UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

TEST DE INMERSIÓN DE LARVAS COMO HERRAMIENTA DE DIAGNÓSTICO DEL PERFIL DE SENSIBILIDAD ACARICIDA DE LACTONAS MACROCÍCLICAS PARA *RHIPICEPHALUS (BOOPHILUS) MICROPLUS*

por

Jessica CABALLERO

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

2023

PÁGINA DE APROBACIÓN

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:

Dra. Alejandra Capelli

Segundo miembro:

Dr. Diego Robaina

Tercer miembro:

Dra. Soledad Valledor

Cuarto miembro

Dr. Gonzalo Suárez

Fecha: 15 de diciembre 2023

Autores:

Br. Jessica Caballero

AGRADECIMIENTOS

A mis padres en primer lugar, por apoyarme e inspirarme desde siempre a estudiar, cumplir mis sueños y por brindarme las herramientas para hacerlo posible, gracias por estar siempre presentes.
A mis hermanos Fabian y Gusman, por estar siempre presentes.

A Danny, mi compañero incondicional y pilar, por estar siempre en todas desde el principio.

A Daniel y Susana por haber sido mi familia en Montevideo y ¨adoptarme¨.

A mis facu-amigos, Romi, Guille y David, por hacer la carrera aún más linda.

A mi tutor, Diego Robaina y mi co-tutor Gonzalo Suárez, por guiarme, trabajar en conjunto, corregirme y formarme a lo largo de este camino.

A la Unidad de Farmacología y Terapéutica, por permitirme desarrollar el proyecto y formarme.

A la Universidad de la República y en especial a mi casa de estudios, la Facultad de Veterinaria, por brindarme la formación académica.

Al Departamento de Parasitología, DILAVE “Miguel C. Rubino” por brindarnos el reactivo biológico utilizado.

Al programa CIDEC por el apoyo en el proyecto.

TABLA DE CONTENIDO

PÁGINA DE APROBACIÓN **1**
AGRADECIMIENTOS **2**
RESUMEN **5**
SUMMARY **6**
INTRODUCCIÓN **7**
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA **8**
Problemática de la garrapata a nivel global 8
Garrapata en la región 8
Garrapata en Uruguay 9
Historia y legislación nacional 10
Ciclo de vida la garrapata 12
Modelo epidemiológico de la Garrapata en Uruguay 14
Herramientas existentes para el control 15
Tratamiento generacional de la garrapata en Uruguay 16
Lactonas Macrocíclicas 18
Mecanismo de acción 19
Ivermectina 19
Doramectina 20
Moxidectina 20
Métodos de determinación de eficacia de drogas acaricidas 21
HIPÓTESIS **24**
OBJETIVO GENERAL **24**
OBJETIVOS ESPECÍFICOS **24**
MATERIALES Y MÉTODOS **25**
Reactivo Biológico 25
Técnica de inmersión (Test de inmersión en Jeringa) 26
Lectura de resultado 28
Interpretación de los resultados 28
Análisis estadístico 29
RESULTADOS **30**
DISCUSIÓN **32**
CONCLUSIÓN **35**
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS **37**

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Lista de Figuras

Figura 1- Distribución geográfica de la garrapata Rhipicephalus (B.) microplus a nivel mundial, donde se observa la localización tropical y subtropical de la misma. (García, Rodrigues, Koller y Andreotti, 2019). 8

Figura 2- Mapa esquemático de la distribución de R. microplus en Uruguay a través del tiempo, donde las áreas verdes representan las zonas libres de garrapata, las áreas rojas las zonas con infestación constante, y las áreas amarillas, zonas con períodos esporádicos de erradicación.(Miraballes Ferrer, 2018) 10

Figura 3- Distribución de R. microplus en Uruguay (Errico et al., 2009) 11

Figura 5- Modelo epidemiológico de la garrapata según Nari y Solari 1990 14

Figura 6- Modelo de tratamiento generacional de la garrapata en bovinos según Cuore et al., 2009 17

Figura 7- Esquema de división de Lactonas Macrocíclicas (Rodríguez-Vivas et al., 2010) 18

Figura 8- Mecanismo de acción de las Lactonas Macrocíclicas Errecalde et al (2013). 19

Figura 10- Representación del modelo 20

químico de la Doramectina 20

Figura 11- Representación del modelo 20

químico de la Moxidectina 20

Figura 12- garrapatas teleoginas ovipositando 25

Figura 13- Proceso de oviposición (foto personal) 26

Figura 14- Jeringas Cargadas con larvas, previo a la inmersión 26

Figura 15- Cargado de jeringas mediante bomba de vacío 27

Figura 16 y 17- Inmersión y secado 28

Figura 18 y 19- Incubación de las jeringas por 24 horas y posterior recuento de larvas vivas y muertas de R. microplus. 28

Figura 20- Ajuste del modelo dosis-respuesta para la mortalidad de larvas de la cepa Mozo Rhipicephalus microplus frente a Ivermectina (IVM), Doramectina (DRM) y Moxidectina (MOX) mediante la prueba de inmersión con jeringa. 30

Lista de Tablas

Tabla 1- Parámetros farmacodinámicos para el modelo dosis-respuesta en larvas de la cepa Mozo Rhipicephalus microplus contra ivermectina (IVM), doramectina (DRM) y moxidectina (MOX) mediante la prueba de inmersión con jeringa. 31

Tabla 2- Relación de parámetros farmacodinámicos (límite inferior, pendiente y dosis efectiva 50 [ED50]) entre modelos de dosis-respuesta en larvas de R. microplus de Cepa Mozo frente a ivermectina (IVM), doramectina (DRM) y moxidectina (MOX) mediante la prueba de inmersión en jeringa. 32

RESUMEN

En Uruguay, las principales parasitosis de los bovinos están vinculadas a los ectoparásitos y los vectores que estos transmiten, donde *Rhipicephalus microplus (R. microplus)* está identificada como el principal agente parasitario. Actualmente, existe una creciente preocupación por la situación vinculada a los niveles de sensibilidad/resistencia a las Lactonas Macrocíclicas disponibles en el mercado para el control de garrapata en el ganado bovino. El objetivo principal de la presente tesis fue poner a punto una técnica de diagnóstico *in vitro*, para caracterizar del perfil de sensibilidad acaricida de *R. microplus* frente a diferentes Lactonas Macrocíclicas. Se utilizó la técnica de inmersión en jeringas y se ajustó un modelo farmacodinámico para Ivermectina (IVM), Doramectina (DRM) y Moxidectina (MOX). Se destaca el hallazgo de que la relación de potencia (dosis efectiva 50% [ED_{50}]) entre los fármacos incluidos en este estudio mostró una diferencia significativa entre IVM y DRM en comparación con MOX, donde los valores obtenidos para ED_{50} fueron 0,5, 0,58 y 0,23 ppm, respectivamente, indicando que MOX tiene mayor potencia. Se concluye que los resultados alcanzados ajustan adecuadamente el modelo farmacodinámico y permiten de esta forma la puesta a punto de la técnica de inmersión en jeringas como una herramienta útil y sencilla de diagnóstico del perfil de sensibilidad en larvas de *R. microplus* para IVM, DRM y MOX.

SUMMARY

In Uruguay, the main parasitosis in cattle are linked to ectoparasites and the vectors they transmit, where *Rhipicephalus microplus* (*R. microplus*) is identified as the main parasitic agent. Currently, there is a growing concern about the situation related to the levels of sensitivity/resistance to Macrocyclic Lactones available in the market for tick control in cattle. The main objective of the present thesis was to adjust an *in vitro* diagnostic technique to characterize the acaricide sensitivity profile of *R. microplus* against different Macrocyclic Lactones. The syringe immersion technique was used and a pharmacodynamic model was adjusted for Ivermectin (IVM), Doramectin (DRM) and Moxidectin (MOX). The potency ratio (effective dose 50% [ED_{50}]) between the drugs included in this study showed a significant difference between IVM and DRM compared to MOX, where the values obtained for ED_{50} were 0.5, 0.58 and 0.23 ppm, respectively, indicating that MOX has higher potency. It is concluded that the results achieved adequately fit the pharmacodynamic model and thus allow the fine-tuning of the syringe immersion technique as a useful and simple diagnostic tool for sensitivity profiling in *R. microplus* larvae for IVM, DRM and MOX.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades parasitarias en bovinos, son patologías de gran importancia debido al efecto directo negativo que producen sobre la sanidad animal. Los parásitos presentan diferentes acciones patógenas sobre los hospedadores, las cuales repercuten negativamente en la producción del animal afectado. Esto amerita llevar a cabo el control de estas enfermedades de manera de evitar tanto los efectos adversos como la evolución a la cronicidad y las pérdidas económicas que suponen a nivel de las explotaciones (Ysamat, 2004).

El principal método de control de *R. microplus* es el control químico (Nava, et al., 2018), el cual se ha vuelto ineficaz en algunas regiones debido a la aparición de garrapatas resistentes a estos productos. La resistencia es uno de los mayores problemas, debido a que la disponibilidad de nuevos antiparasitarios es cada vez más escasa y los crecientes niveles de sensibilidad/resistencia a las diferentes familias de ectoparasiticidas disponibles en el mercado (Rodriguez-Vivas et al., 2010, Rossner, Morel, Mangold, y Nava, 2019).

Las LMs son endectocidas eficientes en el control de endo y ectoparásitos (Rodríguez-Vivas et al., 2010). Se las puede dividir en dos subfamilias: avermectinas y milbemicinas (Figura 7), ambas tienen espectros de actividad similar, pero el género de actinomiceto del cual parten son diferentes, siendo *Streptomyces avermitilis* y *Streptomyces cyaneogriseseus*, respectivamente (Vercruysse y Rew, 2002).

Ambas familias serán de interés en la tesis, de la subfamilia de las avermectinas se profundizará el estudio en Ivermectina (IVM) y Doramectina (DRM), y de las milbemicinas se estudiará Moxidectina (MOX).

Mientras que la farmacocinética (PK) estudia el destino de los fármacos en el animal, los estudios de farmacodinamia (PD) se basan en la acción de los fármacos a partir de su interacción con los receptores y su efecto final. La integración de ambos conceptos explica el efecto de la droga a través del tiempo (Riviere y Papich, 2018).

En la presente tesis, se plantea estudiar mediante bioensayos la sensibilidad garrapaticida para poblaciones de *R. microplus* de IVM, DRM y MOX, aplicando la técnica de inmersión en jeringa. Lo que nos permitirá construir modelos farmacodinámicos (PD) de dosis-respuesta, con la consecuente determinación de los parámetros de mayor relevancia para el estudio comparativos de drogas (Potencia y eficacia). Así como la potencial aplicabilidad de la determinación temprana de variaciones en la sensibilidad en poblaciones de campo.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Problemática de la garrapata a nivel global

La garrapata, es un parásito externo, obligatorio y temporal de los animales vertebrados. El clima húmedo y caliente favorece su desarrollo, mientras que las bajas temperaturas lo inhiben. Las enfermedades parasitarias, entre ellas *Rhipicephalus microplus* son uno de los problemas más importantes de interés veterinario a nivel mundial, ya que es uno de los mayores problemas de salud en los animales, causando problemas y costos a nivel productivo (Betancur y Giraldo-Ríos, 2018).

Betancur y Giraldo-Ríos (2018) describen que las garrapatas afectan el 80% de la población total de bovinos a nivel mundial, principalmente *Rhipicephalus microplus (R. microplus*), la cual presenta una amplia distribución geográfica (Figura 1) debido a su facilidad de adaptación al ambiente y reproducción. Esta parasitosis causa grandes impactos económicos; estiman que las pérdidas anuales mundiales asociadas al control de las mismas rondan los 13,9-18,7 billones de dólares.

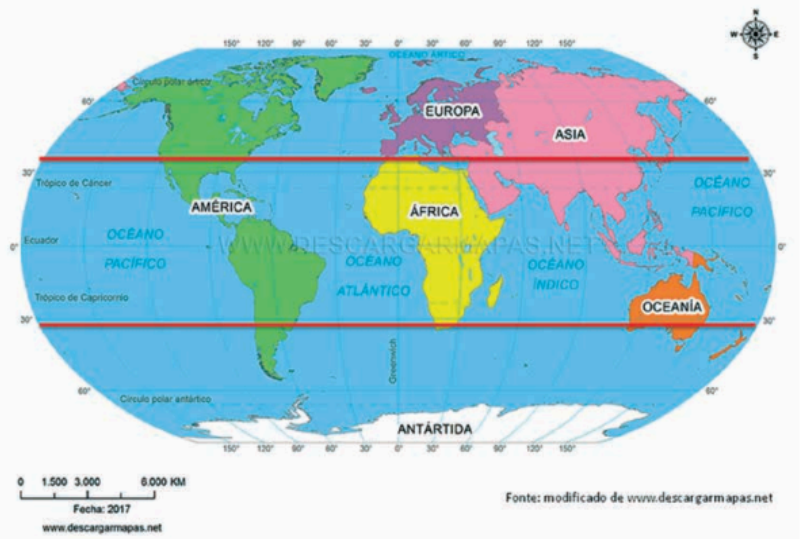


Figura 1- Distribución geográfica de la garrapata Rhipicephalus (B.) microplus a nivel mundial, donde se observa la localización tropical y subtropical de la misma. (García, Rodrigues, Koller y Andreotti, 2019).

Garrapata en la región

R. microplus es la principal garrapata que afecta los bovinos de la región, se encuentra ampliamente distribuida en Latinoamérica debido a las condiciones climáticas presentes la región, que permiten su desarrollo, donde causa pérdidas sanitarias y económicas significativas en la ganadería bovina (Cortés, Betancourt, Argüelles y Pulido, 2010).

En América Latina, *R. microplus* es responsable de pérdidas estimadas en 1 billón de dólares anuales (Food and Agriculture Organization (FAO), 2004). En Argentina se estiman pérdidas anuales de 200 millones de dólares (Spath et al., 1994), para Brasil de $3,24 billones de dólares (Grisi et al., 2014). Uruguay no queda exento de la problemática, y el principal problema ocasionado por esta parasitosis a nivel productivo, no solo ocasiona problemas sanitarios, sino también pérdidas económicas (Miraballes Ferrer, 2018), estimadas en de 32,7 millones de dólares anuales (Ávila, 1998).

El uso frecuente de ixodicidas ha provocado la selección de poblaciones de garrapatas resistentes (Kunz y Kemp, 1994). En el continente sudamericano ya se han detectado casos de resistencia a prácticamente todos los compuestos químicos garrapaticidas disponibles comercialmente (Nava, Morel, Mangold y Guglielmone, ,2018). La resistencia del parásito se está convirtiendo en un problema global (Cuore et al., 2012; Reck et al., 2014; Villar et al., 2020; Vilela, Feitosa, Bezerra, Klafke y Riet-Correa, 2020; Valsoni et al., 2021).

Garrapata en Uruguay

En Uruguay, *R. microplus* está identificada como uno de los principales agentes parasitarios en bovinos debido a las pérdidas económicas que ocasiona (Cuore et al. 2015, Barrios y Bruzzone, 2019; Aráoz, 2019), lo cual representa, una grave problemática sanitaria y productiva, que preocupa tanto a productores y técnicos así como a la industria y autoridades.

La garrapata *R. microplus*, junto con la tristeza parasitaria , nombre que se le otorga al cuadro clínico caracterizado por un estado febril del ganado bovino causado por los protozoarios *Babesia bigemina y Babesia bovis y* por la rickettsia *Anaplasma marginale,* (Benavides, Romero y Villamil, 2016) transmitidos por *R. microplus,* causaron pérdidas económicas anuales estimadas en 32.7 millones de dólares.

El 44.6% de estas pérdidas se debieron a costos directos por tratamientos que, muchas veces, no son realizados en los momentos adecuados o que, debido a la problemática de resistencia de *R. microplus* a los acaricidas, no son totalmente efectivos (Ávila, 1998, Miraballes Ferrer, 2018). Pueden haber pérdidas directas (relacionadas al daño por la pérdida de sangre) y pérdidas indirectas relacionadas a agentes infecciosos transmitidos por la garrapata y los costos asociados al tratamiento y control (Betancur y Giraldo-Rios, 2018).

Esta parasitosis, como fue mencionado anteriormente, causa grandes daños a nivel productivo-económico, ocasiona además daños sobre el animal, mediante la transmisión de agentes patógenos tales como *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* y *Anaplasma marginale*, los cuales a su vez producen baja en la condición física, mortalidades y altos costos para su control (Rodríguez-Vivas, Quiñones y Fragoso, 2005).

Las lesiones de piel, como consecuencia pueden tener la aparición de miasis, y a nivel industrial, disminuir el valor de los subproductos tales como el cuero, además el estrés ocasionado por las lesiones, lleva a una pérdida de peso, lo

cual repercute además una reducción en la producción de leche y descarte de la misma debido a la presencia de residuos químicos de los productos utilizados para combatirla (García et al., 2019), bajo desempeño reproductivo, pérdida de producción de carne. La muerte en animales adultos no es habitual, pero hay impacto visible sobre el bienestar de los animales, causado por el dolor (Molento, 2020).

Otro factor a destacar causante de pérdidas, son los gastos en productos químicos veterinarios adecuados para el control o erradicación de *R. microplus* y tratamiento de las enfermedades transmitidas, mano de obra, e instrumental acorde (Molento, 2020).

Historia y legislación nacional

En 1910, se promulgó en Uruguay la ley 3306 (Ley de Policía Sanitaria Nacional), con la iniciativa de control y erradicación de *R. microplus*. La legislación ha cambiado a través de los años, actualmente la campaña sanitaria para el control de esta parasitosis se encuentra contemplada en la ley 18.268, promulgada en 2008, donde se declara de interés nacional la lucha contra la garrapata *R. microplus* en todo el territorio nacional y las enfermedades infecciosas transmitidas por la misma. En la figura 2 se presenta un esquema de la distribución de la garrapata a través de 100 años de historia en el Uruguay.

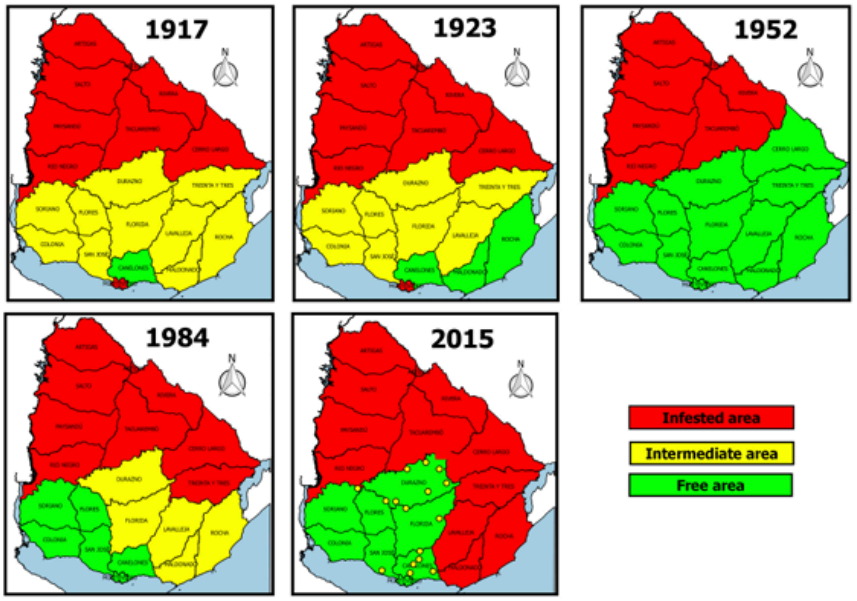


Figura 2- Mapa esquemático de la distribución de R. microplus en Uruguay a través del tiempo, donde las áreas verdes representan las zonas libres de garrapata, las áreas rojas las zonas con infestación constante, y las áreas amarillas, zonas con períodos esporádicos de erradicación.(Miraballes Ferrer, 2018)

Actualmente, la ley establece de denuncia obligatoria la presencia de *R. microplus* por parte de propietarios o tenedores de animales, veterinarios de libre ejercicio y funcionarios idóneos del Ministerio de Ganadería Agricultura y

Pesca (MGAP), a su vez establece que la Dirección General de Servicios Ganaderos será la autoridad sanitaria competente para la dirección, operación, administración, control y fiscalización de esta lucha.

Para lograr el objetivo de erradicación, la autoridad sanitaria instrumentará la división del territorio nacional de acuerdo al avance de la lucha contra el ectoparásito en zonas o áreas: libres, de control o en erradicación, tomando en cuenta los factores epidemiológicos, productivos, ecológicos, culturales, socioeconómicos y geográficos (Figura 3).

Podemos definir:
Zona o Área Libre: aquella en la que no está presente la garrapata *R. microplus*, ya sea por intervención de la autoridad sanitaria y/o por condiciones ambientales en las que no prospera el ectoparásito.
Zona o Área de Control puede ser definida como aquella en la que se encuentra presente el ectoparásito y la autoridad sanitaria establece medidas para disminuir la prevalencia y las enfermedades transmitidas por el mismo.
Zona o Área de erradicación es aquella en la cual la autoridad sanitaria establece medidas para lograr el estatus de Zona o Área Libre.

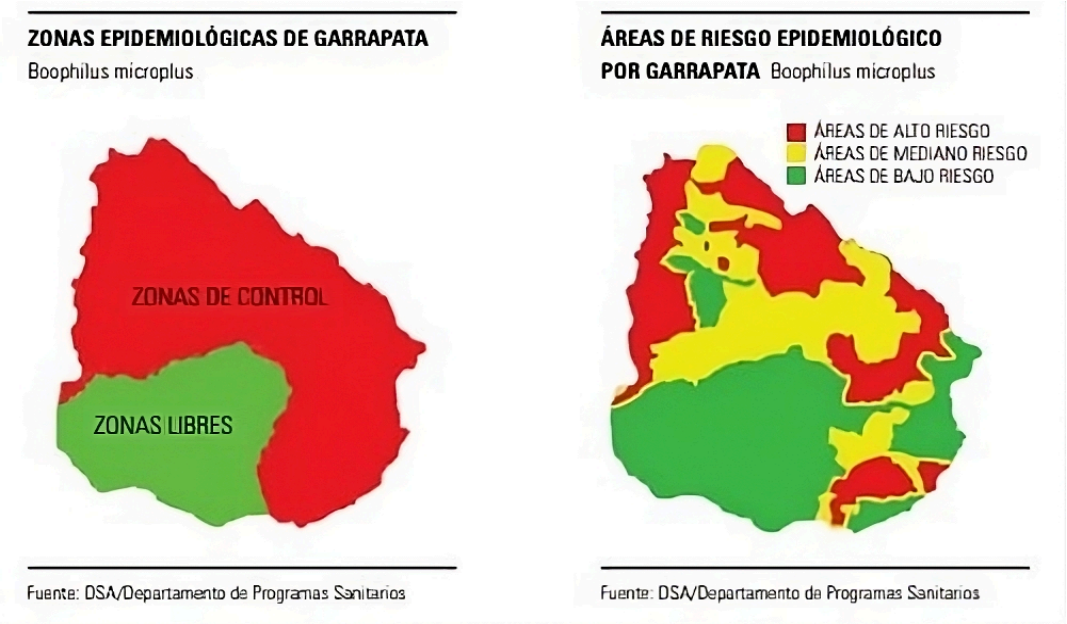


Figura 3- Distribución de R. microplus en Uruguay (Errico et al., 2009)

Para la protección de las zonas libres, de control o en erradicación, la autoridad sanitaria determinará los procedimientos, requisitos y condiciones para el control sanitario de ganado en tránsito desde las zonas de control o en erradicación, incluyendo certificaciones de despacho de tropa o de extracción de predio interdicto según corresponda, y controles fijos en los puestos sanitarios de paso entre zonas y departamentos u otras medidas que minimicen el riesgo de difusión de la garrapata común del ganado bovino. Los despachos de tropa son requeridos cuando movemos ganado de una zona de control hacia una zona libre o en erradicación, bovinos provenientes de zonas de control con destino a campo en zona de control, bovinos de zona en

erradicación a cualquier otra zona, bovinos que habitan en campos forestales, o siempre que la autoridad sanitaria lo determine (Miraballes Ferrer, 2018).

Para poder lograr los objetivos de una campaña sanitaria como la que está establecida en Uruguay, es importante la actuación en conjunto de todos los actores involucrados, pensando en un bien común. El MGAP es el encargado de brindar un marco jurídico, con lineamientos técnicos en base a conocimientos epidemiológicos del país. Por otra parte, la industria farmacéutica debe poner a disposición de la campaña productos de alta eficacia, seguros para el animal,la salud pública y el ambiente. Los veterinarios de ejercicio liberal, son un nexo entre el productor y el MGAP, encargándose de brindar sus conocimientos. Por último, pero no menos importante, está el productor, quien debe asumir la responsabilidad de un control eficiente de *R. microplus*, motivandose por una mayor producción, menor costo en tratamientos a futuro, pensando conjuntamente en una responsabilidad sanitaria para con el país (Cuore,2006)

Ciclo de vida la garrapata

R. microplus, es un parásito hematofago, que necesita un único hospedero para completar su ciclo (García et al., 2019). El ciclo del mismo consta de 2 fases, una *fase parasitaria* (sobre el animal), con una duración promedio de 21 días (moda de 23 días), con un tiempo mínimo de 20,5 dias y un tiempo máximo de 41 días; y una *fase extra parasitaria* (en el ambiente, de vida libre), donde los estudios de ecología llevados a cabo en el país determinaron que la misma dura como máximo entre 8 y 10 meses (Fiel y Nari, 2013) (Figura 4).

La *fase parasitaria* sucede entre que sube la larva (que se encuentra en el medio) y cae una garrapata ingurgitada (teleogina) la cual va a poner huevos en la pastura y luego muere. Dentro de esta fase puede definirse una etapa larval (neo larva, larva y meta larva), una etapa de ninfa (ninfa y meta ninfa) y una etapa adulta (neandro, gonandro, neogina, partenógina, teleogina) (Cuore et al., 2013). El ciclo de vida libre (*fase extra parasitaria*) comienza cuando la Teleogina (hembra ingurgitada) se desprende del hospedador y cae al suelo.

El periodo comprendido entre el desprendimiento y el comienzo de la oviposición se denomina Protoquia. El período comprendido entre el inicio y finalización de la ovipostura se le denomina Ootoquia. Metatoquia, es el período de tiempo que transcurre entre el cese de la oviposición y la muerte de la Xenogina, es decir de la hembra ovígera que ya cumplió su función (Fiel y Nari, 2013).

Los huevos son depositados en el ambiente y presentan forma elíptica, son de color marrón oscuro y de superficie brillante, pegajosa, cubierta por una sustancia de aspecto albuminoide. El periodo de incubación presenta valores mínimos de 15 días y máximos de 51 días (Nuñez y et al, 1987).

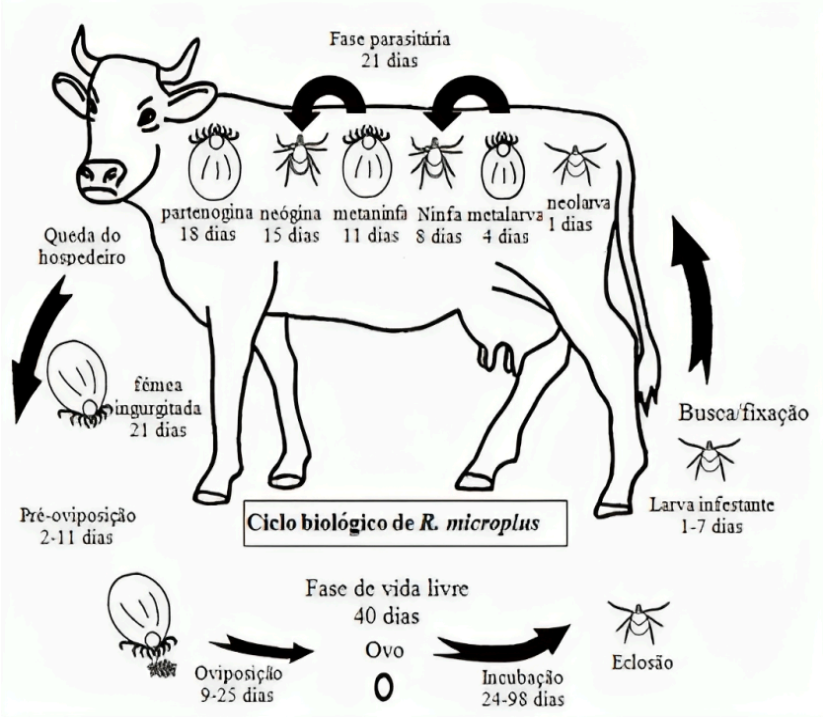


Figura 4- Esquematización del ciclo biológico de Rhipicephalus microplus según Sonenshine et al. (2002)

Una vez eclosionados los huevos emerge la larva de *R. microplus*, dando inicio a la etapa larval del ciclo parasitario, las cuales mediante quimiorreceptores (Alonso y Fernandez, 2022), detectan la presencia de animales, suben por las pasturas y esperan el encuentro con el hospedero para comenzar la *fase parasitaria* (Velázquez y Otegui, 2016). Metalarva es la primera etapa de muda y comienza a aparecer entre los 3 y 4 días del ciclo; se observan con mayor facilidad ya que miden 1mm y son de color blanquecino.

Una vez transcurrida la primera muda estamos frente a la etapa Ninfal del ciclo parasitario (dia 9 del ciclo), compuesto por ninfa y metaninfa , donde los individuos presentan cuatro pares de patas y tres hileras de dientes a cada lado del hipostoma. y además adquieren un aspecto globuloso conferido por la doble envoltura de quitina (Fiel y Nari, 2013).

La etapa de Adulto comienza a los 13 a 14 días del ciclo, la garrapata presenta cuatro pares de patas y a diferencia de las ninfas cuatro pares de dientes a cada lado de la línea media del hipostoma. En esta etapa comienza la diferenciación sexual. Los machos (Gonandro) se observan a los 13,5 días del ciclo y pueden vivir por más de 40 días, son pequeños, muy móviles. A diferencia de las hembras, estos se prenden y desprenden varias veces para alimentarse y son capaces de desplazarse en el animal en busca de hembras para fecundar (Fiel y Nari, 2013).

Teleógina, se le denomina a la hembra ya fecundada, ingurgitada y que cae al medio ambiente; su forma es ovoide. Generalmente ovipositan una masa de huevos que corresponde a la mitad de su peso, con un peso equivalente de 0,1

gramos de huevos el cual se corresponde a unas 2000 larvas. Esto manifiesta el poder biótico del parásito (Fiel y Nari, 2013).

Modelo epidemiológico de la Garrapata en Uruguay

Bajo nuestras condiciones climáticas se estima que la garrapata presenta en promedio tres generaciones al año, donde el ciclo parasitario se ve interrumpido en los meses de invierno. Conocer el modelo epidemiológico (Figura 5), permitió diseñar una estrategia de tratamiento generacional fundamental para el control y erradicación en el país (Nari y Solari 1990; Fiel y Nari, 2013; Solari, 2006).

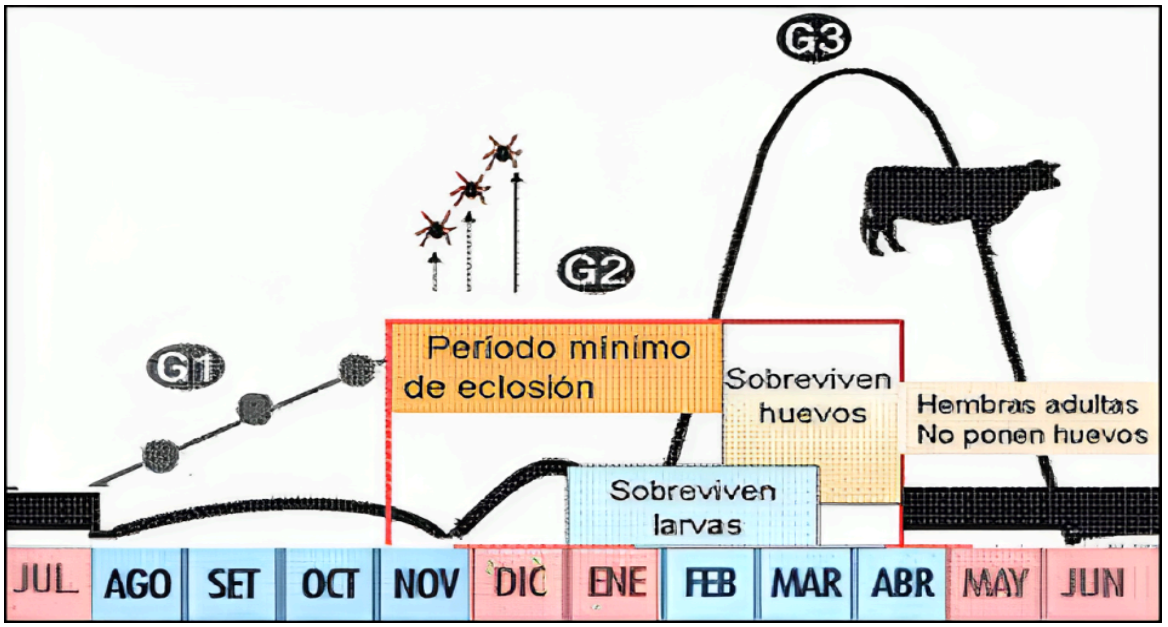


Figura 5- Modelo epidemiológico de la garrapata según Nari y Solari 1990

Podemos definir "*generación parasitaria*" como el periodo transcurrido desde que una larva (localizada en el ambiente, cumpliendo su fase extra parasitaria) se encuentra con el hospedador definitivo vacuno, se sube y comienza a alimentarse, completa las evoluciones hacia la forma adulta,cae al suelo como adulto lleno de huevos, completa la oviposición en el ambiente, se desarrollan las larvas, y vuelven a parasitar a un hospedador vacuno.

La primera generación comprende los meses de agosto- noviembre, la segunda generación desde diciembre-febrero, y la tercera generación, de marzo-mayo, teniendo su máximo punto en los meses de otoño. Según el modelo epidemiológico de publicado por Nari y Solari ,1990, las poblaciones de garrapata en Uruguay aumentan paulatinamente desde finales del invierno, teniendo su punto más alto de desarrollo en los meses de febrero y marzo, obteniendo de esta forma, la mayor carga parasitaria sobre los animales en los meses de otoño.

El mes de agosto es importante para la instauración de tratamientos, ya que es donde, por las condiciones climáticas de Uruguay, suele reiniciarse el ciclo

generacional (primera generación). La instauración de tratamientos adecuados en la primera generación es importante, con la finalidad de disminuir la carga parasitaria, evitando así que estas larvas de primera generación lleguen a adultas disminuyendo la contaminación en la pastura para las siguientes generaciones de garrapatas (Miraballes, Riet-Correa Fuellis, Araoz, 2018)

Herramientas existentes para el control

Con el fin de controlar y/o erradicar la garrapata se han llevado a cabo diferentes estudios donde se busca encontrar métodos eficientes para su eliminación. Actualmente, las herramientas de control las podemos dividir en tres grupos, donde las estrategias adoptadas son diferentes en cada uno. Estos son, control físico, control biológico y control químico.

Control Físico

Consiste en la eliminación manual, la misma es aplicable únicamente en pequeñas producciones, con pocos animales parasitados. También pueden utilizarse razas bovinas resistentes a garrapata, rotar las pasturas y potreros para interrumpir el ciclo del parásito, y quema de pastizales para exponer los diferentes estadíos de la garrapata a temperaturas altas (Betancur y Giraldo-Rios, 2018).

Control biológico

Se realiza mediante el uso de animales que se alimenten de las formas evolutivas de garrapatas presentes en la vegetación, como son las aves (Betancur y Giraldo-Rios, 2018); también se plantea el uso de parásitos (Brum, 1988) e incluso hongos, los cuales parasitan a la garrapata (Da Costa et al., 2002). Existe incluso la posibilidad de aplicar productos naturales elaborados en base a extractos de plantas (Guerra, 1985). Estos destacan por considerar los efectos medioambientales dentro de los planes de control parasitario (Panella et al., 2005; Dietrich et al., 2006). El control biológico es el resultado de la búsqueda de métodos de control alternativos a los métodos químicos, menos contaminantes, económicos y con menor incidencia de cepas resistentes (Rosado-Aguilar et al., 2010)

Control químico

El control químico de la garrapata es el más utilizado y aplicado a nivel productivo.(Rodriguez-Rivas, 2010). El uso de productos químicos, como los piretroides, organofosforados, carbamatos, amidinas, lactonas macrocíclicas y sus combinaciones son hoy en día el principal método de control de la garrapata a nivel mundial. Dichos principios activos tienen diferentes formas de presentación comercial, pudiendo ser caravanas, spray, pour-on e inyectables, para el tratamiento poblacional con el objetivo de erradicar o controlar la garrapata (Molento, 2020). De todas las estrategias de control, los tratamientos químicos son casi el único recurso disponible con el que cuentan los productores para el control de este parásito a nivel de campo (Fiel y Nari, 2013).

Sin embargo, este método presenta varias desventajas, como son el alto costo de los productos en el mercado, los costos asociados a la aplicación y el almacenamiento, y los daños ambientales causados por los desechos, los cuales interfieren de forma indirecta sobre la vida silvestre, actuando sobre organismos cruciales para el equilibrio ecológico (Camargo y Mathias 2018). Estos problemas repercuten sobre el medio ambiente y también sobre la industria alimenticia, si no se respetan los tiempos de espera adecuados (Pruett, 1999; Freitas et al., 2005; Oliveira et al., 2006, Oliveira et al., 2009).

Tradicionalmente el control químico de *R. microplus* se ha basado en la aplicación de acaricidas mediante baños de inmersión o aspersión, o la aplicación pour-on y administración parenteral (sub-cutánea) (Cruz, , García, Silva y Domínguez, 2021). Las preparaciones inadecuadas, aplicación incorrecta y uso persistente contribuyen a la emergencia de resistencia (Obaid et al., 2022). Como consecuencia se ha generado un uso excesivo de los mismos, incrementando la dosis y acortando los intervalos entre tratamientos (Bentancur y Giraldo-Ríos, 2018). El uso indiscriminado e irracional de ixodicidas ha provocado la emergencia y selección de poblaciones de garrapatas resistentes a uno o más de ellos (Valdespino et al., 2009; Rodríguez-Vivas et al., 2005). En Uruguay la problemática de la resistencia de *R.microplus* a los acaricidas habilitados ha ido incrementando con los años, agravándose con la aparición de poblaciones multirresistentes a partir del año 2009 (Saporiti,et al.,2021).

Entendemos como resistencia a la capacidad 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 (Cuore et al., 2006; Reck et al., 2014). También la FDA (2023) define resistencia como la “capacidad genética de los parásitos para sobrevivir al tratamiento con un medicamento antiparasitario que en el pasado por lo general era eficaz”.

Las garrapatas son capaces de desarrollar diferentes mecanismos y estrategias de resistencia, disminuyendo el nivel de penetración química al organismo, modificando el metabolismo y alterando procesos de almacenamiento y excreción y sitios de acción tóxica (Alonso y Fernandez, 2022). Mediante estos mecanismos se tornan menos sensibles a los diferentes principios activos a los cuales se las expone. Se sabe que la resistencia es un fenómeno heredable, por lo tanto, una vez desarrollado el proceso será irreversible, y el uso del químico ya no será eficiente (Crampton et al., 1999).

Tratamiento generacional de la garrapata en Uruguay

En Uruguay, como se mencionó anteriormente, la garrapata se encuentra bajo campaña sanitaria nacional, y se ha desarrollado un *plan de tratamiento generacional*, con el fin de control/erradicación de la garrapata.

El tratamiento generacional de la garrapata se basa en la rotación de principios activos en cada generación epidemiológica (Nari y Solari,1990). De esa forma se intenta minimizar la cantidad de garrapatas que puedan sobrevivir a un principio activo porque tienen algún grado de resistencia, ya que en la

generación siguiente la vamos a combatir con otro principio activo, disminuyendo así la presión de selección frente a un mismo principio activo (Cuore et al, 2009, 2012 y 2015) (Figura 6).

Cuore et al, (2012 y 2015) menciona puntos a tener en cuenta para lograr un tratamiento exitoso, entre ellos:

- Diagnóstico de resistencia previo a iniciar los tratamientos. En Uruguay, el organismo responsable de comprobar la eficacia antiparasitaria de un producto veterinario es el Laboratorio de Parasitología (Departamento de Parasitología, DILAVE "Miguel C. Rubino").
- Diagnóstico de hemoparásitos, para determinar el riesgo epidemiológico.

Posteriormente, se debe decidir si el tratamiento se realizará con fines de erradicar (en zonas libres, es obligación), o con el fin de controlar la población parasitaria. La diferencia se basa en la frecuencia de aplicación de los acaricidas, seleccionandolos en base a su poder residual.Una vez definido el plan de trabajo, se procede a tratar a todos los animales, utilizando un principio activo diferente en cada generación.

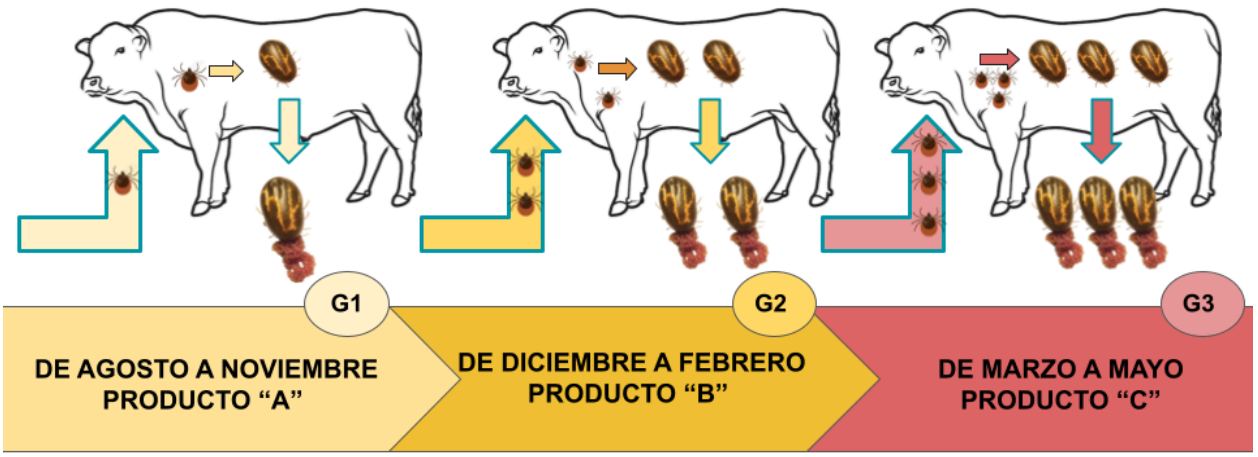


Figura 6- Modelo de tratamiento generacional de la garrapata en bovinos según Cuore et al., 2009

Lactonas Macrocíclicas

Las Lactonas Macrocíclicas (LMs) son una familia química, resultantes de la fermentación de actinomicetos del suelo del género *Streptomyces*, descubiertas en el año 1976, y la primera en registrarse y comercializarse fue Ivermectina (Rodríguez-Vivas et al., 2010). En la Figura 7 se presenta la clasificación de las subfamilias avermectinas y milbemicinas.

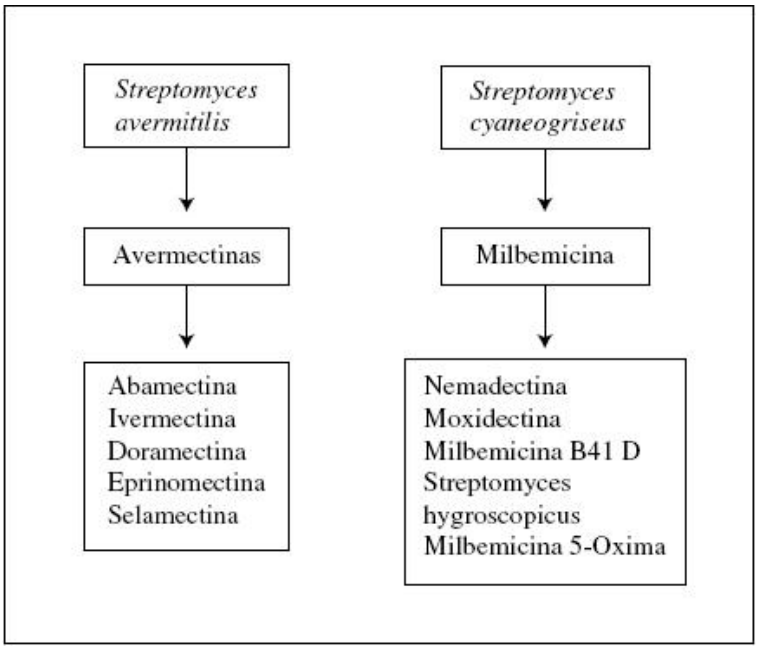


Figura 7- Esquema de división de Lactonas Macrocíclicas (Rodríguez-Vivas et al., 2010)

Además de ser endectocidas, otra potencial ventaja de las mismas es la eficacia a bajas dosis debido a su alta potencia, y su elevada liposolubilidad, lo cual brinda la posibilidad de absorción y distribución en tejidos por diferentes vías de administración (Rodríguez-Vivas et al., 2010; Vercruysse y Rew, 2002). La importante distribución de este tipo de moléculas les permite llegar a lugares no fácilmente accesibles para otras moléculas, por ejemplo la piel, aspecto importante para el control de *R. microplus* (Errecalde, Mestorino, Fiel, y Nari, (2013).

Además, se consideran drogas ampliamente seguras debido a que el mecanismo de acción de las LMs ocurre sobre un tipo de canal iónico ausente en los mamíferos; además,las LMs no atraviesan fácilmente la barrera hematoencefálica. (Vercruysse y Rew,2002)

Las relaciones entre la vía de administración, la especie a la cual se la administra, y la fisiología definen los procesos cinéticos y dinámicos del intercambio intercompartimental, volúmenes de distribución, tasas y extensión del metabolismo, tiempos de residencia y tasas de eliminación (Vercruysse y Rew,2002)

Mecanismo de acción

Las LMs producen su efecto antiparasitario por la potenciación de mecanismos inhibidores del sistema nervioso central, al incrementar la permeabilidad de la membrana celular por los iones de cloro (Cl^-) (Figura 8). La apertura de estos canales permite incrementar las concentraciones intraneuronales de cloro y disminuir los potenciales de membrana, que hacen imposible que se llegue al umbral de disparo de la despolarización. Este mecanismo da lugar a una reducción de la motilidad del parásito, parálisis de la musculatura faríngea y somática llevando a que el parásito no pueda mantenerse en su sitio de hábitat ni alimentarse, conduciendo de esta forma a la muerte (Mudd y Parker 1995, Lifschitz et al.,2002, Errecalde et al 2013).

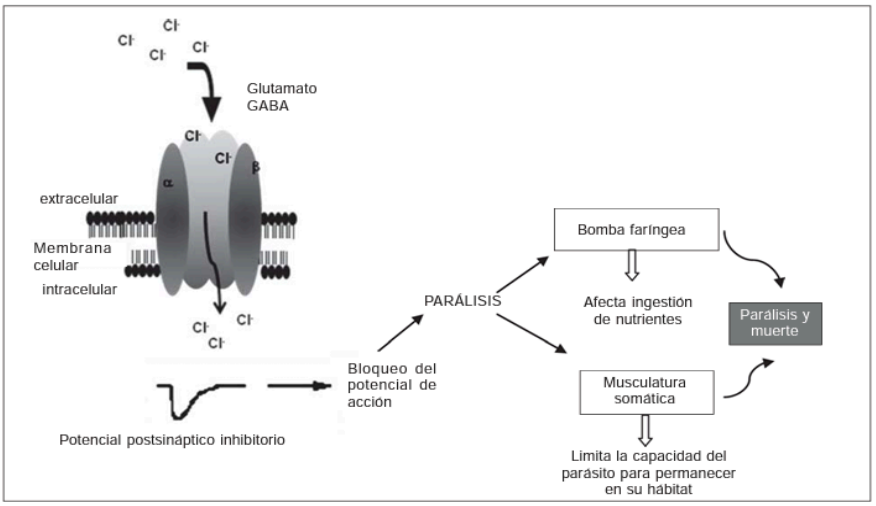


Figura 8- Mecanismo de acción de las Lactonas Macrocíclicas Errecalde et al *(2013).*

<u>Drogas de importancia en la tesis</u>

Ivermectina

Es una LM, perteneciente a la subfamilia de las avermectinas, resultante de la fermentación del actinomiceto *Streptomyces avermitilis,* descubierta en 1976 (Figura 9). Fue la primera LM descubierta y aprobada para uso en animales. (Vercruysse y Rew,2002)

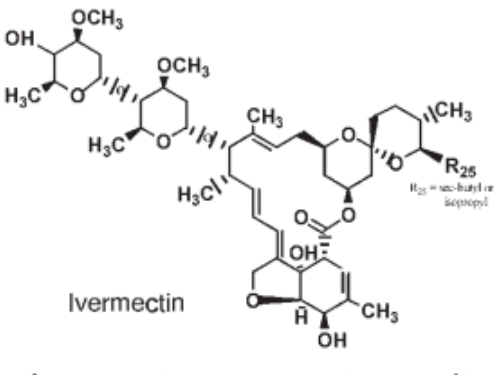


Figura 9- Representación del modelo químico de la Ivermectina

Actualmente es la LM de mayor difusión y utilización en diferentes especies a nivel mundial. Entre las propiedades fisicoquímicas de la IVM de interés se incluyen un alto peso

molecular y una elevada lipofilicidad, que le confieren características farmacocinéticas de un alto volumen de distribución, con una gran afinidad por la grasa corporal y prolongada persistencia (Rodríguez-Vivas et al., 2010).

Existen diferentes presentaciones comerciales como son en solución oral, tópica e inyectables (soluciones o suspensiones) para el ganado bovino. La dosis para IVM 1% por la vía oral e inyectable es de 0,2 mg/kg pv y la dosis para IVM de larga acción al 3,15%, se aplica vía subcutánea a dosis de 0,63 mg/kg pv (Rodríguez-Vivas et al., 2010), en el caso de la vía tópica (pour-on), la dosis es de 0,5 mg/kg pv (Vercruysse, y Rew,2002).

Doramectina

DRM (Figura 10) pertenece a la subfamilia de las avermectinas, cuya estructura química y espectro de acción son similares a la IVM; sin embargo, tiene algunas diferencias que le confieren disponibilidad plasmática por un período mayor (Rodríguez-Vivas et al.,2010). Las presentaciones comerciales que existen para DRM en el ganado bovino son tópicas (0,5 mg/kg pv) e inyectables (0,2 mg/kg pv.) (Rodríguez-Vivas et al., 2010, Vercruysse, y Rew,2002)

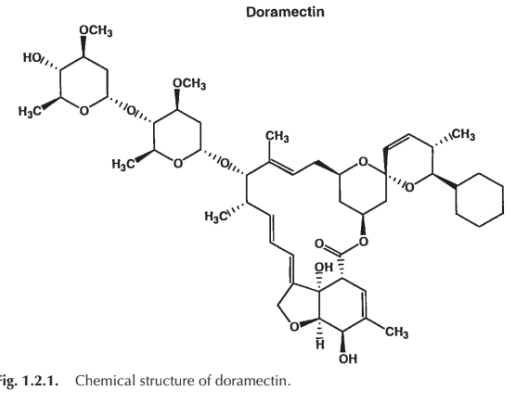


Fig. 1.2.1. Chemical structure of doramectin.

Figura 10- Representación del modelo químico de la Doramectina

Moxidectina

MOX (Figura 11) es una LMs, perteneciente a la subfamilia de las milbemicinas, resultante de la fermentación del actinomiceto *Streptomyces cyaneogriseseus,* descubierta en 1990 (Vercruysse y Rew, 2002). Las presentaciones comerciales disponibles para MOX son en solución oral, inyectable y tópica. La dosis para la vía oral e inyectable es de 0,2 mg/kg pv y la presentación tópica es utilizada a dosis de 0,5 mg/pv (Rodríguez-Vivas et al., 2010, Vercruysse y Rew, 2002).

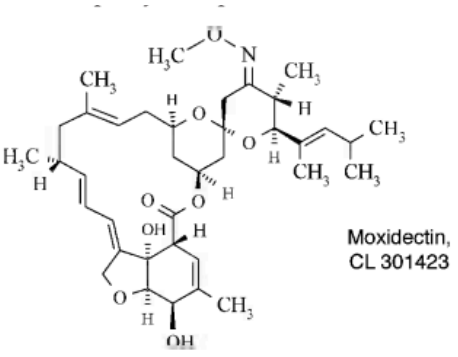


Figura 11- Representación del modelo químico de la Moxidectina

Métodos de determinación de eficacia de drogas acaricidas

Existen diferentes metodologías para determinar la eficacia de diferentes acaricidas, estando divididos como: métodos *in-vivo* o *in-vitro*:

El método *in vivo es* la prueba de establo descrita por Wharton et al. (1970) considerada una metodología definitoria y no de carácter orientativo. En nuestro país se utiliza la cepa de referencia Mozo, la cual presenta sensibilidad a todos los principios activos disponibles. No obstante, como las principales dificultades que presenta se mencionan el hecho que es una técnica muy costosa por las instalaciones requeridas y el mantenimiento de los animales como material biológico. Las ventajas se mencionan por el potencial que tiene la evaluación para brindar información objetiva y comparable de la eficacia parasitaria y residualidad de los distintos ectoparasiticidas.

Como alternativas se presentan las técnicas *in vitro*, las cuales tienen algunas ventajas en términos de rapidez y de orientación para tomar decisiones de tratamiento. Básicamente se basan en bioensayos que se realizan tanto en parásitos adultos (técnica de Drummond, 1973) como en larvas (técnica de Stone y Haydock, 1962); ambas técnicas validadas por la FAO (2003) y capaces de hacer un diagnóstico orientativo del perfil de resistencia desarrollado a campo (Cuore, 2022). El hecho de que existan diferentes pruebas para el diagnóstico de resistencia a los acaricidas en garrapatas es indicativo de que ninguna de estas pruebas es perfecta para todas las circunstancias (FAO, 2004). Dentro de las diferentes técnicas *in vitro* recomendadas por la FAO se encuentran: adult immersion test (AIT, Test de Inmersión de Adultos), larval package test (LPT, Test de Paquete Larvario) y larval immersion test (LIT, Test de Inmersión de Larvas).

AIT es un bioensayo aplicado a garrapatas adultas ingurgitadas, fue descrito por primera vez por Drummond et al. (1973) para determinar la eficacia relativa de nuevos acaricidas contra varias especies de garrapatas. Es recomendada como una prueba de *screening* por ser una técnica rápida. Diferentes autores han planteado protocolos para estandarizar la metodología de AIT para usar a nivel de campo buscando diferenciar líneas sensibles de resistentes, logrando determinar dosis discriminantes para lactonas macrocíclicas (Jonsson, Miller y Robertson, 2007). La principal debilidad del AIT es el bajo número de individuos que son evaluados por nivel de concentración; en contraste, las técnicas a partir de larvas utilizan un número relativamente mayor de individuos por punto analizado, lo que minimiza el error estadístico (Jonsson et al., 2007, Vidal, L, 2019).

La técnica de Paquete Larvario (LPT) es recomendada por la FAO como prueba de diagnóstico de resistencia para *R. microplus*, tomando hasta 6 semanas para visualizar los resultados. Si bien presenta mayor grado de sensibilidad (Jonsson et. al., 2007), la preparación del material puede dar lugar a errores que repercutan en su resultado final. Una de las principales desventajas es el tiempo requerido para poder ver los resultados, haciendo que la técnica, si bien es recomendada por la FAO, no aporte la rapidez necesaria para la toma de decisiones a nivel de campo.

La tercera prueba mencionada por la FAO es el Test de Inmersión de Larvas (LIT), descrita por Shaw et. al (1966) como una herramienta para la determinación del grado de resistencia de *R. microplus* frente a organofosforados. La validez estadística de esta técnica radica en el uso de un mayor número de individuos en comparación con las pruebas realizadas sobre adultos. En trabajos comparativos entre las pruebas que incluyen el uso de larvas (LPT y LIT), Klafke et al. (2006) diseñaron un ensayo para determinar la capacidad de ambas pruebas en la detección de cepas resistentes de *R. microplus* en el estado de Sao Paulo, Brasil; tras el ensayo, concluyen que LIT es capaz de diferenciar poblaciones en relación a su respuesta frente a IVM, además de permitir diferenciar entre cepas resistentes y susceptibles.

Souza et al. (2008) desarrollaron un método basado en el Test de Inmersión de Larvas, descrito por (Shaw, 1966), donde se reemplaza el microtubo por jeringas haciendo la técnica menos laboriosa que la original. El bioensayo descrito por Souza et al. (2008) fue modificado posteriormente para evaluar extractos de plantas con efecto acaricida en Brasil y en el extranjero (Silva et al., 2011; Sindhu et al., 2012).

La modificación de la técnica da lugar al surgimiento del Test de Inmersión en Jeringas (SIT por su sigla en inglés) (Sindhu et al.,2012). Esta técnica fue comparada frente al LIT original por parte de Farias et. al., (2016), concluyendo que SIT presenta diferentes ventajas tales como la reducción del tiempo de preparación de las jeringas; reducción del espacio físico necesario para almacenar las larvas durante la prueba; disminución del riesgo de contaminación ambiental y del operador con las soluciones empleadas (debido a menor volumen y mejora en el proceso de secado y reducción de volumen de solución empleada.

Los modelos dosis-respuesta son modelos de regresión en los que normalmente se hace referencia a la variable independiente como dosis o concentración, definiendo dosis como cualquier cantidad pre especificada de radiación biológica, química o estrés que provoca una respuesta determinada y bien definida, mientras que la variable dependiente generalmente se denomina respuesta o efecto, definiendo la respuesta como la cuantificación de un efecto biológicamente relevante y como tal está sujeta a variación aleatoria (Ritz, Baty, Streibig,Gerhard,2015). Las curvas dosis respuesta también se pueden utilizar para resumir experimentos en los que la respuesta es el evento tiempo, es decir, el tiempo transcurrido antes de que se observe algún evento específico (Ritz, et., al 2015).

Los parámetros farmacodinámicos de los modelos dosis respuesta, están centrados principalmente en 3 indicadores. El primero de ellos, el de *Eficacia máxima* (E_{max}), define cual es el nivel máximo de respuesta para una droga. Mientras tanto, la *Dosis efectiva* (ED), hace referencia a la concentración que una droga requiere para producir un efecto terapéutico determinado. Dentro de las ED, podemos plantearnos tres niveles de estudio, resaltando la dosis efectiva 50 (ED_{50}), la dosis efectiva 80 (ED_{80}) y la dosis efectiva 95 (ED_{95}). La ED_{50} corresponde a la potencia del fármaco, parámetro farmacodinámico de

interés para comparar perfiles dosis-respuesta entre fármacos. La potencia de un fármaco se define como la concentración capaz de lograr el 50% del efecto máximo (*Emax*). No obstante, ED_{95} se utiliza como dosis discriminante entre poblaciones susceptibles y poblaciones resistentes (Riviere, Papich, 2018), considerando las variaciones en ED_{80} como una etapa inicial de la pérdida de eficacia de una droga. Por último el tercer indicador, la *pendiente* del modelo, indica la sensibilidad de la curva dosis respuesta y la selectividad del fármaco (Riviere, Papich, 2018).

HIPÓTESIS

La técnica de inmersión de larvas de garrapatas del género *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* es un técnica de laboratorio aplicable para determinar perfiles de sensibilidad farmacológica entre las distintas Lactonas Macrocíclicas.

OBJETIVO GENERAL

Validar el test de inmersión en larvas como herramienta diagnóstica del perfil de sensibilidad acaricida de Lactonas Macrocíclicas en poblaciones de garrapata del género *Rhipicephalus microplus*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar el modelo de dosis-respuesta y los parámetros farmacodinámicos de la Técnica de Inmersión en Jeringa para Ivermectina, Doramectina y Moxidectina en larvas del género *Rhipicephalus microplus*.

2. Comparar los parámetros farmacodinámicos entre los modelos de dosis-respuesta de Ivermectina, Doramectina y Moxidectina en larvas del género *Rhipicephalus microplus aplicando la Técnica de Inmersión en Jeringa*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivo Biológico

Obtención de garrapatas Adultas del género Rhipicephalus (Boophilus) microplus

Se utilizan teleoginas de la cepa de referencia Mozo de *Rhipicephalus microplus* (colaboración del Laboratorio de Parasitología, Dilave), las cuales fueron incubadas en estufa a temperatura y humedad controlada (27 °C y 90 % humedad) para posteriormente obtener larvas de garrapata.

Figura 12- garrapatas teleoginas ovipositando

Obtención de larvas de garrapatas del género Rhipicephalus (Boophilus) microplus

La preparación de las garrapatas en el laboratorio se llevará a cabo de acuerdo con los procedimientos de la FAO (FAO, 2004). Las larvas serán obtenidas tras la incubación de garrapatas Teleóginas de acuerdo a las especificaciones indicadas por Drummond *et al.,* 1973; FAO, 2004. Brevemente, las garrapatas obtenidas se acondicionan en cajas de Petri. Posteriormente se incuban en estufa con condiciones de temperatura y humedad controladas (27 °C y 90 %). A los 14 días de iniciada la incubación se retiran las xenoginas. Posteriormente, se continúa por nuevo período de 25 días de incubación para que eclosionen larvas viables. Una vez ocurrida la eclosión se esperan de 14 a 16 días para iniciar las pruebas con las larvas. Este punto permite comparar diferentes poblaciones de larvas sincronizadas a un mismo momento de desarrollo en términos de vitalidad y tiempo de sobrevida.

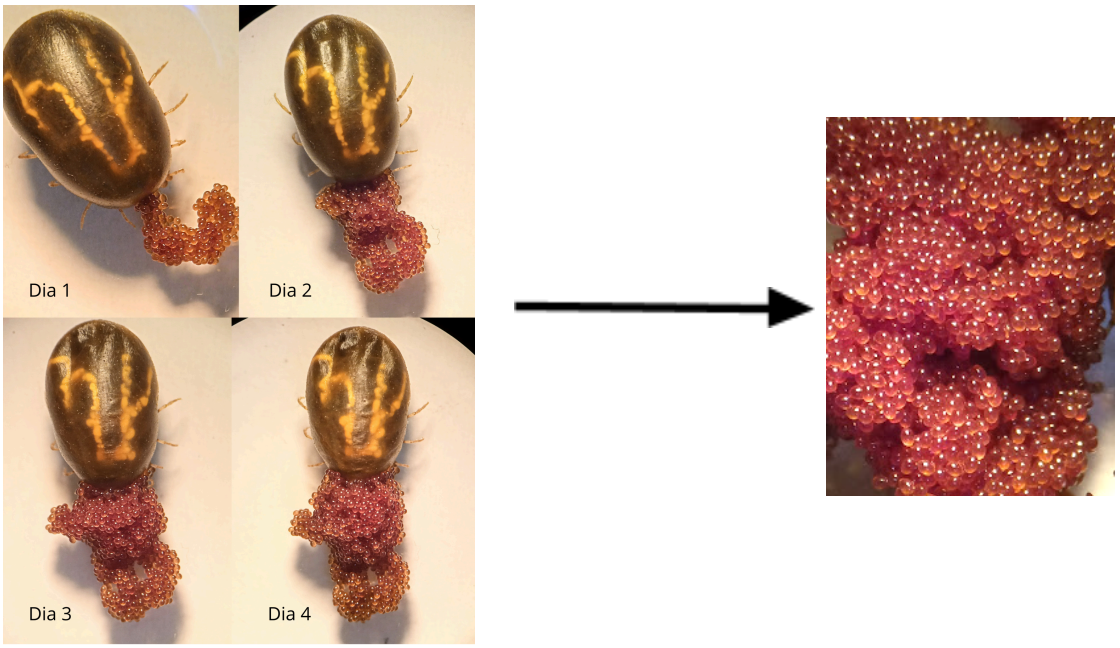


Figura 13- Proceso de oviposición (foto personal)

Técnica de inmersión (Test de inmersión en Jeringa)

Preparación de soluciones analíticas de los principios activos a emplear

Las soluciones madres y las correspondientes diluciones se prepararon acorde a la metodología publicada por la FAO (2004, Klafke et al., 2012). Brevemente, se partirá de una solución madre de Acetona-Triton-X al 2% (ACT-TX 2%) y de una solución de diluyente (1:99 de solución madre:agua destilada) (ACT-TX 0.02%). El siguiente paso consiste en preparar las soluciones madre de cada principio activo, para lo cual se pesaron en balanza analítica la cantidad necesaria de principio activo para cada solución madre inicial (SM *principio activo*). A partir de dicha solución inicial se preparan las soluciones de trabajo en diluciones seriadas 1:2 con la solución diluyente (ACT-TX 0.02%). De forma orientativa, se prepararon entre 8 y 10 niveles de concentraciones, donde se prepara un volumen de 40 ml por concentración de trabajo, a partir de los cuales se realiza la inmersión.

Figura 14- Jeringas Cargadas con larvas, previo a la inmersión

Armado de jeringas para inmersión de larvas

Se utilizarán jeringas de 2.5 mL (Figura 14) a las cuales se les corta el pivote, se ajusta una malla filtro de 120 um y se se realizan 6 orificios que permiten la entrada de aire al momento de la inmersión (adaptado de la técnica descrita por Souza et al., 2008).

Cargado de las jeringas con larvas

Las jeringas son conectadas a la bomba de vacío (Figura 15) y mediante el agregado de tips se capturan únicamente las larvas que demuestran viabilidad óptima (demuestran movimiento contínuo, n = 20). Una vez cargadas las jeringas, se coloca el émbolo tapando los orificios para evitar que las larvas escapen.

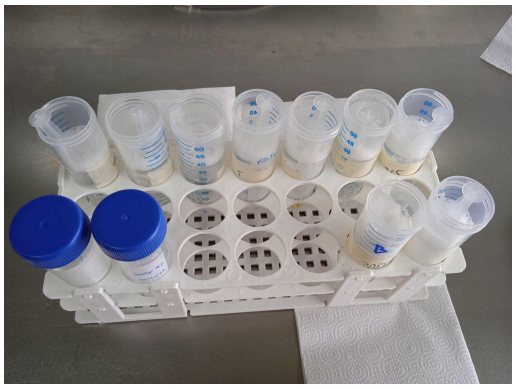
Figura 15- Cargado de jeringas mediante bomba de vacío

Inmersión de larvas

Las jeringas cargadas con larvas serán inmersas en las diferentes soluciones de principios activos, preparadas previamente en tubos falcon de 50 ml. Pasado el tiempo de inmersión de 5 min (Vidal,L, 2021) se retiran las jeringas, se secan en papel de secado y se colocan en campana de flujo durante 1 hora previamente a la incubación en estufa por 24 horas.

Las condiciones de incubado son similares a las establecidas para garrapatas adultas y larvas (27°C / 90 % humedad relativa).

Cada una de las diluciones estudiadas (diluyente control y concentraciones crecientes de principio activo) se estudió por triplicado.



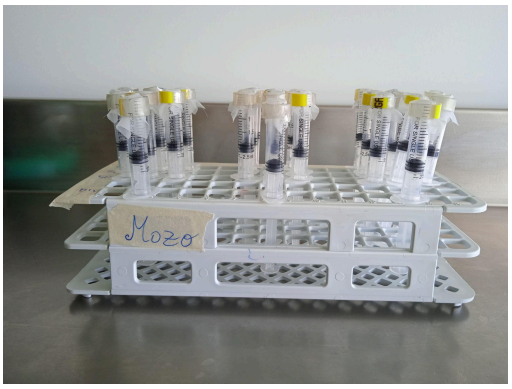


Figura 16 y 17- Inmersión y secado

Lectura de resultado

Pasadas las 24 horas se retiran las jeringas con larvas de la estufa de cultivo y se realiza el recuento de larvas vivas y muertas individualmente para cada jeringa. Para facilitar el recuento, todas las jeringas son desarmadas sobre una superficie blanca (Figura 18 y 19).

Figura 18 y 19- Incubación de las jeringas por 24 horas y posterior recuento de larvas vivas y muertas de R. microplus.

Interpretación de los resultados

Una vez obtenido el recuento de larvas vivas/muertas se pondrá a punto las distintas estrategias de exploración y adecuación de la base de datos de los distintos ensayos, se seleccionará los posibles modelos farmacodinámicos candidatos y se realizará la correspondiente validación del modelo final de mejor ajuste. El producto del procesamiento de datos será presentado mediante el gráfico de curvas de dosis-respuesta, representación y cálculo de supuestos y la determinación de los principales parámetros farmacodinámicos (ED_{50}, ED_{80}, ED_{95}).

Análisis estadístico

Los datos cuantitativos fueron analizados de acuerdo a técnicas estadísticas descriptivas y estudios de distribución. Se estimaron las medias, desviaciones estándares y coeficientes de variación, para cada parámetro farmacodinámico evaluado. Los resultados se ajustaron al modelo Log-logistic (Ritz et al., 2015). Para verificar diferencias entre los valores dinámicos se aplicaron modelos lineales generalizados mixtos, con un intervalo de confianza del 95% (IC_{95}). Los datos se analizaron utilizando el programa R (R Development Core Team, 2015) y el paquete *drc* (Ritz et al., 2015).

RESULTADOS

Con el objetivo de validar el test de inmersión en larvas como herramienta diagnóstica del perfil de sensibilidad acaricida de Lactonas Macrocíclicas en poblaciones de garrapata del género *R. microplus*, se realizaron 6 repeticiones para cada fármaco (6 curvas por droga), posteriormente resumidas en una sola curva (Figura 18) para lograr visualizar el correcto ajuste de cada modelo dosis - respuesta.

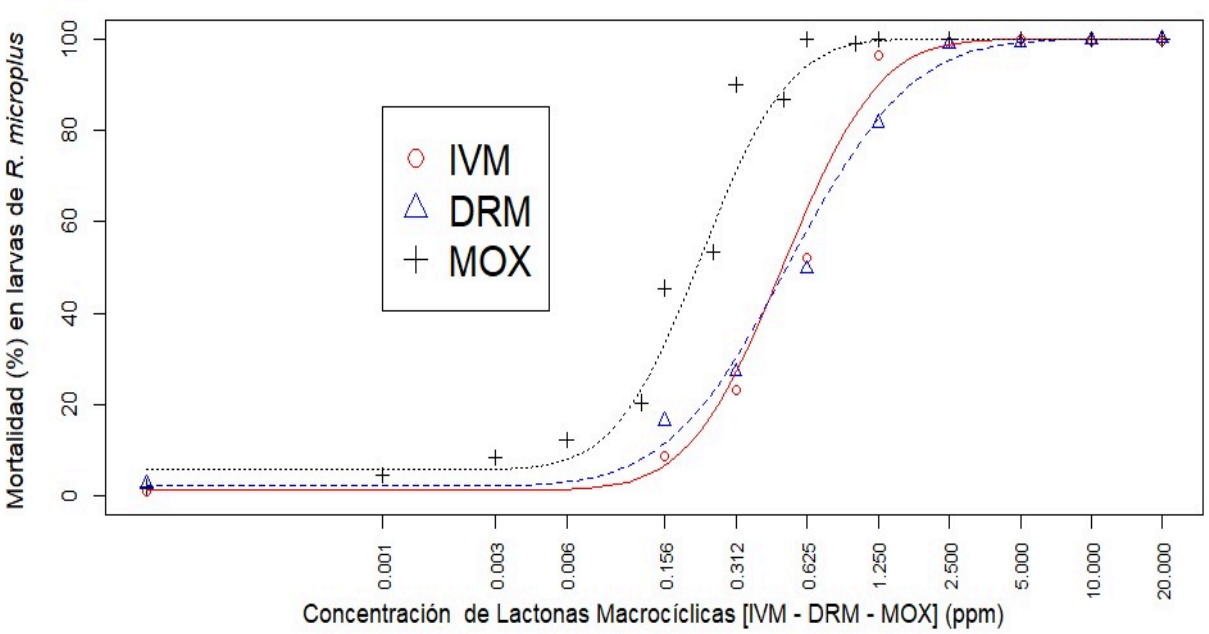


Figura 20- Ajuste del modelo dosis-respuesta para la mortalidad de larvas de la cepa Mozo Rhipicephalus microplus frente a Ivermectina (IVM), Doramectina (DRM) y Moxidectina (MOX) mediante la prueba de inmersión con jeringa.

Para IVM y DRM, las concentraciones finales utilizadas para ajustar el modelo dosis-respuesta estuvieron en el rango de 0,155 a 20 ppm y en el caso de MOX, las concentraciones finales estuvieron entre 0,01 y 1 ppm.

Los parámetros farmacodinámicos (ED_{50} ED_{80} ED_{95}) para las diferentes lactonas, IVM, DRM, MOX se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1- Parámetros farmacodinámicos para el modelo dosis-respuesta en larvas de la cepa Mozo *Rhipicephalus microplus* contra ivermectina (IVM), doramectina (DRM) y moxidectina (MOX) mediante la prueba de inmersión con jeringa.

	Límite inferior	**Pendiente**	**Dosis efectiva (ED) [IC_{95}]**		
	[IC_{95}]	**[IC_{95}]**	ED_{50}	ED_{80}	ED_{95}
IVM	0,01	1,37	0,5	0,92	1,65
	[0,0 - 0,02]	[1,26 - 1,49]	[0,47 - 0,53]	[0,85 - 0,99]	[1,48 - 1,83]
DRM	0,02	1,07	0,53	1,16	2,45
	[0,01 - 0,04]	[0,00 - 1,16]	[0,49 - 0,57]	[1,07 - 1,26]	[2,15 - 2,76]
MOX	0,06	1,51	0,23	0,39	0,67
	[0,04 - 0,08]	[1,34 - 1,68]	[0,21 - 0,24]	[0,37 - 0,42]	[0,6 - 0,75]

Como se observa en la tabla 1, los valores obtenidos para ED_{50} fueron 0,5, 0,58 y 0,23 ppm para IVM. DRM y MOX respectivamente, indicando que MOX duplica la potencia con respecto a IVM y DRM (reducción del 50%).

En cuanto a los valores de ED_{80}, los resultados son similares a los encontrados en la ED_{50} en cuanto a su magnitud de diferencia, pero con valores absolutos mayores. MOX continuó indicando una menor concentración para alcanzar similares respuestas.

Con relación al valor promedio de ED_{95}, utilizada como dosis discriminante entre cepas susceptibles y poblaciones resistentes, la magnitud de concentraciones se incrementó proporcionalmente en mayor medida para DRM con respecto a IVM y MOX. Todas las dosis discriminantes mostraron intervalos de confianza (**IC_{95}**) diferentes para cada uno de los tres activos estudiados.

La comparación de los parámetros farmacodinámicos (límite inferior, pendiente y ED_{50}, ED_{80} y ED_{95}) entre las diferentes drogas se muestran en la Tabla 2, donde se observa que la relación ED_{50} entre los fármacos incluidos en este estudio mostró una diferencia significativa entre IVM y DRM en comparación con MOX; Una situación similar aparece al comparar el límite inferior entre ambos. Al comparar ED_{50} entre IVM y DRM vs. MOX es superior a 1, lo que

significa que MOX tiene la ED_{50} más baja de los tres fármacos, por lo tanto MOX tiene mayor potencia en comparación con IVM y DRM en larvas de *R. microplus,* utilizando SIT.

Tabla 2- Relación de parámetros farmacodinámicos (límite inferior, pendiente y dosis efectiva 50 [ED50]) entre modelos de dosis-respuesta en larvas de *R. microplus* de Cepa Mozo frente a ivermectina (IVM), doramectina (DRM) y moxidectina (MOX) mediante la prueba de inmersión en jeringa.

Parámetro	Comparación	Estimado ± Error estándar	P
Límite inferior	IVM/DRM	0,57 ± 0,34	0,21
	IVM/MOX	0,21 ± 0,11	**0,00**
	DRM/MOX	0,37 ± 0,14	**0,00**
Pendiente	IVM/DRM	1,28 ± 0,08	**0,00**
	IVM/MOX	0,91 ± 0,07	0,18
	DRM/MOX	0,71 ± 0,05	**0,00**
ED_{50}	IVM/DRM	0,94 ± 0,05	0,22
	IVM/MOX	2,21 ± 0,11	**0,00**
	DRM/MOX	2,35 ± 0,13	**0,00**

En cuanto a la pendiente, al comparar DRM con IVM y MOX, esta presenta diferencias significativas ($P<0,05$), mientras que IVM y MOX mostraron una pendiente similar ($P>0,05$). Esto indicaría que todos los fármacos alcanzan la máxima eficacia, y que DRM tiene la sensibilidad más baja en relación con IVM y MOX para modificar su respuesta de eficacia mínima a máxima.

DISCUSIÓN

Los parámetros farmacodinámicos de los modelos dosis respuesta, están centrados principalmente en 3 indicadores. *Eficacia máxima* (E_{max}), *Dosis efectiva* (ED), y *pendiente.* Dentro de la ED, podemos plantearnos tres niveles de estudio, resaltando la dosis efectiva 50 (ED_{50}), la dosis efectiva 80 (ED_{80}) y la dosis efectiva 95 (ED_{95}).

El análisis de la relación de potencia (ED_{50}) entre avermectinas (IVM y DRM) no mostró diferencias contra las larvas de *R. microplus* ($P>0,05$). Sin embargo, al analizar los datos para la dosis efectiva del 95% (ED_{95}), se evidencia una marcada diferencia entre la concentración necesaria para lograr una ED_{95},

donde DRM requiere concentraciones mayores para lograr el efecto mencionado en una población sensible.

Por último el tercer indicador, la *pendiente* del modelo, indica la sensibilidad de la curva dosis respuesta y la selectividad del fármaco. DRM presentó una pendiente menor en comparación con IVM (1,07 para DRM y 1,37 para IVM, $P<0,05$), lo que refleja diferencias en la velocidad de cambios para las larvas de *R. microplus* de la cepa Mozo cuando se utiliza la técnica SIT, donde los cambios en las concentraciones tanto de DRM como de IVM generan aumentos en la mortalidad larvaria. Por otro lado, DRM lo hace gradualmente, requiriendo concentraciones más altas para alcanzar los niveles de mortalidad larvaria de IVM. Lo que evidencia diferencias en los valores estimados de la pendiente de la curva dosis-respuesta para ambas moléculas endectocidas.

Considerando que las pruebas de sensibilidad realizadas en garrapatas adultas (AIT) tienen desventajas en comparación con las técnicas realizadas en larvas. Jonsson et al. (2007), menciona que las pruebas realizadas en adultos requieren de un mayor número de individuos para aumentar el número de réplicas del ensayo e incrementar el valor predictivo de la prueba, lo cual suele ser una limitante a nivel de campo. Otra desventaja de trabajar con garrapatas adultas es la vitalidad de los individuos, que se ve afectada por el tiempo desde la recolección hasta la realización del ensayo (Klafke et al., 2012).

El caso opuesto ocurre cuando se utilizan larvas, donde existe una ventana de tiempo más amplia entre la captura de los adultos en el campo y la eclosión de las larvas de los huevos, además al utilizar larvas de *R. microplus*, se aumenta el número de individuos utilizados, se asegura un mayor número de réplicas por punto analizado, aspectos son de relevancia para la obtención de resultados confiables, minimizando el error estadístico (Jonsson et al., 2007).

Según los resultados obtenidos en el ensayo para IVM, después de ajustar los valores a la escala logarítmica normal para las 6 curvas dosis-respuesta estudiadas, la ED_{50} osciló entre 0,47 y 0,53, mientras que la pendiente estuvo entre 1,26 y 1,49. En comparación con lo informado por Klafke et al (2012) para LPT y LIT, nuestros resultados obtenidos con SIT están marcadamente por debajo de los obtenidos por diferentes técnicas. Esto permite indicar que la SIT podría ser una técnica alternativa que proporciona mayor sensibilidad para la detección temprana de cepas resistentes a IVM.

Con respecto a la manipulación de las larvas, (Klafke et al., (2012) describen la agitación vigorosa de las larvas durante la LIT, junto con la manipulación constante de los individuos. El empleo de SIT evita el efecto mecánico de la agitación vigorosa, asegurando la inmersión completa de las larvas dentro de la jeringa; reduciendo la manipulación larvaria, ambas fuentes potenciales de variación encontradas en LPT y LIT.

El utilizar técnicas de inmersión de larvas permite que todo el individuo esté expuesto a la droga que garantiza la entrada del fármaco a través de rutas cuticulares y articulares, aumentando potencialmente la entrada del fármaco al

parásito, lo que podría explicar la mayor sensibilidad de las técnicas de inmersión. La detección temprana de resistencia es esencial para evitar una mayor selección de garrapatas resistentes utilizando el mismo principio activo y retrasar la propagación de la resistencia a otras poblaciones. Sin embargo, poco se menciona con relación a la alternancia de activos de una misma familia, como es el caso de LM.

De las principales diferencias que encontramos, cabe mencionar el hecho que MOX presentó una pendiente similar a IVM pero con una mayor potencia (ED_{50}MOX < ED_{50}IVM = ED_{50}DRM), logrando el mismo nivel de efecto a concentraciones más bajas. Una posible explicación podría ser que MOX tiene una lipofilicidad mayor que IVM (Ménez et al., 2012), lo que favorecería la penetración del acaricida al contacto con las larvas durante la inmersión, resultando en mayor mortalidad en concentraciones más bajas.

Estas diferencias deberían ser consideradas cuando aplicamos modelos de dosis respuestas como herramientas de diagnóstico de resistencia. Recordemos, que su aplicación contribuye en la evaluación de medidas de manejo que permitan evitar o retrasar la aparición de resistencia, así como es importante conocer el ciclo y las generaciones de garrapatas (Cuore et al., 2015), para poder instaurar los tratamientos de forma correcta. Así como para detectar poblaciones de *R. microplus* resistentes a los acaricidas, la (FAO) recomienda diferentes bioensayos que pueden realizarse a bajo costo en el país (FAO,2004, Cruz et al 2021, Obaid et al 2022).

CONCLUSIÓN

Los resultados alcanzados en la presente tesis permiten la validación de la técnica de inmersión en jeringas (SIT) como herramienta de diagnóstico de sensibilidad en larvas de *R. microplus* mediante la construcción de curvas dosis-respuesta para IVM, DRM y MOX.

Se logró el ajuste de los modelos farmacodinámicos y los parámetros farmacodinámicos ED_{50}, ED_{80} y ED_{95} para IVM, DRM y MOX en un modelo *in vitro* de dosis-respuesta en larvas de *R. microplus.*

Por último y no menos relevante, la validación de la técnica de inmersión en jeringas asegura la disponibilidad de una herramienta metodológica sensible para comprobar la sensibilidad de larvas de *R. microplus* para IVM, DRM y MXD en condiciones de laboratorio.

PRINCIPALES COMUNICACIONES QUE SURGEN DE LA PRESENTE TESIS

Artículo publicado

Robaina, D., Caballero,. J. y Suárez, . G. (2023) Syringe immersion test as in vitro bioassay against *Rhipicephalus microplus*: Macrocyclic lactones dose-response relationship. Open Veterinary Journal, 13 (10), 1259-1267. doi:10.5455/OVJ.2023.v13.i10.4

Comunicaciones a congresos

Robaina, D., Caballero, J., Suárez, G., (2023),Teste de Imersão em Seringa como bioensaio in vitro contra Rhipicephalus microplus: relação dose-resposta de lactonas macrocíclicas. En: I Escola de Nanotecnologia Aplicada à Farmacologia Veterinária,
I Simpósio Internacional de Farmacologia e Terapêutica Veterinária. Lavras, Brasil

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alonso-Díaz, M.A., Rodríguez-Vivas, R.I., Fragoso-Sánchez, H., y Rosario-Cruz, R. (2006). Resistencia de la garrapata Boophilus microplus a los ixodicidas. *Archivos de medicina veterinaria,* 38(2), 105-113. Recuperado de https://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X2006000200003

Alonso Díaz, M.A., y Fernández Salas, A., (2022). Rhipicephalus microplus: biología, control y resistencia. Recuperado de https://www.fmvz.unam.mx/fmvz/centros/ceiegt/archivos/Manual_R_Microplus.pdf

Aráoz, V. (2019.). *Estudio transversal de la garrapata común del bovino (Rhipicephalus microplus) y la tristeza parasitaria bovina en Uruguay*. (Tesis de maestría). Facultad de Veterinaria, UDELAR, Montevideo.

Ávila, D. (1998). *Análisis cuantitativo de los costos a nivel país y del productor por la presencia de la garrapata en Uruguay*. IAEA-DILAVE-MGAP.

Barrios, M., y Bruzzone, L. (2019.). *Situación de Rhipicephalus microplus en Uruguay y estudio de diferentes planes de saneamiento en Lavalleja y Rocha.* (Tesis de grado). Facultad de Veterinaria, UDELAR, Montevideo.

Benavides, E., Romero Prada, J., y Villamil Jiménez, L.C., (2016). *Las garrapatas del ganado bovino y los agentes de enfermedad que transmiten en escenarios epidemiológicos de cambio climático Guía para el manejo de garrapatas y adaptación al cambio climático.* San José: IICA. Recuperado de http://repositorio.iica.int/handle/11324/7231

Betancur, O., y Giraldo-Ríos, C. (2018). Economic and Health Impact of the Ticks in Production Animals. En: *Ticks and Tick-Borne Pathogens* (pp.1-19). Colombia: IntechOpen. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/330938778_Economic_and_Health_Impact_of_the_Ticks_in_Production_Animals

Bock, R., Jackson, L., De Vos, A., y Jorgensen, W. (2004). Babesiosis of cattle. *Parasitology;* 129(S1):247-269.

Brum, J.G.W. (1988). *Infecção em teleóginas de* Boophilus microplus *(Acari: Ixodidae)* (Tese Doutorado). Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Castro-Janer E., Rifran L., González P., Piaggio J., Gil A., y Schumaker T.T.S. (2010). Rhipicephalus Boophilus microplus (Acari: Ixodidae) resistance to fipronil in Uruguay evaluated by in vitro bioassays.*Veterinary Parasitology*. 169: 172-177.

Oliveira, P.R. de, y Camargo-Mathias, M.I. (2018). *Inside ticks: morphophysiology, toxicology and therapeutic perspectives.* Recuperado de https://books.scielo.org/id/xz2k6/pdf/camargo-9788595462861-11.pdf

Cortés Vecino, J.A., Betancourt Echeverri, J.A., Argüelles Cárdenas, J., y Pulido Herrera, L.A. (2010). Distribución de garrapatas Rhipicephalus (Boophilus) microplus en bovinos y fincas del Altiplano cundiboyacense. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria,* 11(1), 73-84.

Crampton, A.L., Baxter, G.D., Barker, S.C. Identification and characterization of a cytochrome P450 gene and processed pseudogene from an arachnid: the cattle tick, Boophilus microplus. *Insect Biochemical and Molecular Biology,* 29, 377-384.

Cruz, R.R., García, D.I.D., Silva, S.L., y Domínguez, F.R. (2021). Integrated management of the cattle tick Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Acari: Ixodidae) and the acaricide resistance mitigation. En: *Insecticides.* Colombia: IntechOpen. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/357127802_Integrated_Management_of_the_Cattle_Tick_Rhipicephalus_Boophilus_microplus_Acari_Ixodidae_and_the_Acaricide_Resistance_Mitigation

Cuore U. (2006). Resistencia a los Acaricidas, Manejo y Perspectivas. En Centro Médico Veterinario de Paysandú (Ed.) *Jornadas Uruguayas de Buiatría*. (Vol XXXIV, pp. 30-35). Paysandú: Centro Médico Veterinario de Paysandú.

Cuore, U., Solari, M.A., Cicero, L., Trelles, A., Gayo, V., y Nari, A. (2009). Evaluación de los garrapaticidas actualmente disponibles en Uruguay para su utilización en los despachos de tropa. *Veterinaria (Montevideo)*, 45(173-176), 23–30. Recuperado de https://www.revistasmvu.com.uy/index.php/smvu/article/view/156

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. Recuperado de https://www.revistasmvu.com.uy/index.php/smvu/article/view/204

Cuore, U. (2013). *Determinación de eficacia de productos garrapaticidas. Prueba de Establo*. Recuperado de https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/sites/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/files/2020-10/DGSG_N%C2%BA_153A_24_03_2017_Procedimiento_ver2_res.pdf

Cuore, U.; Acosta, W.; Bermúdez, F.; Da Silva, O.; García, I.; Pérez Rama, R.; Luengo, L.; Trelles, A. y Solari M. A. (2015) Tratamiento generacional de la garrapata. Aplicación de una metodología en un manejo poblacional para la erradicación de Rhipicephalus (Boophilus) microplus resistentes a lactonas macrocíclicas.*Veterinaria (Montevideo)* 51 (198) 14-25. Recuperado de http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1688-48092015000200002

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

Da Costa, G.L., Sarquis, M.I., De Moraes, A.M., y Bittencourt, V.R. (2002). Isolation of Beauveria bassiana and Metarhizium anisopliae var. anisopliae from Boophilus microplus tick (Canestrini, 1887), in Rio de Janeiro State, Brazil. *Mycopathologia,* 154, 207-209.

Dietrich, G., Dolan, M.C., Peralta-Cruz, J., Schmidt, J., Piesman, J., Eisen, R.J., y Karchesy, J.J. (2006). Repellent activity of fractionated compounds from Chamaecyparis nootkatensis essential oil against nymphal Ixodes scapularis (Acari: Ixodidae). *Journal of medical entomology,* 43(5), 957–961.

Drummond, R.O., Crust, S.F., Trevino, J.L., Gladney, W.J., y Graham, O.H., (1973). B. annulatus and B. decolaratus: laboratory tests of insecticides. *Journal of Economic Entomology* , 66, 130–133.

Errico, F., Nari, F., Cuore, U., Mendoza, R., Suarez , H., Mesa, P., … Saporiti, D. (2009) Una nueva ley de lucha contra la garrapata Boophilus microplus en el Uruguay, *Plan agropecuario,* 131, 42-47.

Errecalde, J., Mestorino, N., Fiel, C., y Nari, A. (2013). Terapéutica de las ectoparasitosis. En C. Fiel y A. Nari (Coord.). *Enfermedades parasitarias de importancia clínica y productiva en rumiantes. Fundamentos epidemiológicos para su diagnóstico y control* (pp. 625-630). Montevideo: *Editorial Hemisferio Sur.*

Farias, J.A., Gulias Gomes, C.C., Minho, A.P., Domingues, R., Macke Franck, B., Leitzke Granada, R., y Pereira de Souza, A. (2016). Comparison of three Larval Immersion Tests in Syringe to evaluate acaricidal activity of chemical solutions. *Ciências Agrárias*, 37(5), 3205-3208.

Ferreira, L.C., Lima, E.F., Silva, A.L., Oliveira, C.S., Filho, G.M., Sousa, … Vilela, V.L. (2022). Cross-Resistance between Macrocyclic Lactones in Populations of Rhipicephalus microplus in Brazil's Semiarid Region. *Experimental & applied acarology,* 87(1), 109-117. https://doi.org/10.1007/s10493-022-00730-x

Food and Drug Administration. (2023). *Resistencia antiparasitaria*. Recuperado de https://www.fda.gov/animal-veterinary/safety-health/resistencia-antiparasitaria.

Fiel. C., y Nari, A. (2013). *Enfermedades Parasitarias de Importancia Clínica y Productiva en Rumiantes.* Montevideo: Hemisferio Sur.

Freitas, D.R.J., Pohl, P.C., y Vaz, I.S. (2005) Characterization of acaricide resistance in Boophilus microplus. *Acta Scientiae Veterinariae, Porto Alegre,* 33 (2), 109-117. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/254508747_Caracterizacao_da_resistencia_para_acaricidas_no_carrapato_Boophilus_microplus_Characterization_of_acaricide_resistance_in_Boophilus_microplus

Garcia, M.V., Rodrigues, V.S., Koller, W.W., y Andreotti, R. (2019). Biologia e importancia do carrapato Rhipicephalus (Boophilus) microplus. En Carrapatos na Cadeia Produtiva de Bovinos. Recuperado de https://cloud.cnpgc.embrapa.br/controle-do-carrapato-ms/files/2019/02/Controle-Carrapatos-2019-COMPLETO-EBOOK.pdf

Guerra, M.S. (1985). *Receituário caseiro: alternativas para o controle de pragas e doenças de plantas cultivadas e de seus produtos.* Brasília: Embrater.

Guerrero F.D., Lovis L., y Martins, J.R. (2012). Acaricide resistance mechanisms in Rhipicephalus .Boophilus. microplus. *Revista Brasileira Parasitología. Veterinaria.* 21(1), 1–6. Recuperado de https://doi.org/10.1590/S1984-29612012000100002

Guglielmone, A.A., Mangold A.J., Castelli, M., Suárez, V.H., Aguirre, D.H., Alcaraz E.,... Nava S. (2006). Toxicidad in vitro de la cipermetrina para Rhipicephalus .Boophilus. microplus (Can.) y del diazinón para Haematobia irritans (L.) en la Argentina. *Revista Investigación Agropecuaria*. 35: 31-41.

Grisi, L., Leite, R.C., Martins, J.R., Barros, A.T., Andreotti, R., Cançado, P.H., … Villela, H.S. (2014). Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. *Revista brasileira de parasitologia veterinaria = Brazilian journal of veterinary parasitology : Orgao Oficial do Colegio Brasileiro de Parasitologia Veterinaria*, *23*(2), 150–156. Recuperado de https://www.scielo.br/j/rbpv/a/Yvdz46WMYtR8NK43mjN8GLt/?lang=en

Jonsson, N.N., Miller, R.J., y Robertson, J.L. (2007). Critical evaluation of the modified-adult immersion test with discriminating dose bioassay for Boophilus microplus using American and Australian isolates. *Veterinary Parasitology,* 146(3-4), 307-315.

Klafke, G.M., Sabatini, G.A., de Albuquerque, T.A., Martins, J.R., Kemp, D.H., Miller, R. J., y Schumaker, T.T.S. (2006). Larval immersion tests with ivermectin in populations of the cattle tick Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Acari: Ixodidae) from State of Sao Paulo, Brazil. *Veterinary Parasitology,* 142(3-4), 386–390.

Klafke, G.M., Castro-Janer, E., Mendes, M.C., Namindome, A., y Schumaker, T.T.S. (2012). Applicability of in vitro bioassays for the diagnosis of ivermectin resistance in Rhipicephalus microplus (Acari: Ixodidae). *Veterinary parasitology,* 184(2-4), 212-220.

Kunz, S.E., y Kemp, D.H. (1994). Insecticides and acaricides: resistance and environmental impact. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, *13*(4), 1249-1286.

Lifschitz A., Virkel G., Imperiale F., Pis, A., y Lanusse, C. (2002). Fármacos endectocidas: avermectinas y milbemicinas. EnL.M. Botana, F. Landoni, F., y Matín-Jiménez, T. (Eds.). *Farmacología y Terapéutica Veterinaria.* (pp. 545-558). Madrid: McGraw-Hill-Interamericana.

Lopes, L.B., Nicolino, R., Capanema, R.O., Oliveira, C.S.F., Haddad, J.P.A., y Eckstein, C. (2015). Economic impacts of parasitic diseases in cattle. *CAB Reviews*, 10(51). Recuperado de

https://www.researchgate.net/publication/306120156_Economic_impacts_of_parasitic_diseases_in_cattle#full-text

Lovis L., Mendes M.C., Perret J.L., Martins J.R., Bouvier J., Betschart B., y Sager H. (2013). Use of the Larval Tarsal Test to determine acaricide resistance in Rhipicephalus Boophilus. microplus Brazilian field populations. *Veterinary Parasitology.* 191: 323-331.

Ménez, C., Sutra, J.F., Prichard, R. y Lespine, A. (2012). Relative neurotoxicity of ivermectin and moxidectin in Mdr1ab (-/-) mice and effects on mammalian GABA(A) channel activity. *PLOS Neglect. Trop.* D. 6(11), e1883.

Miraballes Ferrer, M.C. (2018.). *Antecedentes prevención y control de Rhipicephalus microplus y de la tristeza parasitaria en Uruguay.* (Tesis de doctorado). Facultad de Veterinaria, UDELAR, Montevideo.

Miraballes C., Riet-Correa F., Fuellis C., y Aráoz V. (Ed.). (2018). Control de la garrapata Rhipicephalus (Boophilus) microplus y la tristeza parasitaria. *Revista Instituto Nacional Investigación Animal*, 52. Recuperado de http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/8949/1/revista-INIA-52.pdf.

Molento, M. (2020). *Avaliação seletiva de bovinos para o controle do carrapato.* Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

Mudd A.J., y Parker L.D. (1995). Use of the new molecule moxidectin for the control of parasites in sheep. *Proceedings of the Sheep Veterinary Society* 1993-1994, 1995; 18: 139-143.

Nari A., y Solari M.A. (1990). Desarrollo y utilización de vacuna contra Boophilus microplus, Babesiosis y Anaplasmosis, perspectiva actual en el Uruguay. *Jornadas Uruguayas de Buiatría*. (Vol XVIII pp. 9-34). Paysandú: Centro Médico Veterinario de Paysandú

Nava, S., Morel, N., Mangold, A.J., y Guglielmone, A.A. (2018). Un caso de resistencia de Rhipicephalus microplus (Acari: Ixodidae) al fipronil

detectado en pruebas de campo en el este de Santiago del Estero, Argentina. *Revista FAVE. Sección Ciencias veterinarias*, 17(1), 1-5. Recuperado de https://www.redalyc.org/journal/6177/617767037001/html/#redalyc_617767037001_ref19

Nuñez, J., Muñoz, M., y Moltedo, H. (1987). *Boophilus microplus. La garrapata común del ganado vacuno*, Montevideo, Hemisferio Sur.

Obaid, M.K., Islam, N., Alouffi, A., Khan, A.Z., da Silva Vaz, J.R.I., Tanaka, T., y Ali, A. (2022). Acaricides resistance in ticks: selection, diagnosis, mechanisms, and mitigation. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 941831. Recuperado de https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2022.941831/full

Oliveira, P.R., (2006) *Dinâmica da vitelogênese de carrapatos Amblyomma triste* (Koch, 1844) (Acari: Ixodidae). Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

Oliveira, P.R., Bechara, G.H., Marin-Morales, M.A., y Camargo-Mathias, M.I. (2009) Action of the chemical agent fipronil on the reproductive process of semi-engorged females of the tick Rhipicephalus sanguineus (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). Ultrastructural evaluation of ovary cells. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 1255-1264.

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (2003) *Resistencia a los antiparasitarios. Estado actual con énfasis en América Latina*. Roma: FAO. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/234058021_Resistencia_a_los_antiparasitarios_Estado_actual_con_enfasis_en_America_Latina_Estudio_FAO_Produccion_y_Sanidad_Animal_157

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (2004) *Resistance Management and Integrated Parasite Control in*

Ruminants Guidelines, Module 1. Ticks: Acaricide Resistance: Diagnosis, Management and Prevention. FAO, Animal Production and Health Division, Roma. Recuperado de https://www.fao.org/3/ag014e/ag014e.pdf

Panella, N.A., Dolan, M.C., Karchesy, J.J., Xiong, Y., Peralta-Cruz, J., Khasawneh, M., ... Maupin, G.O. (2005). Use of novel compounds for pest control: insecticidal and acaricidal activity of essential oil components from heartwood of Alaska yellow cedar. *Journal of Medical Entomology,* 42 (3), 352-358.

Pohl, P.C., Klafke, G.M., Júnior, J.R., Martins, J.R., da Silva Vaz, I., J.R. y Masuda, A. (2012). ABC transporters as a multidrug detoxification mechanism in Rhipicephalus (Boophilus) microplus. *Parasitology. Research.* 111(6), 2345–2351.

Polanco-Echeverry, D.N., y Ríos-Osorio, L.A. (2016). Aspectos biológicos y ecológicos de las garrapatas duras. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 17(1), 81-95. Recuperado de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-87062016000100008&lng=en&tlng=es.

Pruett, J.H., (1999). Immunological control of arthropods ectoparasites. *International Journal for Parasitology*, 29, 25-32.

Reck J., Klafke G.M., Webster A., Dall´Agnol B., Scheffer R., Souza U.A., … Martins JR. (2014). First report of fluazuron resistance in *Rhipicephalus microplus:* a field tick population resistant to six classes of acaricides. *Veterinary Parasitology.* 201: 1-2.

Ritz, C., Baty, F., Streibig, J. C., y Gerhard, D. (2015). Dose-response analysis using R. *PloS one*, 10(12), e0146021.28-136.

Riviere, J.E., y Papich, M.G. (2018). *Veterinary pharmacology and therapeutics.* (10th ed.) Hoboken: Wiley Blackwell.

Rodríguez-Vivas, R.I., Quiñones, A.F., y Fragoso, S.H. (2005). Epidemiología y control de la garrapata Boophilus en México. *Enfermedades de importancia económica en producción animal.* México: McGraw-Hill-UADY.

Rodríguez-Vivas, R.I., Arieta-Roman, R.D.J., Perez-Cogollo, L.C., Rosado-Aguilar, J. A., Ramírez-Cruz, G.T., y Basto-Estrella, G. (2010). Uso de lactonas macrocíclicas para el control de la garrapata Rhipicephalus (Boophilus) microplus en el ganado bovino. *Archivos de medicina veterinaria*, 42(3), 115-123.

Rosado-Aguilar, J.A., Aguilar-Caballero, A., Rodriguez-Vivas, R.I., Borges-Argaez, R., Garcia-Vazquez, Z., y Mendez-Gonzalez, M. (2010). Acaricidal activity of extracts from Petiveria alliacea (Phytolaccaceae) against the cattle tick, Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Acari: ixodidae). *Veterinary Parasitology,* 168(3-4), 299-303.

Rossner, M.V., Morel, N., Mangold, A.J., y Nava, S. (2019). Control estratégico de la garrapata común del bovino Rhipicephalus (Boophilus) microplus en el noreste de Argentina. En VIII *Congreso Argentino de Parasitología.* Corrientes, Argentina; (pp. 67-6). Recuperado de http://www.revargparasitologia.com.ar/pdf/RevArgParasitol_VIII_CAP.pdf

Saporiti, T., Losiewics, S., Trelles, A., Miraballes, C., Riet-Correa, F., y Cuore, U., (2021). Análisis del perfil de susceptibilidad de la garrapata *Rhipicephalus microplus* para cinco grupos químicos y factores asociados en poblaciones de campo del norte de Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)*, 57(215), Recuperado de http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1688-48092021000101510

Silva, W.C., de Souza Martins, J.R., Cesio, M.V., Azevedo, J.L., Heinzen, H., y de Barros, N.M. (2011). Acaricidal activity of Palicourea marcgravii, a species from the Amazon forest, on cattle tick Rhipicephalus (Boophilus) microplus. *Veterinary Parasitology, 1*79(1-3), 189-194.

Sindhu, Z.U., Jonsson, N.N., y Iqbal, Z. (2012). Syringe test (modified larval immersion test): a new bioassay for testing acaricidal activity of plant extracts against Rhipicephalus microplus. *Veterinary Parasitology,* 188 (3-4), 362-7.

Solari, M.A. (2006). Epidemiología y perspectivas en el control de hemoparásitos. Departamento de Parasitología, DILAVE ¨Miguel C. Rubino. En Centro Médico Veterinario de Paysandú , *Jornadas Uruguayas de Buiatría*. (Vol XXXIV, pp. 36-40). Paysandú: Centro Médico Veterinario de Paysandú.

Sonenshine D.E., Lane R.S., y Nicholson W.L. (2002). Capítulo 24: Ticks (Ixodida). Medical and veterinary entomology. En: G. Mullen, L. Durden (Ed.). *Medical and Veterinary Entomology* (5ta ed., pp. 517-558). Amsterdam: Elsevier Science.

Souza, A.P.D., Veiga, L.P.H., Bellato, V., Sartor, A.A., Cardoso, C.P., y Nunes, A.P.D. O. (2008). Proposta para teste carrapaticida por imersão de larvas de Rhipicephalus (Boophilus) microplus: avaliação em cipermetrina e amitraz. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 17, 242-245.

Spath, E.J.A., Guglielmone, A.A., Signorini, A.R., y Mangold, A.J. (1994). Estimación de las pérdidas económicas directas producidas por la garrapata Boophilus microplus y las enfermedades asociadas en la Argentina. *Therios* 23-119, 4ta parte (524-539)

Stone B., y Haydock K. (1962) A method for measuring the acaricide-susceptibility of the cattle tick Boophilus microplus (Can.). *Bulletin of Entomology Research,* 53, Part 3.

Shaw, R.D. (1996) Culture of an organophosphorus - resistant strain of Boophilus microplus (Can.) and an assessment of its resistance spectrum. *Bulletin Entomological Research*, 56(3), 389-405.

Uruguay (2008) Ley No. 18.268 del 17 de abril de 2008. Lucha contra la garrapata Boophilus microplus (garrapata común del bovino). Recuperado de https://www.impo.com.uy/bases/leyes/18268-2008

Valdespino, G.H.R., Ramirez, A.R., Mancera, B.D., Melgarejo, S.M., Beltran, A.H., Acosta, P. C., y Salas, D. R (2009). Resistencia de Rhipicephalus (Boophilus) spp a ixodicidas en ranchos ganaderos del sur de Veracruz, México. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/351527726_RESISTENCIA_DE_Rhipicephalus_Boophilus_spp_A_IXODICIDAS_EN_RANCHOS_GANADEROS_DEL_SUR_DE_VERACRUZ_MEXICO

Valsoni, L.M., Freitas, M.G., de Echeverria, J.T., Borges, D.G.L., Tutija, J., y Borges, F. de A., (2020) Resistance to all chemical groups of acaricides in a single isolate of Rhipicephalus microplus in Mato Grosso do Sul, Brazil. *International Journal of Acarology*, 46, 276–280. https://doi.org/10.1080/01647954.2020.1765867.

Velázquez, R., y Otegui, M.A. (2016). *Caracterizar el modelo de infección artificial de Rhipicephalus (Boophilus) microplus en bovinos y determinación de la eficacia ectoparasiticida de una formulación de Ivermectina 3, 15% larga acción.* (Tesis de grado). Facultad de Veterinaria, UDELAR, Montevideo.

Vercruysse, J., y Rew, R.S. (2002). *Macrocyclic lactones in antiparasitic therapy.* Estados Unidos: CAB International.

Vidal Regina, L. (2021). *Estandarización del test de inmersión de larvas modificado como herramienta de diagnóstico del perfil de sensibilidad para Rhipicephalus microplus frente a ivermectina.* (Tesis de grado). Facultad de Veterinaria, UDELAR, Montevideo.

Villar D., Klafke G.M., Rodríguez-Durán A., Bossio F., Miller R., Perez de Leon A.A., y Chaparro-Gutiérrez, J.J. (2020). Resistance prole and molecular

characterization of pyrethroid resistance in a Rhipicephalus microplus strain from Colombia.*Medical and veterinary entomology*. 34:105–115

Vilela V.L.R., Feitosa T.F., Bezerra R.A., Klafke G.M., y Riet-Correa F. (2020). Multiple acaricide-resistant Rhipicephalus microplus in the semi-arid region of Paraíba State, Brazil. *Ticks and tick-borne diseases*, 11(4), 101413.

Ysamat, J. (2004). Tratamientos de las Parasitosis en Vacunos de Carne. Recuperado de https://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/parasitarias/parasitarias_bovinos/36-tratamientos_parasitosis.pdf

Wharton, R.H., Roulston, W.J., Utech, K.B.W., y Kerr, J.D. (1970). Assessment of the efficiency of acaricides and their mode of application against the cattle tick (Boophilus microplus). *Australian Journal of Agricultural Research*, 21(6), 985-1006.