

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
FACULTAD DE VETERINARIA**

**DETERMINACIÓN DEL EFECTO ACARICIDA DE EXTRACTOS VEGETALES  
Y MOLÉCULAS SINTÉTICAS EN RHIPICEPHALUS MICROPLUS**

**por**

**María Josefina BENTANCUR HIRIART  
María Elisa FERRARI ZULUAGA**

TESIS DE GRADO presentada como uno de  
los requisitos para obtener el título de Doctor  
en Ciencias Veterinarias  
Orientación: Producción Animal

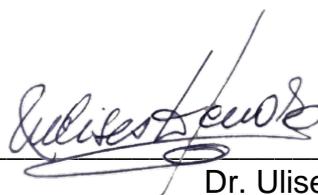
MODALIDAD: Ensayo Experimental

**MONTEVIDEO  
URUGUAY  
2022**

**PÁGINA DE APROBACIÓN:**

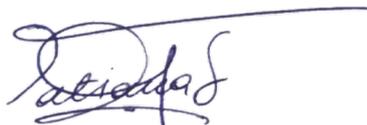
Tesis de grado aprobado por:

Presidente de mesa:



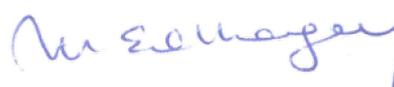
Dr. Ulises Cuore

Segundo miembro (Tutor):



Msc. DCV. Tatiana Saporiti

Tercer miembro:



Dra. Ernestina Olhagaray

Cuarto miembro:

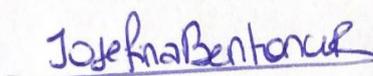


Phd Guzmán Álvarez

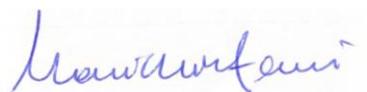
Fecha:

17/10/22

Autores:



María Josefina Bentancur Hiriart



María Elisa Ferrari Zuluaga

**AGRADECIMIENTOS:**

A nuestras familias por acompañarnos, apoyarnos e incentivarlos a lo largo de la carrera.

A nuestros amigos de toda la vida por estar siempre presentes, a los amigos que nos regalo la facultad a lo largo de todos estos años y a Juan y Patón nuestros compañeros de tesis.

Queremos agradecer a la Facultad de Veterinaria por capacitarnos como profesionales.

A nuestros tutores Msc. DCV Tatiana Saporiti y Phd Guzmán Álvarez por la paciencia y dedicación permanente.

Agradecemos a Dr. Jorge Gil y Dra. Florencia Puigvert por participar en la realización de nuestra tesis.

Un agradecimiento especial al laboratorio de la Estación Experimental “Dr. Mario A. Cassinoni”, Laboratorio de estudios de sensibilidad a acaricidas en la garrapata común del ganado, sede regional norte Artigas, División de Laboratorios Veterinarios (Dilave) y a los encargados del campo por abrirnos sus puertas y brindarnos los materiales.

<b>TABLA DE CONTENIDO:</b>	
<b>PAGINA DE APROBACIÓN</b> .....	<b>2</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>3</b>
<b>LISTA DE TABLAS Y FIGURAS</b> .....	<b>5</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>7</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>8</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN Y REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>9</b>
1.1. Ciclo biológico.....	9
1.1.1. Ciclo parasitario.....	9
1.1.2. Ciclo no parasitario.....	10
1.2. Modelo epidemiológico.....	11
1.3. Situación actual de <i>Rhipicephalus microplus</i> en Uruguay.....	12
1.4. Control de la garrapata.....	12
1.4.1. Control integrado de parásitos.....	13
1.4.2. Tratamientos no químicos.....	13
1.4.3. Manejo de los animales y las pasturas.....	14
1.4.4. Tratamiento generacional de la garrapata.....	14
1.5. Resistencia.....	15
1.5.1. Etapas en el desarrollo de la resistencia.....	15
1.5.2. Factores que intervienen en la resistencia.....	16
1.5.3. Situación de resistencia en Uruguay.....	16
1.6. Cribados fenotípicos en la línea celular embrionaria de <i>R.microplus</i> BME26 y células de mamíferos.....	17
<b>2. HIPOTESIS</b> .....	<b>19</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>19</b>
3.1. Objetivos generales.....	19
3.2. Objetivos específicos.....	19
<b>4. MATERIALES Y METODOS</b> .....	<b>19</b>
4.1. Diseño experimental.....	19
4.2. Evaluación del efecto acaricida de los compuestos.....	19
4.3. Evaluación de la citotoxicidad en espermatozoide bovino.....	24
4.4. Análisis estadístico.....	25
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>25</b>
<b>6. DISCUSIÓN</b> .....	<b>27</b>
<b>7. CONCLUSIONES</b> .....	<b>29</b>
<b>8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>30</b>

## **LISTA DE TABLAS Y FIGURAS:**

<b>Figura 1.</b> Modelo epidemiológico para la garrapata <i>Rhipicephalus microplus</i> (Cuore y Solari, 2022) .....	12
<b>Figura 2.</b> Modificado de esquema de tratamiento generacional de la garrapata (Cuore, 2009) .....	15
<b>Figura 3.</b> Evolución de los diagnósticos oficiales de resistencia a los acaricidas en Uruguay. Tomado del Manual Práctico para el control de la garrapata común del ganado y enfermedades asociadas(Cuore y Solari, 2022) .....	17
<b>Figura 4.</b> Selección de teleoginas.....	21
<b>Figura 5.</b> Selección de teleoginas.....	21
<b>Figura 6.</b> Garrapatas sumergidas en solución compuesto .....	21
<b>Figura 7.</b> Pesada de garrapatas .....	21
<b>Figura 8.</b> Selección de larvas viables para el TIL .....	22
<b>Figura 9.</b> Cúmulo de 100 larvas en tubos de tipo Eppendorf para tratamiento y control. ....	22
<b>Figura 10.</b> Larvas en sobre de papel Whatman N°1 .....	23
<b>Figura 11.</b> Extracción de muestras de semen congeladas. ....	24
<b>Figura 12.</b> Incubación de placas a 37°C durante 30 minutos con agitación moderada .....	24
<b>Tabla 1.</b> Cribado fenotípico a 100 µg/ml de extractos vegetales en la línea celular embrionaria de <i>R. microplus</i> BME26 y células de mamífero .....	17
<b>Tabla 2.</b> Cribado fenotípico a 100 µM y concentración inhibitoria del 50% del crecimiento de compuestos sintéticos en la línea celular embrionaria de <i>R. microplus</i> BME26 y células de mamífero. ....	18
<b>Tabla 3.</b> Datos de resistencia de la población de campo utilizada para los ensayos de TIL y TIA aportados por el Laboratorio de estudios de sensibilidad a acaricidas en la garrapata común del ganado, sede regional norte Artigas .....	20
<b>Tabla 4.</b> Resultados del TIL en cepas Mozo de los extractos de plantas a 1 mg/mL por duplicado .....	25
<b>Tabla 5.</b> Resultados del TIL en cepas Mozo a 3mM de los 12 compuestos sintéticos por duplicado .....	26
<b>Tabla 6.</b> Resultados del TIL en la población de campo multirresistente a 3mM por duplicado de los 5 compuestos que presentaron diferencia significativa en ambas repeticiones respecto al control negativo en el TIL en la cepa Mozo. ..	26

<b>Tabla 7.</b> Porcentaje de control del compuesto sintético 885 evaluado a 3mM en el TIA en la cepa Mozo en 5 garrapatas independientes y su porcentaje de control promedio .....	27
<b>Tabla 8.</b> Porcentaje de control del TIA en 8 garrapatas de la población de campo multirresistente para el compuesto 885 a 3 mM y su porcentaje de control promedio.....	27
<b>Tabla 9.</b> Se presenta el número relativo de células del control negativo y del compuesto 885, el porcentaje de citotoxicidad del 885 obtenido con el estudio en espermatozoides bovinos y en células de cultivo BME .....	27

## **RESUMEN:**

El control de la “garrapata común del ganado” *Rhipicephalus microplus* presenta una gran problemática debido a la resistencia a los acaricidas habilitados hoy en Uruguay. La presente tesis se realizó con la finalidad de contribuir en la evaluación de la capacidad acaricida de 12 moléculas sintéticas provenientes del Laboratorio de Moléculas Bioactivas del Centro Universitario Regional Litoral Norte sede Paysandú y 2 extractos de plantas medicinales del Sureste de México. Las evaluaciones se realizaron mediante el Test de Inmersión de Larvas y el Test de Inmersión de Adultos. Se trabajó en primer lugar con la cepa susceptible Mozo, aportada por el departamento de Parasitología de la División de Laboratorios Veterinarios de Montevideo. Luego aquellos compuestos que presentaron algún efecto acaricida se evaluaron en una población de campo multirresistente. Se concluyó que cinco de los doce compuestos sintéticos evaluados demostraron resultados de mortalidad dependientes del tratamiento. El compuesto sintético 885 mostró afectar la viabilidad de la garrapata mediante el Test de Inmersión de Larvas y el Test de Inmersión de Adultos en cepa Mozo y en una población de campo multirresistente. En los ensayos in vitro toxicológicos se vio una mayor citotoxicidad para las células de la garrapata en vez de las células de mamífero a la misma dosis.

### **SUMMARY:**

The control of the “common cattle tick” *Rhipicephalus microplus* is very problematic due to its resistance to the acaricides currently approved in Uruguay. This thesis was carried out with the aim of contributing to the evaluation of the acaricide effect of 12 synthetic molecules from the Laboratory of Bioactive Molecules of the North Region University in Paysandú and 2 extracts of medicinal plants from Southeastern Mexico. Trials were carried out through the Larvae Immersion Test and Adult Immersion Test. The sensitive Mozo strain was used in the first place, and it was provided by the Parasitology Department of the Division of Veterinary Laboratories from Montevideo. Later on, those compounds which showed some acaricide effect were evaluated on a multiresistant field population. It was concluded that five of the twelve synthetic compounds tested showed a dependence between the mortality and the treatment associated to each compound. Synthetic compound 885 showed acaricide activity on the Mozo strain and the multi-resistant field strain. On the toxicological in vitro essays it was observed a higher cytotoxicity on the BME tick culture cell than on mammalian cell.

## **1. INTRODUCCIÓN Y REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA:**

*Rhipicephalus microplus* (*R. microplus*) o “garrapata común del ganado” es el ectoparásito bovino más importante a nivel mundial (Cuore, Cardozo, Solari y Cicero, 2013), no solo debido a que produce enormes pérdidas económicas sino también por el gran efecto que tiene en la salud y en el bienestar del bovino (Nari, 2005). Por un lado, genera estrés en el animal debido a su comportamiento hematófago llegando incluso a generar lesiones que son la puerta de entrada para enfermedades secundarias o asociadas (Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO, 2004). Por otro lado, es vector de hemoparásitos como *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* y *Anaplasma marginale*, agentes causantes de la tristeza parasitaria (Cuore et al., 2013).

### **1.1. CICLO BIOLÓGICO:**

La garrapata común del ganado comprende dos ciclos, un ciclo parasitario, y otro de vida libre (Cuore et al., 2013).

#### **1.1.1. CICLO PARASITARIO**

Este consta de tres estadios: larva, ninfa y adulto, estas etapas de vida se dan sobre el mismo hospedero consistiendo en un ciclo monofásico (Nuñez, Muñoz y Moltedo, 1982). La duración de las etapas del ciclo no son mayormente alteradas por las condiciones climáticas, cumpliéndose la totalidad del ciclo a los 23 días (Cuore y Solari, 2022). En las pasturas se encuentra la larva que es la encargada de iniciar el ciclo parasitario al subir al bovino y fijarse a la piel del mismo siendo su observación dificultosa debido a su tamaño (0,5 x 0,4 mm). Posee tres pares de patas y es en esta etapa donde inocula la *Babesia bovis*. Se considera una de las etapas más sensibles a los garrapaticidas. La larva se alimenta de sangre y evoluciona hasta mudar su exoesqueleto entre los días 3-4 del ciclo transformándose en metalarva, que es de color blanquecina y su tamaño se encuentra duplicado (1mm). Gracias a su doble cutícula tiene resistencia mecánica a la penetración del garrapaticida de efecto tópico. Al día 9 comienza la etapa de ninfa liberándose de su viejo exoesqueleto. Esta presenta 4 pares de patas y 3 hileras de dientes a cada lado del hipostoma y permanece del mismo tamaño que en la etapa anterior (Cuore et al., 2013). Es en esta etapa que se inocula la *Babesia bigemina* (Cuore et al., 2013; Riek, 1964). Al día 13 comienza la siguiente muda, adquiriendo en esta etapa el nombre de metaninfa, su tamaño aumenta entre 2,5 a 4 mm, su doble envoltura de quitina (doble cutícula) le confiere un aspecto globoso. Al comenzar su etapa adulta a los 13-14 días, comienza la diferenciación sexual. Los machos se comienzan a observar a partir de los 13,5 días del ciclo y las neóginas a los 14,5 días del ciclo. En esta etapa la garrapata posee 4 hileras de dientes a cada lado del hipostoma, y 4 pares de patas (Cuore et al., 2013). Al igual que en la etapa de ninfa, en la de adulto, se puede inocular *B. bigemina* (Cuore et al., 2013; Riek, 1964). Entre los días 17-18 del ciclo alcanzan el estadio de partenogina semi-ingurgitada, encontrándose a la espera de ser fecundada por un macho. Si esto sucede continúa alimentándose para finalizar la fase parasitaria como teleogina ingurgitada. De lo contrario la partenogina muere. A los 19-21 días del ciclo se observan las primeras teleoginas, con un tamaño de 8-13 mm, se desprenden del bovino de forma natural y caen al medio ambiente (Cuore et al., 2013).

Por otro lado, el macho que presenta un apéndice caudal y es más pequeño que la hembra, puede vivir por más de 40 días. Este tiene la característica de ser muy móvil, siendo el único que puede parasitar a otro bovino. Puede prenderse y desprenderse del bovino en busca de alimento y hembras para fecundar. Con respecto a los hemoparásitos puede inocular *B. bigemina* y ser transmisor mecánico de *A. marginale* (Cuore, Solari y Trelles, 2017).

### **1.1.2. CICLO NO PARASITARIO:**

En esta fase, se encuentran infectando las pasturas las teleoginas, huevos y larvas. La duración de este ciclo está condicionada por temperatura y humedad del ambiente (Cuore et al., 2013). En Uruguay tiene una duración mínima de 2 meses (Cuore et al., 2013). De acuerdo a los estudios nacionales la duración máxima del ciclo no parasitario a cielo abierto puede ser de hasta 13 meses (Cuore y Solari, 2022).

La etapa desde que la teleogina se desprende del animal y cae al suelo, hasta el comienzo de la ovipostura se denomina protoquia y desde el comienzo hasta el fin de la ovipostura, ootoquia. Cada oviposición corresponde a 1000-4500 huevos por garrapata, en un período de 14 días en condiciones óptimas (27°C y >80% humedad). La masa de huevos tiene un peso aproximado de 0,1 gramos correspondiente a la mitad del peso de la garrapata (promedio 0,24gramos) (Cuore et al., 2013).

Las condiciones climáticas son las que determinan la duración de la oviposición así como el porcentaje de eclosión. En el verano las altas temperaturas y baja humedad y en el invierno las bajas temperaturas ocasionarán que eclosione un bajo porcentaje de la masa de huevos, o las larvas que emergen serán poco viables. De cualquier manera, en condiciones ambientales ideales eclosionará un 85% del total de huevos (Cardozo y Franchi, 1994; Sanchis, et al., 2008). La garrapata tiene un gran potencial reproductivo e incluso estando un día sumergida bajo agua conserva su capacidad de oviponer. Sin embargo, cuando los huevos se encuentran sumergidos entre 7-14 días tienen una eclosión mínima o nula (Cardozo y Franchi, 1994).

Luego de la eclosión, las larvas por su geotropismo negativo tienen la capacidad de subir a las pasturas. Forman una unión compacta entre ellas esperando su encuentro con el huésped y protegiéndose así de las condiciones adversas (FAO, 2004). Si bien en zonas subtropicales la viabilidad de las larvas se ha reportado que varía entre 4-5 meses (FAO, 2004) se ha observado que en Uruguay pueden permanecer viables hasta 10 meses debido a nuestras condiciones climáticas (Cuore y Solari, 2022). El frío (heladas), la desecación y el agotamiento de sus reservas son las principales causas de muerte (FAO, 2004).

Para poder aplicar un buen programa de control, ya sea tratamientos estratégicos, manejo de pasturas, etc. debemos tener en cuenta dos factores claves: la longevidad larvaria y la tasa de encuentro con el huésped, ésta está determinada por varios factores: la topografía del terreno, época del año, carga larvaria de las pasturas y dotación de huéspedes susceptibles (Cuore et al., 2013). En nuestro país, en otoño es el momento de mayor porcentaje de larvas activas, estación donde se da la tercera generación de garrapatas (Cuore et al., 2013).

## **1.2. MODELO EPIDEMIOLÓGICO:**

En Uruguay durante el período entre 1975 a 1981, el departamento de parasitología de la DILAVE, realizó un estudio epidemiológico de *R. microplus* en diferentes zonas del país (Nari, Cardozo, Berdié, Canabez y Bawden, 1979; Cardozo, Nari, Franchi, Lopez y Donatti, 1984).

Se define como una generación de garrapatas al período transcurrido desde que una larva parasita al bovino, cae como teleogina, oviposita, eclosionan sus larvas y vuelven a parasitar a un bovino. Esta se puede desarrollar en 2 meses en algunos países tropicales o en condiciones de laboratorio (27°C y >80% humedad) (Cuore et al., 2013).

En Uruguay se observó un claro comportamiento de la garrapata, con tres generaciones al año. Sin embargo, dado que en Uruguay se demostró que existen diferentes duraciones del ciclo no parasitario, debido a factores climáticos, se han desarrollado de 1,5 a 3,5 - 4 generaciones al año (Nari et al., 1979; Cardozo et al., 1984; Sanchis et al., 2008, Cuore et al., 2013, 2019).

La primera generación de garrapatas en Uruguay ocurre en el período Agosto - Octubre y corresponde a las garrapatas caídas en otoño (Figura 1). En este período las condiciones climáticas son más favorables en relación al invierno. Debido a esto, los ciclos se acortan y aumenta la fertilidad de la descendencia de las garrapatas, las cuales son las responsables de la segunda generación (Cuore et al., 2013). Las cargas de garrapatas que se encuentran parasitando a los bovinos son bajas, en promedio de 2 a 4 por animal. Pero se ha observado que a la salida del invierno en predios con problemas de resistencia se pueden encontrar hasta 100 garrapatas ingurgitadas por animal (Solari, Cuore, Trelles, Sanchis y Gayo, 2007; Cuore, et al., 2012).

La segunda generación transcurre principalmente entre Noviembre y Diciembre siendo las responsables de esta generación las garrapatas caídas en Agosto - Octubre. En ésta las cargas parasitarias sobre el animal aumentan, con un promedio de 25 garrapatas por animal, las cuales darán origen a la tercera generación (Cuore et al., 2013).

La tercera generación se desarrolla entre Enero y Mayo, observándose en esta la mayor carga de garrapatas por animal (Cuore y Solari, 2022).

Las teleoginas que caen en los meses de otoño probablemente continúen con el ciclo poniendo huevos y estos eclosionando, mientras que, las que caigan en invierno podrán verse afectadas en cuanto a su viabilidad reproductiva por el clima (Cuore et al., 2013). Las larvas que superan el invierno son las responsables de generar la primera generación de la próxima temporada (Cuore y Solari, 2022).

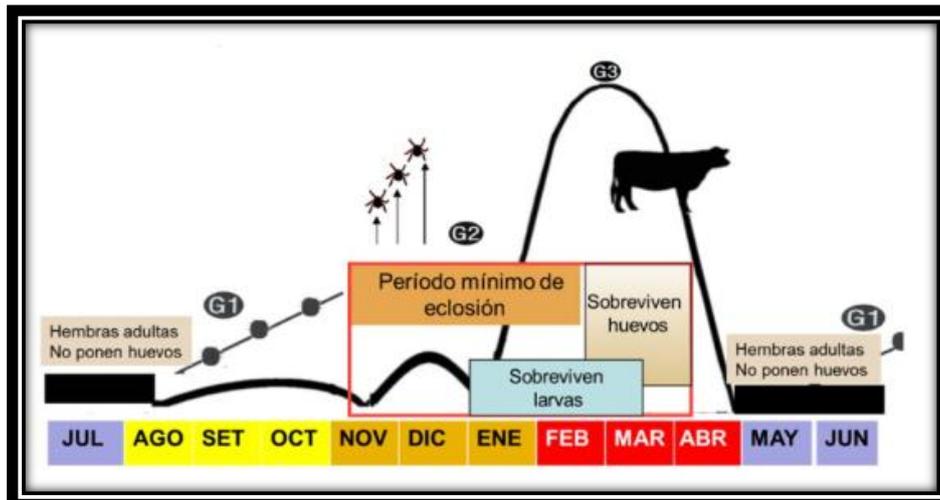


Figura 1. Modelo epidemiológico para la garrapata *Rhipicephalus microplus* (Nari, 1990).

Debido a componentes como el alto potencial biótico de la garrapata y la resistencia, aumenta consecuentemente la población en refugio por lo que pueden existir potreros con altas infestaciones. También puede existir un transporte mecánico de larvas a través del viento y de animales, infectando así áreas limpias de garrapata (Cuore et al., 2013).

### **1.3. SITUACIÓN ACTUAL DE R. MICROPLUS EN URUGUAY:**

En Uruguay las pérdidas económicas que produce el parásito y enfermedades asociadas se estiman entre 32,8 (Avila, 1998), y 46 millones (Muzio, 2006) de dólares al año. Estas comprenden un déficit productivo como la merma en la ganancia de peso vivo, la disminución en la producción de leche, abortos, etc. lo cual en términos de pérdidas financieras el costo por animal asciende a 7,3 dólares anuales (FAO, 2004). Además, implica costos en tratamientos y pérdidas por las enfermedades transmitidas por la garrapata que pueden alcanzar la pérdida total del bovino (Cuore, Solari y Trelles, 2017).

La campaña sanitaria oficial se fundamenta en la ley de lucha contra la garrapata común del bovino, N° 18.268 del 17 de abril de 2008, permitiendo adecuar estrategias para el control de *R. microplus*. El programa de control y erradicación se basa en controlar las zonas libres y realizar una vigilancia epidemiológica en focos y tránsito. Evalúan la resistencia a las enfermedades transmitidas por la garrapata y a los garrapaticidas y realizan una calificación del riesgo epidemiológico dividiendo al país en zonas de alto, mediano y bajo riesgo. Esta campaña también se encarga de evaluar la eficacia de los productos aceptados por la División General de Servicios Ganaderos (DGSG) a través de la División de Laboratorios Veterinarios (DILAVE). Otras de las medidas de control es interdictar los predios de alto riesgo y su saneamiento, la participación de las Comisiones Honorarias de Salud Animal, y la capacitación a los productores y profesionales (Uruguay Ley 18268, 2008).

### **1.4. CONTROL DE LA GARRAPATA:**

A consecuencia de la problemática que genera esta ectoparasitosis resulta muy importante su control. Una de las herramientas de control más utilizadas es el control químico con acaricidas, debido principalmente a su practicidad y en

algunos casos a su amplio espectro de acción contra otros parásitos. En la actualidad, debido a su uso sistemático, su efecto se ha visto desafiado por la aparición de resistencia (Nari, 2005).

#### **1.4.1. CONTROL INTEGRADO DE PARASITOS (CIP):**

El CIP se basa en la convivencia del animal con un grado de parasitosis que permita un equilibrio generando un grado menor de pérdidas económicas. A su vez esto se plantea lográndose combinar una serie de medidas basadas en tratamientos de control no químicos y químicos tradicionales (Cuore et al., 2013).

Dentro de las alternativas no químicas se encuentran agentes biológicos y vacunas contra la garrapata. Otra herramienta de control implica lograr un buen manejo del pastoreo, realizando rotaciones con agricultura y descanso de pasturas, así como el uso de animales genéticamente resistentes como los animales de razas Cebuinas y sus cruza (FAO, 2004).

El principal objetivo del CIP es reducir la presión de selección, logrando esto a través de un uso racional de acaricidas. Como consecuencia se genera una aparición de resistencia más lenta y de esta manera se le da mayor vida útil a los productos, se reduce la contaminación ambiental y minimiza el riesgo de encontrar residuos de estos químicos en carne (Cuore et al., 2013).

#### **1.4.2. TRATAMIENTOS NO QUÍMICOS:**

Vacunas y hongos entomopatógenos son dos alternativas no químicas de control para este ectoparásito. Éstos tienen como ventaja ser amigables con el ambiente y operarios, no desarrollar resistencia, ni dejar residuos en los alimentos de origen animal (Cuore y Solari, 2022).

##### Experiencias en Uruguay de vacunas contra garrapatas:

En 1989 se logra aislar la glicoproteína Bm86, a partir de esta se generaron las vacunas recombinantes contra *R. microplus* (Willadsen et al., 1989), fueron lanzadas al mercado con los nombres Gavac® en 1993 en Cuba, y TickGARD® en Australia en 1994 (De la Fuente et al., 1998). En Colombia se desarrolló TickVac®, siendo este un macerado de larvas, con una forma de acción similar a las vacunas recombinantes, produciendo lesiones en el intestino como en el aparato reproductor de la garrapata.

En Uruguay se estudiaron tres vacunas con antígenos Bm86 y una de macerado de larvas, obteniendo resultados muy variables. Dada la baja eficacia y la variabilidad de los resultados obtenidos, no se ha logrado superar los requisitos establecidos, por lo que aún no se las puede considerar una herramienta válida para un CIP (Cuore et al., 2013). Actualmente se logró expresar de forma recombinante proteínas provenientes de garrapatas del ganado de diferentes zonas del país, se evaluó su potencial como inmunógenos y se llevó a cabo una prueba de establo para su futuro uso como vacuna contra la garrapata *R. microplus* mostrando resultados muy prometedores.

Esta vacuna actualmente se encuentra en etapa experimental presentando un valor cercano a 70% de eficacia global, demostrando una fuerte acción en garrapatas ingurgitadas (Cuore, 2022).

#### Control biológico por hongos:

Para el control de la garrapata pueden utilizarse agentes biológicos, como son los hongos entomopatógenos, los cuales afectan principalmente los estadíos de vida libre de la garrapata (Fernandes, Bitencourt, Roberts, 2012). Existen varios trabajos de investigación con hongos entomopatógenos realizados en Uruguay. Uno de ellos habla de un Biogarrapaticida CreBio7 (Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca, MGAP, 2022), otro estudia al hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* (Olhagaray, 2018). Sin embargo, hasta el momento no se cuenta con el registro oficial de ningún producto a base de hongos para el control del parásito (MGAP, 2021).

#### **1.4.3. MANEJO DE LOS ANIMALES Y LAS PASTURAS:**

##### Rotación agricultura - pastoreo:

Para realizar este tipo de manejos debemos tener en cuenta que el tiempo de descanso que deberíamos darle a una pastura para considerarla libre de garrapatas es mayor a 12 meses (Cuore, 2019), ya que es la duración máxima del ciclo no parasitario reportada en Uruguay. El objetivo de este manejo es de disminuir o eliminar la población de garrapatas en refugio (Cuore et al., 2013). El ingreso de animales libres de garrapatas a un rastrojo o pradera es una buena medida de manejo, ya que la contaminación larvaria se elimina casi totalmente de los terrenos luego de la preparación del suelo para cultivos (laboreo) (FAO, 2003).

##### Rotación Ovino - Bovino:

Para maximizar el control de la garrapata debemos relacionar los tratamientos con químicos que se llevan a cabo para su control junto con el manejo de los animales. Con esta medida se busca disminuir la cantidad de tratamientos a realizar para su control y así retrasar el surgimiento de la resistencia parasitaria (Cuore et al., 2013).

Si bien se ha observado que los ovinos pueden ser parasitados por *R. microplus*, se encuentran menores cargas parasitarias en pastoreos mixtos con ovinos que en situaciones de pastoreos con bovinos solos. Una buena práctica de manejo sería pastorear con ovinos como mínimo dos meses. Durante este período disminuyen en gran cantidad las larvas en refugio debido a que existe una mayor desecación de los estados no parasitarios (larvas y huevos), así como una mayor exposición a los rayos UV debido al tapiz vegetal bajo, a causa del pastoreo conjunto con ovinos (Cuore et al., 2013; FAO, 2004).

#### **1.4.4. TRATAMIENTO GENERACIONAL DE LA GARRAPATA:**

El esquema de tratamiento generacional es una metodología de trabajo que requiere para su aplicación el conocimiento de la epidemiología de la garrapata en Uruguay, el desarrollo de un modelo conceptual, el conocimiento del mecanismo de acción de los acaricidas en relación a su eficacia y poder residual, la selección de acaricidas eficaces gracias a la realización de diagnósticos de resistencia y la rotación de acaricidas; favoreciendo el entretamiento de la circulación de genes resistentes (Cuore y Solari, 2022).

Considerando que se desarrollan tres generaciones de garrapatas por año, variando según las condiciones climáticas y distintos ecosistemas y sabiendo que la genética de resistencia para un principio activo se trasmite de forma vertical a la descendencia de la garrapata tratada, responsables de formar la

siguiente generación (Figura 2). Restringir el empleo de un principio activo únicamente a una generación, no debería aumentar la presión de selección para resistencia de una población dada (Cuore et al., 2013). En este sentido es fundamental realizar un diagnóstico de resistencia a los acaricidas para luego aplicar únicamente aquellos para los que la población a tratar tenga sensibilidad. Idealmente se debería utilizar un acaricida, para el cual haya sensibilidad en la población, correspondiente a un grupo químico diferente para cada una de las tres generaciones de garrapata que se desarrollan en Uruguay (Cuore et al., 2013). El médico veterinario debe de ser el encargado de adaptar las bases teóricas del tratamiento generacional al sistema productivo del establecimiento y de llevar a cabo esta metodología (Cuore et al., 2013).

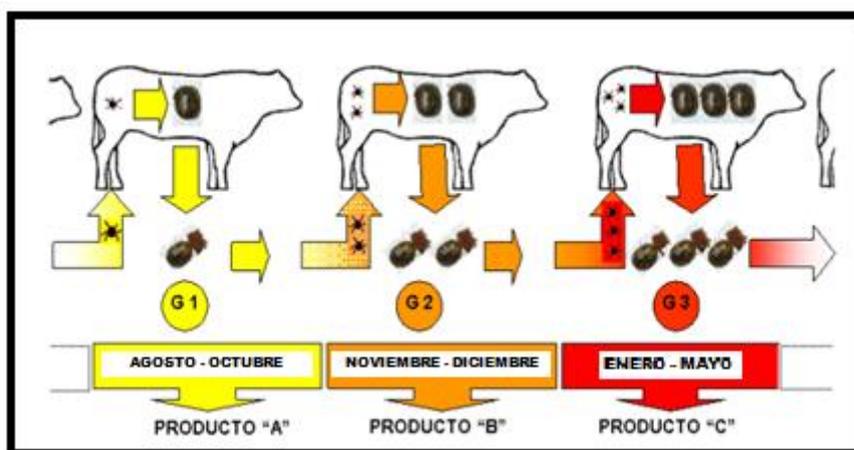


Figura 2. Modificado de Esquema de tratamiento generacional de la garrapata (Cuore y Solari, 2022).

### **1.5. RESISTENCIA:**

Stone en 1972 define resistencia como "...la habilidad de una población de parásitos para tolerar dosis de tóxicos que serían letales para la mayoría de los individuos de una población normal (susceptibles) de la misma especie". También se puede definir como la disminución de la susceptibilidad de un parásito a un acaricida o insecticida siendo estos utilizados a concentraciones adecuadas y siguiendo todas las indicaciones para su uso (FAO, 2004). Un concepto clave en cuanto a la resistencia es que se ve favorecida por el uso sistemático de los acaricidas químicos (FAO, 2004).

#### **1.5.1. ETAPAS EN EL DESARROLLO DE LA RESISTENCIA:**

La primera etapa del desarrollo es el establecimiento de la resistencia, ésta pasa usualmente desapercibida a nivel de campo debido a la baja cantidad de individuos resistentes. La siguiente etapa es la de dispersión, se logra continuando en el tiempo la presión de selección genética aplicando un mismo acaricida. De esta manera se permite la reproducción de los individuos resistentes a éste, aumentando así su presencia en la población, no apreciándose aún a nivel de campo. Por último, se da la etapa de emergencia, en este momento se detecta el fallo en la eficacia del acaricida utilizado debido a que al menos un 10% de las garrapatas son resistentes, siendo evidente a nivel de campo (Sutherst y Commins, 1979).

### **1.5.2. FACTORES QUE INTERVIENEN EN LA EVOLUCIÓN DE LA RESISTENCIA:**

La evolución de la resistencia se explica por diversos factores, pudiéndolos agrupar en: factores intrínsecos y factores operativos. Los factores intrínsecos son características inherentes del parásito. Su conocimiento fundamentalmente referido a factores genéticos y epidemiológicos, nos permite desarrollar mejores estrategias de control. Por otro lado, los factores operativos son hechos que inciden en acelerar o no la etapa de emergencia de la resistencia. Se refiere a la elección de un garrapaticida, a una frecuencia de aplicación y a la dosis-concentración aplicada (Sutherst y Commins, 1979).

### **1.5.3. SITUACIÓN ACTUAL DE LA RESISTENCIA EN URUGUAY:**

Uno de los principales problemas en torno a la garrapata *R.microplus* en Uruguay es la resistencia que existe frente a la mayoría de los grupos químicos garrapaticidas, impidiendo el control del ectoparásito (MGAP, 2017). Al día de hoy se cuenta con herramientas que permiten diagnosticar la resistencia a 5 de los 6 grupos químicos habilitados en Uruguay (Figura 3). Esto se hace por medio de bioensayos que lleva adelante el Departamento de Parasitología de la DILAVE, Montevideo (Cuore y Solari, 2022).

En Uruguay, se diagnosticaron por primera vez poblaciones resistentes a los arsenicales en 1950 (Cardozo y Franchi, 1994), luego se constató resistencia a los organofosforados en 1978 (Petraccia, Cardozo, Nari y Solari, 1983), en 1994 a los piretroides sintéticos y sus mezclas (Cardozo y Franchi, 1994). En el año 2006 se descubre la resistencia a los fenilpirazoles (Cuore, Trelles, Sanchis, Gayo y Solari, 2007), en 2009 a las amidinas (Cuore et al., 2012) y en 2010 a las lactonas macrocíclicas (Castro-Janer et al., 2012).

Con respecto al fluazuron, en Uruguay no hay un diagnóstico oficial de resistencia, pero sí existe en Brasil (Reck et al., 2014). Sin embargo, existen sospechas de resistencia al fluazuron evaluadas por la técnica Test de inmersión de adultos modificado para fluazuron (TIAMF) (Saporiti, 2019). Para comprobar definitivamente la resistencia al fluazuron es necesario realizar una prueba en boxes, debido a que es un producto que si bien se aplica por derrame dorsal, presenta un efecto sistémico afectando las mudas y en los adultos fundamentalmente la inhibición de la eclosión. Su forma de aplicación hace que se pueda ver afectado por factores climáticos, su acción sistémica puede variar según el estado fisiológico del animal y como todo fármaco su eficacia se puede ver afectada por errores en la aplicación del producto (Saporiti, 2019).

Organofosforados	Piretroides	Mezclas	Fipronil	Amitraz	Lactonas	Fluazuron
1978	1994	1994	2006	2009	2010	Negativo

Figura 3. Evolución de los diagnósticos oficiales de resistencia a los acaricidas en Uruguay. Tomado del Manual Práctico para el control de la garrapata común del ganado y enfermedades asociadas (Cuore y Solari, 2022).

De acuerdo a la situación planteada anteriormente respecto a la relevancia de esta parasitosis, de su control y la resistencia de este parásito, es de gran importancia contar con nuevas herramientas para su control.

Es primordial disponer de un nuevo acaricida para sortear este obstáculo que significa la resistencia, pero actualmente la probabilidad de que la industria farmacéutica lo desarrolle es baja, debido principalmente a que el foco está en el desarrollo de combinaciones de acaricidas existentes y de cambios en las dosis (Nari, 2005).

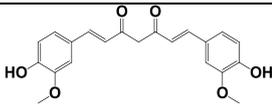
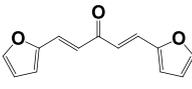
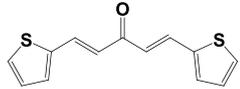
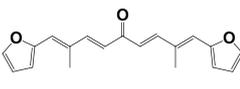
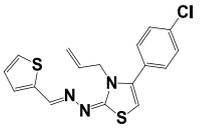
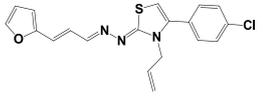
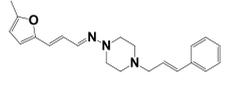
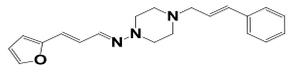
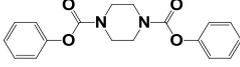
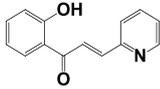
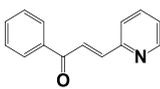
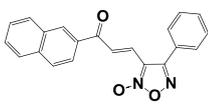
### **1.6. CRIBADOS FENOTÍPICOS EN LA LÍNEA CELULAR EMBRIONARIA DE *R. MICROPLUS* BME26 Y CÉLULAS DE MAMÍFEROS:**

Habiéndose observado, en ensayos realizados por el Laboratorio de Moléculas Bioactivas, porcentajes de inhibición del crecimiento de cultivos de la línea celular embrionaria de *R. microplus* BME26, utilizando extractos vegetales, así como moléculas sintéticas (Tabla 1 y 2) se decidió analizar su efecto en parásitos vivos.

Tabla 1. Cribado fenotípico a 100 µg/ml de extractos vegetales en la línea celular embrionaria de *R. microplus* BME26 y células de mamífero.

Código de colección	Nombre científico/ común / tejido/ solvente de extracción	% inhibición del crecimiento de BME26	% de inhibición del crecimiento de células de mamíferos (IC) (Fort et al., 2018)	Visualización de la planta
T25	<i>Ipomoea pes-caprae</i> (Riñonera) ramas y hojas en MeOH	70±7	0	
T19	<i>Malmea depressa</i> (Elemuy) hojas y ramas en MeOH	63±7	75	

Tabla 2. Cribado fenotípico a 100  $\mu\text{M}$  y concentración inhibitoria del 50% del crecimiento de compuestos sintéticos en la línea celular embrionaria de *R. microplus* BME26 y células de mamífero.

Código de colección	Estructura	% inhibición del crecimiento de BME26	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ ) en BME26	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ ) Células de mamífero
906		95	24 $\pm$ 3	<25
795		80	20 $\pm$ 3	>50
796		93	15 $\pm$ 3	>50
809		50	>100	>50
133		71	>50	>50
266		77	>100	>50
903		75	>50	>50
912		52	>50	>50
715		64	>50	ND
885		91	17 $\pm$ 4	>50
1455		nd	Nd	>50
1456 <sup>a</sup>		95	12 $\pm$ 1	>50

nd- no determinado

## **2. HIPÓTESIS:**

Los compuestos sintéticos, así como los extractos de plantas, que presentan inhibición del crecimiento de cultivos de células embrionarias de *R. microplus* BME26, también afectan la viabilidad de la garrapata.

## **3. OBJETIVOS:**

### **3.1. OBJETIVOS GENERALES:**

Evaluar la capacidad acaricida de moléculas sintéticas y extractos vegetales en diferentes estadios de la garrapata común del ganado mediante técnicas de laboratorio.

### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

1. Evaluar por medio del TIL 2 extractos vegetales y 12 moléculas sintéticas, utilizando la cepa susceptible Mozo.
2. Evaluar mediante el TIL en poblaciones de campo los compuestos que hayan presentado algún efecto acaricida en la cepa susceptible Mozo.
3. Evaluar en poblaciones de campo y en cepas Mozo mediante el TIA el compuesto que tuvo mayor efecto acaricida en el TIL.
4. Evaluar la citotoxicidad en células de mamífero (espermatozoide bovino) el compuesto que haya presentado el mayor efecto acaricida mediante el TIL en la cepa Mozo.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS:**

### **4.1. DISEÑO EXPERIMENTAL:**

Se estudió el efecto acaricida, por medio del TIL de 12 moléculas de la quimioteca del Laboratorio de Moléculas Bioactivas del Centro Universitario Regional Litoral Norte sede Paysandú y 2 extractos de plantas medicinales del Sureste de México. Estas fueron seleccionadas según el efecto citotóxico frente a células en cultivo de *R. microplus* (Saramago et al., 2018).

En primer lugar se utilizó para este estudio garrapatas de la cepa Mozo, cepa susceptible a todos los acaricidas habilitados en Uruguay, mantenida en condiciones controladas por el departamento de Parasitología de la División de Laboratorios Veterinarios (DILAVE) de Montevideo. Luego se analizaron mediante TIL en poblaciones de campo los compuestos que presentaron algún efecto acaricida en la cepa Mozo. Aquel compuesto que haya presentado mayor efecto acaricida mediante TIL en la cepa susceptible Mozo fue evaluado mediante TIA en la cepa Mozo así como en poblaciones de campo. Una vez obtenidos los resultados se procedió al estudio citotóxico del compuesto que presentó mayor efecto acaricida en la cepa Mozo.

### **4.2. EVALUACIÓN DEL EFECTO ACARICIDA DE LOS COMPUESTOS:**

Obtención de las garrapatas: La DILAVE, Montevideo, aportó la cepa Mozo (tanto adultas como larvas), mientras que se realizó un muestreo en un establecimiento para obtener la población de campo que presentó un perfil de multirresistencia como se puede observar en la tabla 3. La información correspondiente al perfil de resistencia obtenido fue brindada por el Laboratorio de estudios de sensibilidad a acaricidas en la garrapata común del ganado, sede regional norte Artigas.

Tabla 3. Datos de resistencia de la población de campo utilizada para los ensayos de TIL y TIA aportados por el Laboratorio de estudios de sensibilidad a acaricidas en la garrapata común del ganado, sede regional norte Artigas.

		%Resistencia
TPL	Cipermetrina	29,63768116
	Ethion	0
	Amitráz	0
	Fipronil	1,409569188
	Ivermectina	1,282051282
		% Resistencia    %Eclosión
TIA	Amitráz	89,7
	Cip + Eth	20,8
	Fluaz	76,7

TPL: Test de paquete de larvas.

TIA: Test de inmersión de adultos.

Sustancias a evaluar: consisten en extractos de plantas medicinales del Sureste de México y compuestos sintéticos provenientes del Laboratorio de Moléculas Bioactivas del Centro Universitario Regional Litoral Norte sede Paysandú (Tabla 1 y 2).

Soluciones: Los compuestos se diluyen en Dimetilsulfóxido (DMSO) y se llevan a una concentración de 3,0 mM sin sobrepasar el 15 % v/v de DMSO en agua (Cover et al., 2022) mientras que los extractos vegetales se diluyen a una concentración de 1mg/mL.

Se utiliza como control negativo DMSO al 15 % v/v en agua, y como control positivo para el TIA Amitraz (Acarmic, Laboratorio Microsules) a una concentración de 0,85 mM (concentración comercial para baño), el control positivo para el TIL es Ivermectina (Sanimax, Laboratorio Adler) a una concentración de 0,082 mM (concentración letal 99 definida por Castro-Janer et al., 2012).

Test de Inmersión para Adultos TIA (modificada de Drummond, Ernst, Trevino, Gladney y Graham, 1973):

Se utilizaron teleoginas que se seleccionaron según forma uniforme y simetría, el tamaño de no menos de 8 mm, de coloración marrón, que no sea amarillenta, rojiza, blanquecina ni negra y se evaluó su capacidad de caminar como signo de viabilidad (Figura 4 y 5). Se sumergieron 5 garrapatas de la cepa Mozo y 8 garrapatas de población de campo en un tubo tipo Falcon conteniendo 10 mL de solución con compuesto o control (según se mencionó anteriormente) durante 30 minutos (Figura 6). Luego de la inmersión, las hembras previamente sumergidas se secaron cuidadosamente con papel absorbente, se masaron y colocaron individualmente en tubos tipo Falcon de 15 mL identificados con la garrapata que contenían y el tratamiento que se evaluó o como control (Figura 7). A estos se les agregó algodón humedecido con agua destilada (esfera de 0,5 cm de diámetro) se los tapó con una torunda de algodón y se incubaron a 28 °C con una humedad relativa (HR) de 85-90% durante 14 días. Luego se registró la masa de los huevos, se humedeció

nuevamente la esfera de algodón con agua destilada, se tapó y se incubaron nuevamente bajo las condiciones ya mencionadas por un período de dos meses. Transcurrido este período de tiempo se registró el porcentaje de eclosión por el método visual.

Finalmente se calculó:

Reproducción estimada (RE) = (masa de huevos/masa de teleogina) x el porcentaje de eclosión x 2000.

% de control = [(RE de teleogina control - RE de teleogina tratada) / RE de teleogina control] x 100.



Figura 4 y 5. Selección de teleoginas.



Figura 6. Garrapatas sumergidas en solución compuesto.



Figura 7. Pesada de garrapatas.

Test de Inmersión de Larvas (Modificada de Castro-Janer et al., 2012):

Se incubaron teleoginas en las condiciones anteriormente mencionadas hasta la ovipostura, a las 2 semanas se pasaron los huevos a tubos que contenían una torunda de algodón humedecido con agua destilada, luego se taparon con algodón para incubarse a las condiciones previamente mencionadas para TIA. Se utilizaron larvas de 14 a 21 días de eclosionadas para realizar la inmersión. Luego se colocó 1 mL de solución de inmersión en un tubo de tipo Eppendorf, por duplicado para cada tratamiento y control. Se colocaron los tubos conteniendo las larvas en forma vertical con el extremo abierto hacia arriba. Dado que las larvas presentan un geotropismo negativo, estas subieron y aquellas que se encontraron en el borde del tubo fueron consideradas viables y se utilizaron para el test (Figura 8). Se colocó un cúmulo de 2 mm de diámetro con aproximadamente 100 larvas en cada uno de ellos, dejando las larvas en inmersión durante 10 minutos homogeneizando manualmente (Figura 9). Luego se extrajeron las larvas y se colocaron en sobres de papel Whatman N°1 cortados en rectángulos de 8,5 a 7,5 cm y doblados a la mitad. Estos sobres se cerraron con pinzas cocodrilo y se incubaron por 24 horas a las condiciones ya mencionadas (Figura 10). Transcurridas las 24 horas se abrieron los sobres y se evaluó el % de mortalidad, tomándose éste como % de control.



Figura 8. Selección de larvas viables para el TIL.



Figura 9. Cúmulo de 100 larvas en tubos de tipo Eppendorf para tratamiento y control.



Figura 10. Larvas en sobres de papel Whatman N°1.

#### **4.3. - EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD EN ESPERMATOZOIDE BOVINO (FERRARO ET AL., 2020):**

Las muestras de espermatozoos se obtuvieron de toros Polled Hereford del banco de semen de Gensur Ltda Montevideo. Se mantuvieron congeladas bajo nitrógeno líquido en pajuelas de 0,5 mL (Andromed, Minitube, Alemania) hasta su uso (Figura 11). Se descongelaron muestras de dos pajuelas y se preparó una reserva de espermatozoos en una solución tampón de fosfato salino PH 7,4 a una concentración de 40 millones de espermatozoides por mL, luego 50 µL de esta suspensión de espermatozoos se mezcló con 50 µL del compuesto diluido a 100 µM o con DMSO al 1 % v/v en el control.

El compuesto se ensayó por duplicado en placas de 96 pocillos incluyendo los controles. Las placas se incubaron a 37 °C durante 30 minutos con agitación moderada (Figura 12). Luego 10 µL de cada muestra se colocaron en una cámara de conteo de Makler (profundidad 10 µm, Sefi-Medical Instruments, Israel). Mediante el uso del sistema Androvision (Minitube, Tiefenbach, Alemania) del CASA (Analizador de semen asistido por computadora) utilizando un microscopio Olympus BX 41 (Olympus, Japón) equipado con una platina caliente a 37 °C. Se filmaron cuatro campos microscópicos para cada duplicado de cada muestra y se realizó visualmente el conteo de espermatozoides vivos (spzv) y muertos (spzm) de cada muestra de los cuatro campos microscópicos en 100 células. Con esos datos se calculó:

Cantidad de células relativas luego de 30 minutos de incubación= (spz totales - spzv). Spzv son aquellos que mostraron parámetro de motilidad progresiva.

% citotoxicidad del compuesto 885 = [(número de células relativas del control - número de células relativas del 885)\*100] / número de células relativas del control -.



Figura 11. Extracción de muestras de semen congeladas.



Figura 12. Incubación de placas a 37 °C durante 30 minutos con agitación moderada.

#### **4.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO:**

Para evaluar si los compuestos presentan algún efecto acaricida utilizando el TIL se realizó un test de Chi-cuadrado para comparar la variable mortalidad (vivos vs muertos) con la variable tratamiento (control negativo vs compuesto), utilizando el programa R (paquete Rcmdr). Aquellos compuestos que presentan un valor de p inferior a 0,05 se consideran que tienen un efecto acaricida ya que hay una dependencia entre la mortalidad y el tratamiento. Para los datos de citotoxicidad se realizó también un test de Chi-cuadrado para comparar la variable mortalidad (spzv vs spzm) con la variable tratamiento (control negativo vs compuesto 885), utilizando el programa R (paquete Rcmdr). Los valores de p inferior a 0,05 se consideran que presenta toxicidad en las condiciones estudiadas ya que hay una dependencia entre la mortalidad de los espermatozoides y el tratamiento con el compuesto 885.

#### **5. RESULTADOS:**

A continuación se presentan los resultados del TIL en la cepa Mozo y población de campo. Se comparan los % de mortalidad de cada tratamiento con el control negativo de su repetición para resaltar aquellos compuestos que son significativamente diferentes, evidenciando una mortalidad asociada al tratamiento (Tabla 4, 5 y 6).

Tabla 4. Resultados del TIL en cepa Mozo de los extractos de plantas a 1 mg/mL por duplicado.

TRATAMIENTO	%MORTALIDAD Repetición 1	%MORTALIDAD Repetición 2	% MORTALIDAD Promedio
Control+	100	100	100
Control -	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0
T25	1,9 <sup>a</sup>	2,1 <sup>a</sup>	2,0
T19	6,3 <sup>b</sup>	2,0 <sup>a</sup>	4,2

<sup>a</sup> valor de p superior a 0,05, <sup>b</sup> valor de p inferior a 0,05.

No se observó ningún extracto vegetal que presentara un valor de p inferior a 0,05 para ambas repeticiones realizadas con el TIL en la cepa Mozo.

En la tabla 5 se muestran los resultados obtenidos con los compuestos químicos para la cepa Mozo, donde se resaltan con color verde los resultados que presentaron un valor de p inferior a 0,05 en ambas repeticiones según el test Chi-cuadrado.

Tabla 5. Resultados del TIL en cepas Mozo a 3mM de los 12 compuestos sintéticos por duplicado.

TRATAMIENTO	%MORTALIDAD Repetición 1	%MORTALIDAD Repetición 2	% MORTALIDAD Promedio
Control +	100	100	100
Control -	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0
133	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0
885	11,0 <sup>b</sup>	42,0 <sup>b</sup>	26,5
1456	4,6 <sup>a</sup>	3,7 <sup>a</sup>	4,2
266	7,1 <sup>b</sup>	8,3 <sup>b</sup>	7,7
912	30 <sup>b</sup>	7,1 <sup>b</sup>	18,6
715	6,7 <sup>b</sup>	28,0 <sup>b</sup>	17,4
903	8,8 <sup>b</sup>	15,0 <sup>b</sup>	11,9
796	3,6 <sup>a</sup>	2,0 <sup>a</sup>	2,8
906	2,8 <sup>a</sup>	1,4 <sup>a</sup>	2,1
809	2,9 <sup>a</sup>	2,6 <sup>a</sup>	2,8
795	12,0 <sup>b</sup>	1,4 <sup>a</sup>	6,7
1455	1,3 <sup>a</sup>	8,8 <sup>a</sup>	5,1

<sup>a</sup> valor de p superior a 0,05, <sup>b</sup> valor de p inferior a 0,05.

Tabla 6. Resultados del TIL en la población de campo multirresistente a 3mM por duplicado de los 5 compuestos que presentaron diferencia significativa en ambas repeticiones respecto al control negativo en el TIL en la cepa Mozo.

TRATAMIENTO	%MORTALIDAD Repetición 1	%MORTALIDAD Repetición 2	%MORTALIDAD Promedio
Control +	100	100	100
Control -	2,9 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	1,5
903	2,4 <sup>a</sup>	6,4 <sup>a</sup>	4,4
715	13,0 <sup>a</sup>	6,5 <sup>a</sup>	9,8
266	1,7 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0,9
885	37,0 <sup>b</sup>	16,0 <sup>b</sup>	26,5
912	24,0 <sup>b</sup>	4,3 <sup>a</sup>	14,2

<sup>a</sup> valor de p superior a 0,05, <sup>b</sup> valor de p inferior a 0,05.

Se destaca en la tabla 6, con color verde, al compuesto 885 que mantiene un valor de p inferior a 0,05 al analizarse mediante el TIL en la población de campo.

En las siguientes tablas (Tablas 7 y 8) se muestran los porcentajes de control del TIA en la cepa Mozo y en la población de campo multirresistente en las cuales se evalúa el compuesto sintético 885 a 3 mM debido a los resultados que obtuvo para el TIL con respecto a los demás compuestos estudiados.

Todos los controles positivos lograron un control del 100% para la cepa Mozo. Para la población de campo se observó un porcentaje de control con el Amitraz de 10,3%.

Tabla 7. Porcentaje de control del compuesto sintético 885 evaluado a 3mM con el TIA en la cepa Mozo en 5 garrapatas y su porcentaje de control promedio.

Compuesto	% Control por garrapata					% Control promedio
885	12	21	1	5	2	8

%control = Porcentaje de control

Tabla 8. Porcentaje de control del TIA en 8 garrapatas de la población de campo multirresistente para el compuesto 885 a 3 mM y su porcentaje de control promedio.

Compuesto	% Control por garrapata								% Control promedio
885	100	48	21	7	23	14	13	12	30

%control = Porcentaje de control

En la Tabla 9 se evidencia la citotoxicidad que demostró el compuesto 885 a 100 µM evaluado en espermatozoides bovinos.

Tabla 9. Se presenta el número relativo de células del control negativo y del compuesto 885, el porcentaje de citotoxicidad del 885 obtenido con el estudio en espermatozoides bovinos y en células de cultivo BME.

Control - (número relativo de células)	885 (número relativo de células)	% citotoxicidad	% citotoxicidad en BME
60 <sup>a</sup>	41 <sup>b</sup>	32	91
56 <sup>a</sup>	36 <sup>b</sup>	36	

Número relativo de células= vivas a los 30 minutos de incubación.

<sup>a</sup>-valor p mayor a 0,05 <sup>b</sup>- valor p menor a 0,05

% citotoxicidad debido al 885 = [(número de células relativas del control- número de células relativas del 885)\*100] / número de células relativas del control -.

% citotoxicidad BME = % Cribado fenotípico a 100 µM en la línea celular embrionaria de *R. microplus* BME26 (Tabla 2).

## 6. DISCUSIÓN:

Las técnicas utilizadas nos permitieron observar que algunos compuestos afectaron la viabilidad de las garrapatas analizadas y otros no. Por ejemplo, los dos extractos vegetales evaluados con el TIL con la cepa Mozo no presentaron resultados significativos respecto al control negativo, siendo que se utilizó una concentración entre 5 y 10 veces mayor a la utilizada para el cultivo de células BME26. Si bien podría ser que estos extractos no presenten un efecto tóxico

para la garrapata este resultado también podría deberse a las dosis altas y la baja solubilidad de los compuestos y que al utilizar soluciones tan concentradas no podemos asegurar cuanto de las sustancias activas penetran en cada garrapata (Scoralik, Daemon, de Oliveira Monteiro, 2012; Cheng et al., 2020). Al ser una técnica de inmersión no es posible asegurar cual es la dosis absorbida por cada una de las larvas testeadas, lo cual podría resultar en no observarse resultados significativos entre los extractos y el control negativo.

De los compuestos sintéticos analizados con el TIL con la cepa Mozo se destaca el 885 con un porcentaje de mortalidad promedio de 26,5%. También se observa que el análisis estadístico en ambas repeticiones demostró que estos resultados de mortalidad dependen significativamente del tratamiento. Esto coincide con los datos obtenidos en el ensayo in vitro de células BM86, donde se observó como uno de los compuestos más activos. El análisis estadístico también demostró que los resultados de mortalidad obtenidos con los compuestos 912, 903, 715 y 266, mediante el TIL, también mostraron dependencia significativa con el tratamiento. Sin embargo, de estos cinco compuestos mencionados anteriormente solo el 885 fue el que presentó resultados de mortalidad que dependieron significativamente del tratamiento usando el TIL en una población de campo, multirresistente. Esta observación puede deberse a diversos factores, por ejemplo a la baja solubilidad de los compuestos a dosis altas (Scoralik et al., 2012). Otro factor podría ser la técnica utilizada, que como mencionamos anteriormente esta no asegura una penetración homogénea de los compuestos en todas las garrapatas utilizadas en cada repetición. Si bien esto pudo haber llevado a cuestionamientos de las técnicas de inmersión por otros investigadores (Jonsson y Hope, 2007), el TIL brinda la gran ventaja de ser una técnica de bajo costo y práctica para realizar un screening de moléculas permitiendo aumentar el número de individuos evaluados por repetición. La multirresistencia (Tabla 3) también podría ser responsable de esta observación, ya que al tratarse de una población multirresistente podría tener resistencia cruzada con algunos de estos compuestos (Roush, 1993).

El compuesto 885 presentó diferentes porcentajes de control al ser analizado por el TIA. Se observa que para la población de campo dio un porcentaje de control promedio mayor que para la cepa Mozo. Esto podría deberse a las condiciones óptimas en las que se encuentra la cepa Mozo a diferencia de la población de campo que puede sufrir el efecto climático (Cardozo y Franchi, 1994), el efecto de hongos (Fernandes, Bitencourt, Roberts, 2012), bacterias (Samish y Rehacek, 1999), etc. Para mejorar el dato obtenido con el TIA sería recomendable repetir los estudios con un mayor número de individuos y analizar a la población de campo en las mismas condiciones que la cepa Mozo; manteniendo su ciclo en condiciones controladas de laboratorio.

Debido a los resultados que demostró el compuesto 885 descritos anteriormente, consideramos necesario analizar su citotoxicidad, en este caso

en espermatozoide bovino. Es así que se evaluó a 100  $\mu$ M, siendo esta la dosis máxima que podemos alcanzar para solubilizarlo, sabiendo que este ensayo no admite más del 1% DMSO (Ferraro et al., 2020). Se demostró que a la concentración evaluada la mortalidad de los espermatozoides obtenida depende de forma significativa al tratamiento con este compuesto, en ambas repeticiones. La comparación del porcentaje de citotoxicidad obtenido en células de garrapata y el obtenido en espermatozoides demuestra un grado de selectividad del compuesto por la garrapata en vez de las células de mamífero a la misma dosis.

En cuanto a la química de este compuesto, es un derivado curcuminoides (del tipo 906 la curcumina), pero más estable metabólicamente. Siendo este compuesto susceptible a la biodegradación por microorganismos, que lo hacen interesante desde el punto de vista de permanencia en el ambiente y también en la eliminación de los residuos. Estos compuestos presentan vidas medias estimadas cortas, que puede ser ventajoso en una futura aplicación como acaricida. Además, según la información otorgada por el laboratorio de moléculas bioactivas, tiene una síntesis sencilla y económica que redundaría en un producto de bajo costo (Metzler, Pfeiffer, Schulz y Dempe, 2013).

## **7. CONCLUSIONES:**

De los 12 compuestos como los 2 extractos de plantas, que presentan inhibición del crecimiento en cultivos de células embrionarias de *R. microplus* BME26, 5 compuestos presentaron efecto en la viabilidad de la garrapata mediante el TIL en cepa Mozo.

De los 2 extractos de plantas no se mostro actividad acaricida.

De los compuestos sintéticos se destaca el 885 que presento también efecto en larvas en una población de campo multirresistente, así como en adultas en la cepa Mozo, y en una población de campo multirresistente.

Sería conveniente continuar investigando para evaluar otras concentraciones y trabajar en la formulación del compuesto para mejorar su actividad acaricida.

En los ensayos in-vitro toxicológicos se vio selectividad por las células de la garrapata en vez de células de mamífero a la misma dosis.

La actividad acaricida y la baja toxicidad del compuesto 885 merece seguir en estudio para ser utilizado como un nuevo acaricida para el control de la garrapata común del ganado.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Avila, D. (1998). *Análisis Cuantitativo de los Costos a Nivel del País y del Productor por la Presencia de la Garrapata en el Uruguay* (Informe). Montevideo: IAEA-DILAVE-MGAP.
- Cardozo, H., Nari, A., Franchi, M., López, A., y Donatti, N. (1984). Estudios sobre la ecología de *Boophilus microplus* en tres áreas enzoóticas del Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)*, 20 (86/87), 4-10.
- Cardozo, H. y Franchi, M. (1994). Epidemiología y Control de *Boophilus microplus*. En A. Nari, y C. Fiel, *Enfermedades parasitarias de importancia económica en Bovinos* (369-402). Montevideo, Uruguay: Hemisferio Sur.
- Castro-Janer, E., Schumaker, T.T.S., Klafke, G.M., Rifran, L., González, P., Niell, C., ... Miller, R.J. (2012). *Garrapata: Resistencia a fipronil e ivermectina en rodeos vacunos de Uruguay y Brasil*. Recuperado de <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/2830/1/18429230712114518.pdf>
- Cheng, Z.H., Fan, F.F., Zhao, J.Z., Li, R., Li, S.C., Zhang, E.J., ... Tian, Y.M (2020). Optimization of the microemulsion formulation of curcuma oil and evaluation of its acaricidal efficacy against *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval) (Acari: Tetranychidae). *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 23 (4), 1014-1022.
- Cover, K., Colla, M., Dedavid, L., Randall, L., Corvo, I. Saporiti, T., ... Alvarez, G. (2022). Novel tick glutathione transferase inhibitors as promising acaricidal compounds. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 13, 101970.
- Cuore, U. (2019). *Control sustentable de parásitos en condiciones de silvopastoreo con énfasis en garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* y hemoparásitos*. Recuperado de [https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/sites/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/files/documentos/publicaciones/inia-fpta-80-proyecto-3382019\\_compressed.pdf](https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/sites/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/files/documentos/publicaciones/inia-fpta-80-proyecto-3382019_compressed.pdf)
- Cuore, U. (2022). Control integrado en la garrapata *Rhipicephalus microplus*. Perspectivas en el uso de vacunas recombinantes contra la garrapata. Resultados preliminares obtenidos con una vacuna de desarrollo nacional. En Centro Médico Veterinario de Paysandú, *Jornadas Uruguayas de Buiatría* (Vol. XLIX, pp. 26-37). Paysandú: CMVP.
- Cuore, U., Altuna, M., Cicero, L., Fernández, F., Luengo, L., Mendoza, R., ... Trelles, A. (2012). Aplicación del tratamiento generacional de la garrapata en la erradicación de una población multirresistente de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)*, 48(187), 5-13.

- Cuore, U., Cardozo, H., Solari, M., y Cicero, L. (2013). Epidemiología y control de la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. En: C. Fiel y A. Nari. *Enfermedades parasitarias de importancia clínica y productiva en rumiantes* (pp. 457-484) Montevideo: Hemisferio Sur.
- Cuore, U., Solari, M.A., y Trelles, A. (2017). Situación de la resistencia y primer diagnóstico de poblaciones de garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* resistente a cinco principios activos en forma simultánea en Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)*, 53(205), 13-19.
- Cuore, U., Trelles, A., Sanchís, J., Gayo, V., y Solari, M.A. (2007). Primer diagnóstico de resistencia al Fipronil en la garrapata común del ganado *Boophilus microplus*. *Veterinaria (Montevideo)*, 42(165-166), 35-41.
- Cuore, U., y Solari, M. A. (2022). *Manual Práctico para el control de la garrapata común del ganado y enfermedades asociadas*. Recuperado de [https://descargas.mgap.gub.uy/Documentos%20compartidos/CEV\\_Manual\\_practico\\_para\\_el\\_control\\_de\\_la\\_garrapata\\_comun\\_del\\_ganado\\_y\\_enfermedades\\_asociadas.pdf](https://descargas.mgap.gub.uy/Documentos%20compartidos/CEV_Manual_practico_para_el_control_de_la_garrapata_comun_del_ganado_y_enfermedades_asociadas.pdf)
- De la fuente, J., Rodríguez, M., Redondo, M., Montero, C., García-García, J., Mendez, L., ... García, L. (1998). Field studies and cost-effectiveness analysis of vaccination with Gavac™ against the cattle tick *Boophilus microplus*. *Vaccine* 16(4), 366-373.
- Drummond, R.O., Ernst, S.E., Trevino, J.L., Gladney, W.J., y Graham, O.H. (1973). *Boophilus annulatus* and *Boophilus microplus*: Laboratory test of insecticides. *Journal of Economic Entomology*, 66 (1), 130-133.
- Fernandes, E.K., Bitencourt, V.R., y Roberts, D.W. (2012). Perspectives on the potential of entomopathogenic fungi in biological control of ticks. *Experimental Parasitology*, 130(3), 300-305.
- Ferraro, F., Corvo, I., Bergalli, L., Ilarraz, A., Cabrera, M., Gil, J., ... Álvarez, G. (2020). Novel and selective inactivators of Triosephosphate isomerase with anti-trematode activity. *Scientific Reports*, 10(2587), 1-13.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2003). *Resistencia a los antiparasitario. Estado actual con énfasis en América Latina*. Recuperado de <https://www.fao.org/3/y4813s/y4813s03.htm>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2004). *Guidelines Resistance Management and Integrated Parasite Control in Ruminants*. Recuperado de <https://www.fao.org/publications/card/es/c/AG014E/>
- Fort, R.S., Trinidad Barnech, J.M., Dourron, J., Colazzo, M., Aguirre-Crespo, F.J., Duhagon, M.A, y Álvarez, G. (2018). Isolation and Structural

Characterization of Bioactive Molecules on Prostate Cancer from Mayan Traditional Medicinal Plants. *Pharmaceuticals*, 11(3), 1-16.

- Jonsson, N.N., y Hope, M. (2007). Progress in the epidemiology and diagnosis of amitraz resistance in the cattle tick *Boophilus microplus*. *Veterinary Parasitology*, 146 (3-4), 193–198.
- Metzler, M., Pfeiffer, E., Schulz, S. I., y Dempe, J. S. (2013). Curcumin uptake and metabolism. *Biofactors*, 39(1), 14-20.
- Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. (2017). *Plan de sensibilización y extensión en control de garrapata y Tristeza Parasitaria. ¿Por qué es importante controlar la garrapata?* Recuperado de <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/comunicacion/publicaciones/es-importante-controlar-garrapata>
- Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. (2021). *Listado de garrapaticidas*. Recuperado de <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/datos-y-estadisticas/datos/listado-garrapaticidas-0>
- Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. (2022). *Capacitación sobre técnicas de identificación y multiplicación de hongos patógenos, en el norte del país*. Recuperado de <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/comunicacion/noticias/capacitacion-sobre-tecnicas-identificacion-multiplicacion-hongos-patogenos>
- Muzio, F. (2006). Programa de la lucha contra la garrapata. En *Aportes a la lucha contra la garrapata*. Montevideo: FAO- TCP- DGSG- MGAP.
- Nari, A. (2005). *Estado actual de la resistencia de Boophilus microplus en América latina y el Caribe. Perspectivas de aplicación del Control integrado*. Recuperado de <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/comunicacion/publicaciones/resistencia-boophilus-microplus-america-latina-caribe-perspectivas>
- Nari, A. (1990). Methods currently used for the control of one-host ticks: their validity and proposals for future control strategies. *Parasitol.* 32, 133-143.
- Nari, A., Cardozo, H., Berdié, J., Canabez, F., y Bawden, R. (1979). Estudio preliminar sobre la ecología de *Boophilus microplus* en Uruguay. Ciclo no parasitario en un área considerada poco apta para su desarrollo. En Centro Médico Veterinario de Paysandú (Eds.), *III Jornadas Latinoamericanas y VI Uruguayas de Buiatría* (pp. 103-114). Paysandú: CMVP.

- Nuñez, J., Muñoz, M., y Moltedo, H. (1982). *Boophilus microplus. La garrapata común del ganado vacuno*. Buenos Aires: Hemisferio Sur.
- Olhagaray, E. (2018). *Actualización en el uso del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* para el control de *Rhipicephalus microplus** (Tesis de grado). Facultad de Veterinaria, UDELAR, Montevideo.
- Petraccia, C., Cardozo, H., Nari, A., y Solari, M.A., (1983). Estudios de resistencia a garrapaticidas organofosforados (OF) en *Boophilus microplus*. *Veterinaria (Montevideo)*, 19(83), 5-9.
- Reck, J., Klafke, M.G., Webster, A., Dall'Agnol, B., Scheffer, R., Araújo Souza, U., ...De Souza Martins, J. (2014). First report of fluazuron resistance in *Rhipicephalus microplus*: A field tick population resistant to six classes of acaricides. *Veterinary Parasitology*, 201, 128–136.
- Riek, R.F. (1964). The life cycle of *Babesia bigemina* (Smith and Kilborne, 1893) in the tick vector *Boophilus microplus* (Canestrini). *Australian Journal of Agricultural Research*, 15(5), 802-821.
- Roush, R.T. (1993). Occurrence, Genetics and Management of Insecticide Resistance. *Parasitology Today*, 9(5),174-179.
- Samish, M., y Rehacek, J. (1999). Pathogens and predators of ticks and their potential in biological control. *Annual Review of Entomology*, 44, 160-161.
- Sanchis, J., Cuore, U., Gayo, V., Silvestre, D., Invernizzi, F., Trelles, A., y Solari, M.A. (2008). Estudios sobre la ecología del *Boophilus microplus* en tres áreas del Uruguay. En Centro Médico Veterinario Paysandú (Eds.), *Jornadas de Buiatria*, (Vol. XXXVI, pp. 247-248). Paysandú: CMVP.
- Saporiti, T. (2019). *Uso del test de inmersión de adultos modificado para fluazurón y del test de paquete de larvas para diagnosticar la resistencia de 14 poblaciones de campo de *Rhipicephalus microplus* a los 6 grupos químicos habilitados en Uruguay* (Tesis de maestría). Facultad de Veterinaria, UDELAR, Montevideo.
- Saramago, L., Gomes, H., Aguilera, E., Cerecetto, H., González, M., Cabrera, M., ... Álvarez, G. (2018). Novel and Selective *Rhipicephalus microplus* Triosephosphate Isomerase Inhibitors with Acaricidal Activity. *Veterinary Sciences*, 5(3), 1-19.
- Scoralik, M.G., Daemon, E., y de Oliveira Monteiro, C.M. (2012). Enhancing the acaricide effect of thymol on larvae of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) by solubilization in ethanol. *Parasitology Research*, 110, 645–648.
- Solari, M.A., Cuore, U., Trelles, A., Sanchis, J., y Gayo, V. (2007). Aplicación del control integrado de parásitos (CIP) en un establecimiento comercial. En

Seminario Regional. Aplicación del control integrado de parásitos (CIP) a la garrapata *Boophilus microplus* en Uruguay. Recuperado de [https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/sites/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/files/documentos/publicaciones/control\\_integ\\_parasitos.pdf](https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/sites/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/files/documentos/publicaciones/control_integ_parasitos.pdf)

Stone, B. F. (1972). The genetics resistance by ticks to acaricide. *Australian Veterinary Journal*, 48, 345-350.

Sutherst, R. W., y Commins, H. N. (1979). The management of acaricide resistance in the cattle tick, *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acari: Ixodidae), in Australia. *Bulletin of Entomological Research*, 69, 519-537.

Uruguay. (2008, abril 25). Ley N° 18268: Lucha contra la Garrapata *Boophilus microplus* (garrapata común del bovino). Recuperado de <https://www.impo.com.uy/bases/leyes/18268-2008>

Willadsen, P., Riding, G., Mackenma, R., Kemp, D., Tellam, R., Nielsen, J., ... Gough, J. (1989). Immunological control of a parasitic arthropod: identification of protective antigen from *Boophilus microplus*. *The Journal of Immunology*, 143(4), 1346–1351.