2000; 66, 4:1509-1516.
119. Liu Y B, Tabashnik B E, Meyer S K, Carriere Y, Bartlett A C. Genetics of pink bollworm resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac. J Econ Entomol 1997; 94: 248-252
120. Curtis C F, Cook L M, Wood R J. Selection for and against insecticide resistance and possible methods of inhibiting the evolution of resistance in mosquitoes. Ecol Entomol 1978; 3: 273-287.
121. Tang J D, Gilboa D S, Roush R T, Shelton A M. Inheritance stability, and lack-of-fitness cost of field selected resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (*Plutella xylostella*) (Leptodiptera:plutellidae) from Florida. J Econ Entomol 1997; 90: 732-741.

122. Andow D A, Alstad D N. The  $F_2$  screen for rare resistance alleles. J Econ Entomol 1998.; 91: 572-578.

123. George J E. The diagnosis and mitigation of acaricide resistance in populations of ticks affecting cattle. Proceedings XXI World Buiatrics Congress, Jornadas, Uruguay. 2000: 381-388.

124. Jonsson N N, Matschoss A L, Pepper P, Green P E, Albretch M S, Hundgerford J, Ansell J. Evaluation of TickGARD (Plus), a novel vaccine against *Boophilus microplus* in lactating Holstein Fiesian cows. Vet Parasitol 2000, 88: 275-285.

## ANEXO 1.

El número de larvas en fase parásita se obtuvo con un criterio adaptado de Beugnet et al, (1998)<sup>7</sup>.

Los animales (ganado) se encuentran en un sistema extensivo con una densidad animal por hectárea baja, 100-200 cabezas en 150 Has (1.5 cabezas/Ha).

Las hembras repletas caen de un hato de 150 cabezas, que adquirieron 1000 larvas en fase parásita cada una. La razón hembra:macho es de 50:50, y la sobrevivencia sin vacuna y sin tratamiento de larva parásita hasta adulto es del 50%. El promedio de hembras repletas que caen y ovipositan es de 90%. Cada hembra oviposita un promedio de 3000 (Aguilar et al, 1998) huevos. La supervivencia desde huevo hasta fase parásita es de 33%. La tasa de encuentro es de 0.01. La fertilidad de las hembras es de 50%.

**Número de larvas parásitas que sobreviven hasta adultas:**

$$(150 \times 1000)0.5 = 75000$$

**Número de hembras repletas que caen:**

$$75000/2 = 37500$$

**Número de hembras que ovipositan en promedio:**

$$37500 (.9) = 33750$$

**Número promedio de huevos ovipositados:**

$$33750 \times 3000 = 101250000$$

**Número de larvas que sobreviven hasta la fase parásita;**

$$101250000 (0.33) = 33\ 412\ 500$$

**Número de larvas en fase parásita que suben a los animales:**

$$33\ 412\ 500 (0.01) = 334125$$

**Este número fue redondeado a 350 000 para iniciar las simulaciones (generación 0).**

Lo anterior implica que en esta generación cada animal tendría un promedio de  $400\ 000/150 = 2667$  larvas en fase parásita, de las cuales sobreviven sin vacuna  $2667(0.95) =$  un promedio de 2533 hasta adultos, de los cuales  $2533(0.5) = 1266$  son hembras. Por lo tanto  $1266(0.5) = 633$  hembras repletas en promedio por animal, sin tratamiento acaricida y sin vacuna.

## ANEXO 2.

**Programa de simulación desarrollado con el programa Matlab® ver 5.2.**

**% designación de valores de las variables del modelo**

```
Q=input('Entre proporción de animales en refugio: ')
r1m=input('Proporción de machos que migran de los animales tratados a los
no tratados: ')
r1h=input('Proporción de hembras que migran de los animales tratados a los
no tratados: ')
r2m=input('Proporción de machos que migran de animales no tratados a
tratados: ')
r2h=input('Proporción de hembras que migran de animales no tratados a
tratados: ')
x1=input('número de larvas en animales tratados: ')
x2=input('número de larvas en los animales sin tratamiento: ')
L=input('Supervivencia de los resistentes en la dosis d: ')
k=input('Supervivencia de los susceptibles en la dosis d: ')
h=input('Dominancia funcional en la dosis d: ')
g=input('supervivencia de no tratados despues de inmunidad natural o por
vacuna: ')
Pt(1,1)=input('Frecuencia inicial del alelo R en tratados: ')
Pt(2,1)=input('Frecuencia inicial del alelo R en no tratados: ')
F1=input('fecundidad de las hembras tratadas: ')
F2=input('fecundidad de las hembras no tratadas: ')
generacion=0
% while (Pt(1,1)<=0.5) and (generacion<5)
while (Pt(1,1)<=0.5) & (generacion<=5000);
generacion=generacion+1
% ahora designo la matriz de machos
z1s=((1-r1m)+((1-Q)*r1m))*x1
z2s=((1-r2m)+(Q*r2m))*x2
z1d=(1-Q)*r2m*x2
```

```

z2d=Q*r1m*x1
Mm(1,1)=z1s/(z1s+z1d)
Mm(1,2)=z1d/(z1s+z1d)
Mm(2,1)=z2d/(z2s+z2d)
Mm(2,2)=z2s/(z2s+z2d)
% ahora diseño la matriz de hembras
z1dh=(1-Q)*r2h*x2
z2dh=Q*r1h*x1
z2sh=((1-r2h)+(Q*r2h))*x2
z1sh=((1-r1h)+((1-Q)*r1h))*x1
Mh(1,1)=z1sh/(z1sh+z1dh)
Mh(1,2)=z1dh/(z1sh+z1dh)
Mh(2,1)=z2dh/(z2sh+z2dh)
Mh(2,2)=z2sh/(z2sh+z2dh)
% Ahora diseño matrices de supervivencia
deltaRR(1,1)=L
deltaRR(1,2)=0
deltaRR(2,1)=0
deltaRR(2,2)=g

deltaRS(1,1)=(L*h)+((1-h)*k)
deltaRS(1,2)=0
deltaRS(2,1)=0
deltaRS(2,2)=g

deltaSS(1,1)=k
deltaSS(1,2)=0
deltaSS(2,1)=0
deltaSS(2,2)=g

```

**%ahora los vectores de los números relativos de las larvas RR,RS y SS  
que sobreviven en los dos hábitats**

**%Se asume apareo aleatorio entre los genotipos dentro de cada habitat**

$$WRR=(\text{deltaRR} * Mh) * (Pt. * (Mm * Pt))$$

$$WRS=(\text{deltaRS} * Mh) * ((1 - Pt). * (Mm * Pt) + Pt. * (1 - Mm * Pt))$$

$$WSS=(\text{deltaSS} * Mh) * ((1 - Pt). * (1 - Mm * Pt))$$

**%el cambio en la frecuencia de los resistentes esta dada por la ecuación  
recurrente:**

$$\text{izq} = (WRR + WRS / 2)$$

$$\text{der} = (WRR + WRS + WSS)$$

$$\text{ider} = \text{ones}(2, 1) ./ \text{der}$$

$$Pt1 = \text{izq} . * \text{ider}$$

$$Pt = Pt1$$

**% El vector del número de larvas después de la migración de las  
hembras ovipositando en los dos hábitats es**

$$X(1, 1) = x1$$

$$X(2, 1) = x2$$

$$\text{de}(1, 1) = ((1 - r1h) + (1 - Q) * r1h) * F1$$

$$\text{de}(1, 2) = (1 - Q) * r2h * F2$$

$$\text{de}(2, 1) = Q * r1h * F2$$

$$\text{de}(2, 2) = ((1 - r2h) + Q * r2h) * F2$$

$$X1 = (\text{de} * X) . * \text{der}$$

$$x1 = X1(1, 1)$$

$$x2 = X1(2, 1)$$

**end;**

**generaciones=generacion**