UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARA

EVALUACION DE COMPUESTOS NATURALES Y SINTETICOS CONTRA *Rhipicephalus microplus* (EFECTO ACARICIDA Y CITOTÓXICO)

por

Juan Carlos NOBOA BLANC y Facundo GOSLINO CHAIBÚN

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
2024

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de Grado aprobada por:

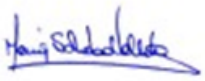
Presidente de Mesa:

Dr. Gonzalo Suárez

Segundo miembro (Tutor):

MSc. DCV. Leticia de Soto

Tercer miembro:



Dra. Soledad Valledor

Cuarto miembro (Co-tutor):

MSc. DCV. Tatiana Saporiti

Quinto miembro (Co-tutor):

PhD. Guzmán Álvarez

Fecha de aprobación: 22 de mayo, 2024
Autores:

Br. Juan Carlos Noboa Blanc

Br. Facundo Goslino Chaibún

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos con especial atención a nuestros familiares y amigos por el apoyo incondicional a lo largo de todos estos años, que fueron pilares para que esto hoy sea una realidad.

A la Dra. Tatiana Saporiti por la dedicación y el tiempo a lo largo de esta tesis.

También agradecer a la Tutora Dra. Leticia de Soto, Co-tutor Guzmán Alvarez, Dr. Jorge Gil, Dra. Florencia Puigvert.

A nuestras compañeras Maria Elisa Ferrari y Josefina Bentancur, por haber dedicado gran parte de su tiempo y esfuerzo compartiendo horas de estudio y experiencias.

Al laboratorio de la estación experimental “Dr. Mario A. Cassinoni” por brindarnos las instalaciones y recursos para realización de las técnicas de este trabajo.

También a todos los docentes que fueron parte de nuestra formación profesional.

TABLA DE CONTENIDO:

Página
PÁGINA DE APROBACIÓN 2
AGRADECIMIENTOS 3
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS 6
RESUMEN 7
SUMMARY 8
1. INTRODUCCIÓN..... 9
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA..... 10
2.1. CICLO DE VIDA 10
2.1.1. Fase parasitaria..... 11
2.1.2. Fase no parasitaria..... 11
2.2. IMPORTANCIA ECONOMICA Y SANITARIA 11
2.3. EPIDEMIOLOGÍA EN URUGUAY 13
2.4. NUEVAS HERRAMIENTAS EVALUADAS..... 14
3. HIPÓTESIS 18
4. OBJETIVOS 18
4.1. OBJETIVO GENERAL..... 18
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 18
5. MATERIALES Y MÉTODOS..... 19
5.1. DISEÑO EXPERIMENTAL 19
5.2. BIOENSAYOS 19
5.2.1. Obtención de las garrapatas 19
5.2.2. Sustancias evaluadas..... 20
5.2.3. Soluciones 20
5.2.4. Test de inmersión de larvas (Modificada de Castro Janer et al., 2012) 21
5.2.5. Test de inmersión de adultos (modificado de Drummond et al.,1973) 21
5.2.6. Evaluación de la Citotoxicidad en espermatozoide bovino (Ferraro, Corvo, Bergalli, Ilarraz, Cabrera, Gil… & Álvarez, 2020) 22
5.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO 22
6. RESULTADOS..... 23
6.1. Test de Inmersión de larvas y Test de Inmersión de Adultos 23
6.2. Citotoxicidad en esperma bovino..... 24

7. DISCUSIÓN ……..……..……25
8. CONCLUSIONES..... 27
9. BIBLIOGRAFÍA..... 28

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla No Página

Tabla 1. Evaluación de porcentaje de inhibición del crecimiento de cultivos de células de garrapata BME26 y células de mamíferos por extractos vegetales. 16

Tabla 2. Porcentaje de inhibición enzimática para las enzimas TIM y GST con los compuestos sintéticos. 17

Tabla 3. Resultados de resistencia de la población de campo utilizada para los ensayos de TIL y TIA brindados por el Laboratorio de estudios de sensibilidad a acaricidas en la garrapata común del ganado, Casa Universitaria Artigas, CENUR Litoral Norte……20

Tabla 4. TIL con extractos vegetales. % de mortalidad de cada tratamiento con sus respectivos controles negativos y sus repeticiones con la cepa Mozo 23

Tabla 5. Resultados del TIL de compuestos sintéticos por duplicado en la cepa Mozo……23

El compuesto sintético DM83 presentó una mortalidad dependiente del tratamiento en ambas repeticiones. Los demás compuestos sintéticos no presentaron mortalidad dependiente del tratamiento. 24

Tabla 6. Resultados del TIA en la cepa Mozo para aquellos compuestos que dieron resultados significativos en las tablas 3 y 4 24

Tabla 7. Resultados del TIL en poblaciones de campo para el compuesto T3 y T22 que dieron resultados significativos en las tablas 3 y 4 24

Figura No

Figura 1. Ciclo parasitario de *R. microplus*. Adaptado de Solari, M.A., Cuore, U., Trelles, A., Mautone, G. (2009). 10

Figura 2. Distribución de *R. microplus* en Uruguay (Miraballes & Riet Correa, 2018)……13

Figura 3. Generaciones de garrapatas durante el año (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, 2022) 14

RESUMEN

Los problemas generados en Uruguay por la garrapata *Rhipicephalus microplus* implican grandes pérdidas económicas debido a la muerte de animales, costos de tratamiento como también a la presencia de resistencia a muchos garrapaticidas utilizados en Uruguay. En este trabajo se evaluó el efecto garrapaticida de seis moléculas sintéticas brindadas por el Laboratorio de Moléculas Bioactivas del Centro Universitario Regional Litoral Norte, cede Paysandú y ocho extractos de plantas vegetales del sureste de México. Esta evaluación se realizó mediante el uso del Test de Inmersión de Larvas (TIL) y Test de Inmersión de Adultos (TIA). En primer lugar, se trabajó con la cepa susceptible Mozo, suministrada por el departamento de Parasitología de la División de Laboratorios Veterinarios de Montevideo (DILAVE), del Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (MGAP). Aquellos compuestos que demostraron actividad acaricida en esta cepa se evaluaron luego en una población de campo multirresistente. De los compuestos estudiados el DM83, T3 y T22 presentaron efecto garrapaticida al realizar el TIL en la cepa Mozo. Se evaluó la citotoxicidad en semen para el compuesto DM83 a 100 µM observándose una mortalidad de 33,1% y 35,6%.

SUMMARY

The problems that generates *Rhipicephalus microplus* tick in Uruguay imply great economic losses due to the death of animals, treatment costs as well as the presence of resistance to many tickicides used in Uruguay. This work evaluates the tickicide effect of six synthetic molecules provided by the Laboratory of Bioactive Molecules of the Centro Universitario Regional Litoral Norte, Paysandú and eight plant extracts from southeastern Mexico. This evaluation was carried out by using the Larval Inmersion Test (LIT) and the Adult Inmersion Test (AIT). Initially it was analyzed the Mozo susceptible strain, supplied by the Department of Parasitology of the Division of Veterinary Laboratories of Montevideo (DIVALE), of the Ministry of Livestock, Agriculture and Fisheries (MGAP). Those compounds which demonstrated tickiside effects with this strain were later evaluated with a multirresistant field population. Three of the compounds studied, DM83, T3 and T22, presented tickiside effect by using the LIT on the Mozo strain. Cytotoxicity was evaluated on sperm for the compound DM83 at 100µM observing a mortality of 33,1% y 35,6%.

1. INTRODUCCIÓN

Rhipicephalus microplus (*R. microplus*) es el ectoparásito que causa una de las parasitosis más importantes en el ganado vacuno en Uruguay. Ésta produce grandes pérdidas económicas en el sector, debido a los costos en los tratamientos y las muertes de los animales (Avila, 1998; Muzzio, 2006). Estas muertes pueden deberse a que es vector de dos enfermedades, anaplasmosis y babesiosis, producidas por *Anaplasma marginale, Babesia bigemina* y *Babesia bovis*, respectivamente. Estos hemoparásitos causan la tristeza parasitaria en Uruguay (Fiel & Nari, 2013). Dada la problemática que genera la garrapata *R. microplus* en Uruguay, se ha implementado una campaña sanitaria reglamentada por la Ley Nº18.268 (2008), teniendo como finalidad su control y erradicación. Sin embargo, el uso inadecuado de los diferentes grupos químicos garrapaticidas y el movimiento de ganado con garrapata, favorecieron la aparición de resistencia y la dispersión del ectoparásito dificultando cumplir con los fines dispuestos en la ley (Nari, Hansen, Eddi & Martins, 2000).

La resistencia es definida por la OMS (Organización Mundial de la Salud) como "…el desarrollo de la capacidad de una cepa de insectos a tolerar dosis de tóxicos que en la población normal de una misma especie resultaría letal para la mayoría de los individuos." (Brown & Pal, 1971). Por otro lado, la Organización de las naciones unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) la define como "…la reducción en la susceptibilidad de un parásito a determinado acaricida o insecticida cuando es usado a la concentración recomendada y de acuerdo con todas las indicaciones para su uso." (FAO, 2004). Para sortear la dificultad que plantea la resistencia es fundamental contar con nuevas herramientas. Es en este sentido que se han realizado diferentes estudios en busca de nuevos garrapaticidas contemplando a su vez que estos puedan generar mayor seguridad para la salud humana y el medio ambiente.

Se ha estudiado el efecto del cultivo de plantas repelentes (Castelblanco Sepúlveda, Sanabria Rodríguez, Cruz Carrillo & Rodríguez Molano, 2013), así como el control biológico por hongos entomopatógenos (Rodríguez, 2018) y bacterias con efecto garrapaticida (Samish & Rehacek, 1999). También se evaluaron los efectos ixodicidas e insecticidas de los extractos acuosos de semillas del género *Azadirachta indica* (nim) sobre garrapatas (Schwalbach, Greyling & David, 2003) y los efectos tóxicos de las plantas *Ambrosia cumanenses Kunth* (Altamisa), *Brugmasia arborea* (Floripondio), *Bidens pilosa* (Amor seco), *Sambucus nigra* (Sauco) y *Nicotiana tabacum* (Tabaco), sobre garrapatas adultas *R. microplus* (Castelblanco Sepúlveda et al., 2013).

Poder contar con un nuevo garrapaticida que logre un control eficaz y que a la vez considere la salud del operario y al medio ambiente, resulta muy importante para el país.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

En Uruguay se diagnosticaron cuatro géneros de garrapatas que parasitan al ganado bovino: *Amblyomma*, *Haemaphysalis, Ixodes y Rhipicephalus (Barrios & Bruzzone 2019),* esta última fue antes llamada *Boophilus microplus* (Beati & Keirans 2001).
Se conoce como garrapata del ganado al género y especie *Rhipicephalus microplus* (*R. microplus*), aunque estudios en Uruguay indican puede parasitar otras especies como el perro y el venado (Venzal, Castro, Cabrera, de Souza & Guglielmone, 2003).

2.1. CICLO DE VIDA

La garrapata *R. microplus* es un ectoparásito que tiene un ciclo monofásico teniendo al bovino como único hospedero especifico (Nuñez, Muñoz, & Moltedo, 1982). Su dinámica general es condicionada por factores que inciden en los distintos estadios del ciclo de vida: huevos, lavas, metalarvas, ninfas, metaninfas y adultos. Cada uno de estos estadios tendrán una dinámica específica que será afectada por factores externos e internos tales como el uso de garrapaticidas, la resistencia y la carga animal, que determinarán la tasa de encuentro y la epidemiología del parásito (Cardozo & Nari, 1986). Este ciclo de vida se compone de dos fases, una parasitaria y otra de vida libre.

Figura 1. Ciclo parasitario de *R. microplus*. Adaptado de Solari, M.A., Cuore, U., Trelles, A., Mautone, G. (2009).

2.1.1. Fase parasitaria

La fase parasitaria de *R. microplus* (Figura 1) tiene una duración de 22 dias aproximadamente. Este ciclo inicia cuando las larvas suben al animal con un tamaño entre 0,4 - 0,5mm, donde comienzan a alimentarse de su sangre. Esto les permite desarrollarse hasta la etapa de metalarva entre los días 3 a 4 del ciclo. En esta etapa, presenta una doble cutícula e inicia su primera muda. Al finalizar su primera muda comienza la etapa de ninfa que aparece al día 9 del ciclo, y posteriormente hacia el día 13 inicia la segunda muda. En ésta, comienza la etapa de metaninfa donde nuevamente cuenta con una doble cutícula. Esta doble cutícula que presentan tanto la metalarva como la metaninfa le otorga una mayor resistencia mecánica a la penetración de los garrapaticidas de inmersión o spray. Una vez culminada la segunda muda, la etapa de metaninfa da origen al adulto, observable a partir de los días 13 a 14 del ciclo (Fiel & Nari, 2013). Los machos adultos se diferencian a los 13 días y medio del ciclo y pueden vivir más de 40 días sobre el huésped, allí se alimentan y fecundan a las hembras. Como características morfológicas, presentan un apéndice caudal y su tamaño es más pequeño que la hembra. Por otro lado, las hembras neoginas se diferencian aproximadamente a los 14 días del ciclo. Comienzan su crecimiento hasta aumentar un 80% de su peso llegando al estadio de partenoginas, etapa que se da entre los días 17 a 18 del ciclo. Las hembras pueden ser fecundadas por el macho, o seguir evolucionando y morir en esta etapa. Las que son fecundadas pasan a la etapa de teleoginas, aproximadamente hacia el día 20 del ciclo y dada su condición, quedan completamente ingurgitadas y caen a la pastura siendo capaces de ovipositar. Desde el punto de vista epidemiológico, estas garrapatas presentan gran relevancia, dado que dan origen a una nueva generación de larvas infectantes (Cardozo & Nari, 1986; Fiel & Nari, 2013).

2.1.2. Fase no parasitaria

La fase no parasitaria tiene una duración máxima de 390 días (Cuore, 2019). Comienza luego de la caída de las teleoginas donde cada una tiene un potencial de postura entre 1000 y 4500 huevos, de los cuales eclosionan las larvas infectantes. La temperatura y humedad pueden afectar la fase no parasitaria observándose como resultado, que con una humedad relativa mayor a 80% y temperatura de 27ºC se acorta el intervalo entre generaciones a un período de dos meses (Cardozo & Nari, 1986; Fiel & Nari, 2013). Tanto las teleoginas al desprenderse del bovino, como sus huevos y larvas pueden ser afectadas por la radiación solar, heladas, desecación (FAO, 2004) e incluso por hongos entomopatógenos (Arguedas, Álvarez & Bonilla, 2008).

2.2. IMPORTANCIA ECONOMICA Y SANITARIA

R. microplus produce importantes pérdidas económicas que se estiman entre 32,8 y 46 millones de dólares anuales debido a los costos en tratamientos y las muertes de los animales (Avila, 1998; Muzzio, 2006). Esta parasitosis también produce pérdidas productivas por disminución en la ganancia de peso, mermas en la producción de leche y problemas reproductivos como abortos (FAO, 2004). Otro aspecto relevante, es su comportamiento como vector de tres hemoparásitos causantes de tristeza parasitaria; *Anaplasma marginale* (causante de anaplasmosis) y *Babesia bigemina* y

bovis (causantes de babesiosis) que son los causantes del 42% de las pérdidas económicas anuales (Fiel & Nari, 2013). Es por esto que en Uruguay se encuentra bajo campaña sanitaria, reglamentada mediante la Ley Nº18.268 (2008). Si bien con esta ley se apunta a controlar la parasitosis, sigue siendo hoy en día un desafío debido a la resistencia a los garrapaticidas químicos.
La resistencia es definida como un proceso natural, evolutivo y genético, que se transmite de generación en generación (Rosario Cruz & Domínguez García, 2016; Alonso Díaz, Rodríguez Vivas, Fragoso Sanches & Rosario Cruz, 2006). Este proceso se ha generado hace millones de años por la interacción de artrópodos herbívoros con plantas, lo que les ha permitido conservar en su genoma una ventaja evolutiva, por ejemplo la capacidad de generar enzimas hidrolizantes metabólicas que podrían evitar su muerte (Rosario Cruz & Domínguez García, 2016).

En Uruguay, la resistencia a los arsenicales se observó por primera vez en 1950 (Cardozo & Franchi, 1994). Años más tarde, en 1978 se diagnosticó resistencia a los organofosforados (Petraccia, Cardozo, Nari & Solari, 1983), y luego en 1994 a los piretroides y sus mezclas (Cardozo & Franchi, 1994). En 2006 se diagnosticó resistencia a los fenilpirazoles mediante una prueba de establo (Cuore, Trelles, Sanchis, Gayo & Solari, 2007) y más tarde por medio de bioensayos in vitro (Castro Janer, Rifran, González, Piaggio, Gil & Schumaker, 2010). En 2009 fue diagnosticada la resistencia a las amidinas (Cuore et al., 2012) y en el año 2010 se constató la resistencia a las Lactonas macrocíclicas (Castro-Janer et al. 2010; Cuore et al. 2012; Cuore, Acosta, Bermúdez, Da Silva, García, Perez Rama & Solari, 2015). El control de esta parasitosis se ha visto aún más desafiado con el diagnóstico de poblaciones multirresistentes en 2009 (Cuore et al. 2012; Cuore, Solari & Trelles, 2017). El uso indiscriminado de los diferentes grupos químicos de garrapaticidas, junto al movimiento de ganado con garrapata ha llevado al aumento en la dispersión de los ectoparásitos, así como también a la resistencia adquirida por estos (Nari, Hansen, Eddi & Martins, 2000).

El programa de erradicación y control de la campaña sanitaria en Uruguay se basa en la determinación de áreas infectadas, es decir aquellas áreas donde existe presencia del ectoparásito o de las enfermedades trasmitidas por el mismo. Así como también determina áreas en las que no existe presencia del ectoparásito ni de las enfermedades transmitidas por este, considerándolas áreas libres (Uruguay, 2008). Las áreas infestadas y áreas libres de garrapatas en nuestro país se observan en el siguiente mapa (Figura 2). Los puntos amarillos indican los establecimientos intervenidos por presencia de garrapatas, que se encontraban bajo control al momento de realizado el trabajo por Miraballes & Riet Correa, 2018. Esta situación es dinámica, por lo que puede haberse modificado.

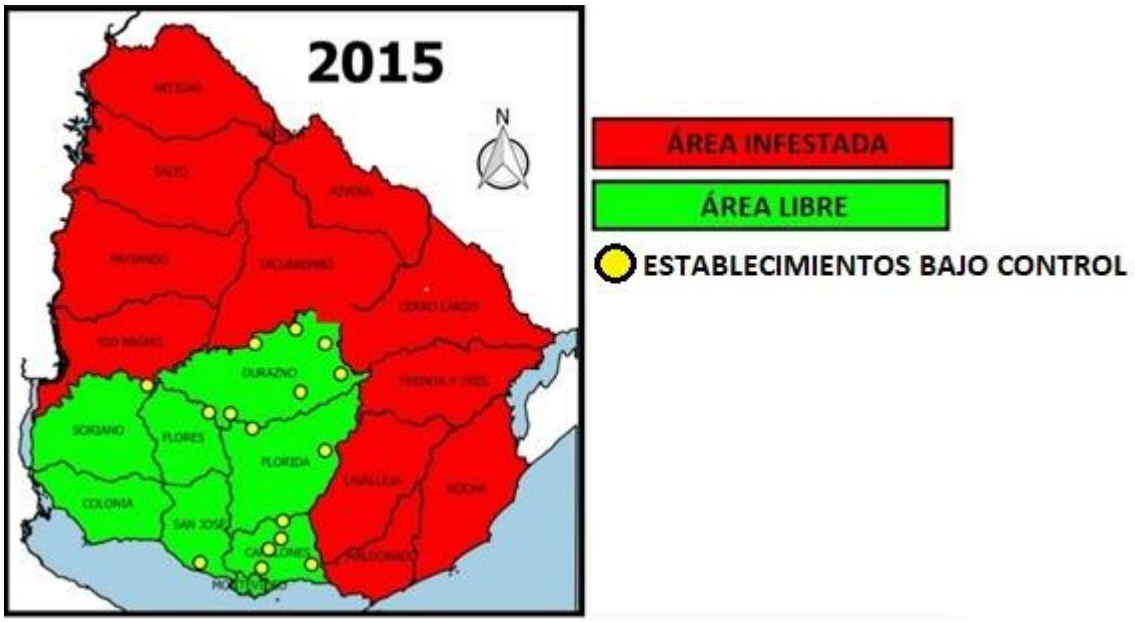


Figura 2. Distribución de *R. microplus* en Uruguay (Miraballes & Riet Correa, 2018).

2.3. EPIDEMIOLOGÍA EN URUGUAY

En Uruguay se estudió el comportamiento de las garrapatas, observándose que existen tres generaciones diferentes a lo largo del año (Figura 3), pudiendo variar por las condiciones climáticas de los distintos ecosistemas (Cuore, Solari, Cicero, Gayo, Nari & Trelles, 2020). Tambien se pueden observar variaciones en el número de garrapatas sobre el ganado, aumentando o disminuyendo en función de la estación del año (Nari, Cardozo, Berdié, Canabez & Bawden, 1979; Cardozo, Nari, Franchi, López & Donatti, 1984; Fiel & Nari, 1994; Sanchis, Cuore, Gayo, Silvestre, Invernizzi, Trelles & Solari, 2008, Cuore, Cardozo, Solari & Cicero, 2013; Cuore, 2019). La primera generación se desarrolla entre los meses de agosto a octubre a partir de las garrapatas caídas durante el otoño. Cuando ésta es acompañada de condiciones climáticas favorables para su desarrollo, se acortan las fases y aumenta la fertilidad (Cuore et al., 2013). La carga parasitaria oscila entre 2 y 4 garrapatas por animal aproximadamente (carga baja), pero en predios con resistencia a los diferentes acaricidas se han observado números mayores (Solari, Cuore, Trelles, Sanchis & Gayo, 2007; Cuore, Altuna, Cicero, Fernández, Luengo, Mendoza & Trelles, 2012). La segunda generación comienza en el mes de noviembre extendiéndose hasta diciembre, donde la carga parasitaria en el animal es mayor que en la generación anterior y las condiciones ambientales son aún más favorables para su desarrollo (Cuore et al., 2013). La última (tercera) generación sucede entre los meses de enero a mayo, presentando una mayor carga parasitaria que en las generaciones anteriores (Cuore & Solari, 2022). Debido a las condiciones climáticas, las garrapatas que caen en invierno a ovipositar tendrán menor viabilidad que las caídas en otoño (Cuore et al., 2013). Las larvas que surjan de esta generación serán las que darán comienzo a la primera generación del siguiente año (Cuore & Solari, 2022).

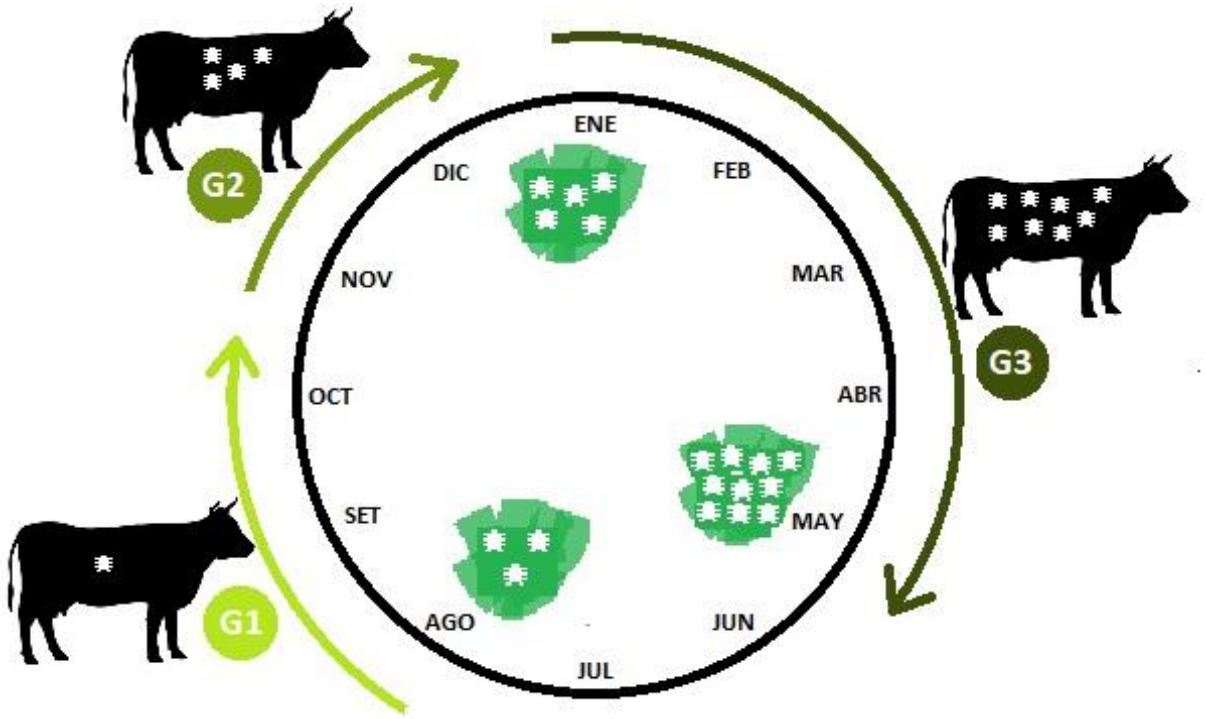


Figura 3. Generaciones de garrapatas durante el año. Adaptado de Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, 2022)

2.4. NUEVAS HERRAMIENTAS DE CONTROL EVALUADAS

Los garrapaticidas actúan produciendo alteración en la conducción nerviosa del parasito o inhibiendo la síntesis de quitina. Estos para ejercer su efecto, el parasito tiene que estar en contacto con el acaricida por medio de su pelo y piel, y los productos sistémicos cumplen su efecto cuando el parasito succiona sangre (Cuore & Solari 2022). Considerando esta definición, nosotros consideramos que una molécula tiene efecto garrapaticida cuando observemos: en el TIA que mate las larvas y en el TIA cuando mate las garrapatas adultas y también cuando afecte su viabilidad o su capacidad reproductiva. Se han realizado diferentes estudios en busca de nuevos garrapaticidas que a la vez contemplen una mayor seguridad para la salud humana y el medio ambiente. Uno de ellos estudia el efecto ixodicida de plantas, evaluado en garrapatas adultas mediante la prueba de inmersión. Ésta consiste en exponer garrapatas adultas a ixodicidas para evaluar mortalidad, medir índices de oviposición, eclosión de huevos y número de larvas emergidas (Castelblanco Sepúlveda et al., 2013). Utilizando extractos etanólicos puros de *Nicotiana tabacum*, *Ambrosia cumanensis y Brugmansia arborea*, se observaron resultados de hasta un 100% de mortalidad. Extractos de semilla de *Azadirachta indica (nim)* fueron probados en Cabras. Rociando una solución acuosa al 10% sobre los animales se observó que es eficaz en el control de garrapatas (Schwalbach, Greyling & David, 2003). El efecto ixodicida de plantas también ha sido evaluado mediante pruebas de inmersión de larvas (Weber Giordano, 2021).
Además, se evaluaron los hongos entomopatógenos como herramienta de control de esta parasitosis. Trabajos en Uruguay demostraron que el uso de hongos nativos mediante métodos de inmersión y aspersión en bovinos son capaces de generar la muerte de la garrapata. Esta tecnología demostró ser un método eficaz de bajo

costo para el control de la garrapata, generando así también la disminución del uso de plaguicidas (Rodríguez, 2018).
La acción de bacterias con efecto garrapaticida fue estudiada como método de control. En este sentido, se observó que *Rickettsia prowazeki*, es un microorganismo capaz de generar alteraciones en el comportamiento de las garrapatas debido a que produce interferencia en su desarrollo, cambios patológicos en su glándula salival, en tejidos ováricos y la muerte luego de infecciones severas. Se sugiere que la bacteria *Proteus mirabilis* podría ser utilizada como otro microorganismo capaz de generar un control biológico ya que causa la muerte de garrapatas adultas y puede causar anomalías o muerte de la generación siguiente a la garrapata infectada. Por último, la bacteria *Cedecea lapagei* es capaz de infectar la garrapata a través de las aberturas genitales evitando la postura de huevos (Samish & Rehacek, 1999).

Se considera una obligación científica y ética evaluar toxicológicamente todos aquellos productos que serán utilizados sobre animales antes de ingresarlos al mercado para poder evidenciar cualquier efecto adverso sobre las células. En este sentido se define citotoxicidad como la capacidad de algunas sustancias químicas o células mediadoras de destruir células vivas. Esto es un factor muy impórtate a evaluar. (Celik, 2018). Uno de los métodos factibles para analizar citotoxicidad en células vivas de animales es haciendo uso de espermatozoides (Dominguez, Tamayo, Pérez, Salas, Pérez & Baptista, 2009).

En Uruguay, el Laboratorio de Moléculas Bioactivas del Centro Universitario Regional Litoral Norte (UdelaR) viene trabajando tanto en el uso de compuestos sintéticos, así como también con extractos vegetales, evaluando su posible acción garrapaticida. Mediante el uso de extractos vegetales se han obtenido muy buenos resultados de inhibición del crecimiento de células embrionarias de *R. microplus*, de la línea celular BME26 (Tabla 1).

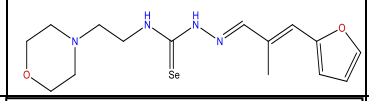
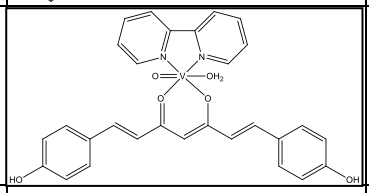
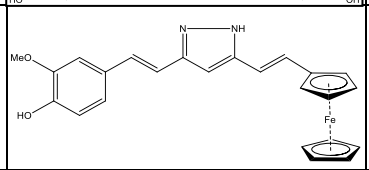
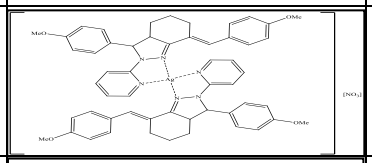
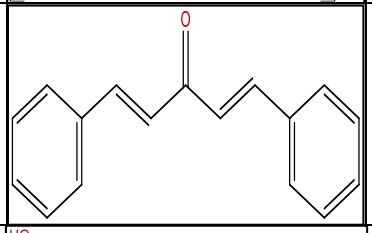
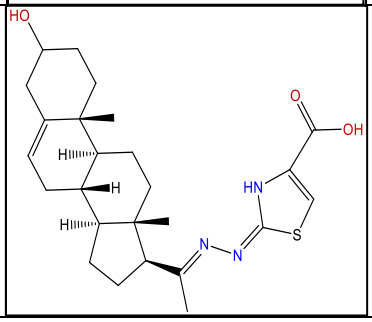
Tabla 1. Evaluación de porcentaje de inhibición del crecimiento de cultivos de células de garrapata BME26 y células de mamíferos por extractos vegetales.

Código de colección	Nombre científico (Nombre maya), Tejidos empleados, Disolvente	% de inhibición de crecimiento BME26 a 100ug/ml	% de inhibición en células de mamífero a 100 ug/ml	Visualización de la planta
T2	*Leucaena leucocephala* (Huachi), hojas y ramas, MeOH	70	80	
T8	*Leucaena leucocephala* (Huachi), hojas y ramas,CH_2Cl_2	72	80	
T3	*Cnidoscolus chayamansa* (Chaya), hojas, MeOH	63	25	
T4	*Cnidoscolus chayamansa* (Chaya), hojas, CH_2Cl_2	100	75	
T15	*Ambrosia hispida* (k'an lool xiiw), hojas y ramas, MeOH	93	nd	
T26	*Ambrosia hispida* (k'an lool xiiw), hojas y ranas, CH_2Cl_2	47	nd	
T22	*Cecropia obtusifolia* (Guarumbo), hojas, CH_2Cl_2	100	0	
T44	*Ruellia nudiflora (Engelm. & A. Gray) (Urb.* xana mukuy), hojas y ramas, MeOH	100	nd	

nd= no hay datos.

Por otro lado, los compuestos sintéticos fueron analizados como inhibidores de la enzima Triosa fosfato isomerasa (TIM) y Glutation-s-transferasa (GST), ambas enzimas claves en procesos metabólicos de la garrapata (Tabla 2). La TIM se encuentra asociada a la glucólisis y la gluconeogénesis al catalizar la interconversión entre el gliceraldehído 3- fosfato y el dihidroxiacetona fosfato y ha sido utilizada como diana en el desarrollo de fármacos para endoparásitos (Moraes, Arreola, Cabrera, Saramago, Freitas, Masuda & Logullo, 2011). La GST participa en procesos antioxidantes, así como en la desintoxicación celular, actúa en las rutas de excreción de sustancias endo y xenobióticas protegiendo las células de la toxicidad química y el estrés en diferentes tejidos, como en ovarios y glándula salival de hembras adultas (De Freitas, Vaz Junior & Masuda, 2008).

Tabla 2. Porcentaje de inhibición enzimática para las enzimas TIM y GST con los compuestos sintéticos.

Código de colección	Estructura molecular	% inhibición de actividad TIM a 25 µM	Actividad inhibitoria en GST
1378		77,8	nd
CUR 2		66,1	nd
MAR 106		78,8	nd
DM83		98,2	nd
794		nd	IC_{50}=7.0 ± 1.1 µM
1258		nd	IC_{50}=9.0 ± 0.3 µM

Nd= significa que no hay datos.

Debido a las dificultades planteadas en el control de este ectoparásito en Uruguay, así como las grandes pérdidas que genera a nivel país, es imperioso encontrar nuevas herramientas de control. En este sentido, los resultados preliminares obtenidos por el Laboratorio de Moléculas Bioactivas del Centro Universitario Regional Litoral Norte (UdelaR), utilizando tanto extractos vegetales como compuestos sintéticos, resultan muy prometedores. Por lo tanto, es necesario avanzar en el estudio de estos nuevos compuestos, naturales y sintéticos, y su efecto sobre el parásito vivo. Esto nos permitiría avanzar en la búsqueda de nuevas alternativas de control de esta parasitosis.

3. HIPÓTESIS

a) Los compuestos en estudio (sintéticos y extractos vegetales) que fueron tóxicos para las células de la garrapata en cultivo y demostraron inhibición de la actividad enzimática, presentan actividad garrapaticida, evaluada mediante el test de inmersión de larvas y adultos en garrapatas *R. microplus*.

b) Los compuestos que tienen mayor actividad garrapaticida observada en ambos tests de inmersión (TIL y TIA), no poseen citotoxicidad en células de mamíferos.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL:

Evaluar el efecto garrapaticida en muestras de compuestos sintéticos y extractos vegetales por medio de bioensayos in vitro, en garrapatas *R. microplus*.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

a) Evaluar el efecto garrapaticida de 6 compuestos sintéticos y 8 extractos vegetales mediante el test de inmersión de larvas (TIL) in vitro con la cepa Mozo.
b) Evaluar el efecto garrapaticida de aquellos compuestos sintéticos y extractos vegetales que hayan demostrado tener un efecto garrapaticida con el TIL mediante el test de inmersión de adultos (TIA) in vitro con la cepa Mozo.
c) Evaluar el efecto garrapaticida de aquellos compuestos sintéticos y extractos vegetales que hayan demostrado efecto garrapaticida en la cepa Mozo en los ensayos previos, en poblaciones de campo multirresistente en bioensayos in vitro mediante TIL.
d) Evaluar in vitro la citotoxicidad del compuesto sintético o extracto vegetal que tenga mayor efecto garrapaticida utilizando semen bovino.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se seleccionaron seis moléculas sintéticas que presentaron inhibición de las enzimas TIM y GST, ambas de *R. microplus*. También se seleccionaron ocho extractos vegetales que contaban con efecto citotóxico frente a cultivos de células de *R. microplus* BME26 (Saramago, Gomes, Aguilera, Cerecetto, González, Cabrera… & Álvarez, 2018), para ser evaluados con la técnica de test de inmersión de larvas (TIL) (Modificada de Castro Janer, Schumaker, Klafke, Rifran, González, Niell & Miller, 2012). Luego los compuestos sintéticos y vegetales que tuvieron un efecto garrapaticida con el TIL se evaluaron con el test de inmersión de adultos (TIA) (modificado de Drummond, Ernst, Trevino, Gladney & Graham, 1973).
Para realizar estos bioensayos se utilizaron ejemplares de larvas y adultos de garrapatas de la cepa Mozo, susceptible a todos los grupos químicos de acaricidas habilitados en Uruguay. Aquellas moléculas que demostraron tener un efecto acaricida con esta cepa en el TIL y/o el TIA se evaluaron nuevamente con una población de campo multirresistente mediante TIL. Una vez obtenidos los resultados se realizó un estudio citotóxico en semen con aquella molécula que presentó el mayor efecto acaricida con cualquiera de las dos técnicas utilizadas.

5.2. BIOENSAYOS

5.2.1. Obtención de las garrapatas

El departamento de Parasitología de la División de Laboratorios Veterinarios (DILAVE), Montevideo, aportó la cepa Mozo (tanto adultas como larvas). La obtención de la población de campo se realizó a través de un muestreo en un establecimiento voluntario ubicado en el departamento de Artigas.Esta población de campo cuenta con estudios de resistencia realizados previamente, describiéndola como una población multiresistente.

Tabla 3. Resultados de resistencia de la población de campo utilizada para los ensayos de TIL y TIA brindados por el Laboratorio de estudios de sensibilidad a acaricidas en la garrapata común del ganado, Casa Universitaria Artigas, CENUR Litoral Norte.

	Principio activo	% Resistencia
TPL	CIPERMETRINA	29,63768116
	ETHION	0
	AMITRAZ	0
	FIPRONIL	1,409569188
	IVERMETCINA	1,282051282

	Principio activo	% 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.

5.2.2. Sustancias evaluadas

Los extractos vegetales utilizados fueron extraídos de plantas medicinales, estos y los compuestos sintéticos fueron cedidos por el Laboratorio de Moléculas Bioactivas del Centro Universitario Regional Litoral Norte sede Paysandú.

5.2.3. Soluciones

Los diferentes compuestos sintéticos y extractos vegetales se diluyeron en dimetilsulfóxido (DMSO) y se llevaron a las siguientes concentraciones:

- Compuestos sintéticos a 3mM sin pasar el 15% v/v de DMSO en agua para la solución final.
- Extractos vegetales a 1mg/ml sin pasar el 15% v/v de DMSO en agua para la solución final.

Se utilizó DMSO al 15% v/v en agua como control negativo para ambos test. Como control positivo para el TIA se utilizó AMITRAZ (Acarmic, Laboratorio Microsules) al 0,85 mM (concentración recomendada para baño). Para realizar el TIL se utilizó Ivermectina (Sanimax, Laboratorio Adler) como control positivo a 0,082mM, concentración letal 99,9% establecida por Castro Janer et al., 2012.

5.2.4. Test de inmersión de larvas (modificada de Castro Janer et al., 2012)

Se colocaron teleoginas en una incubadora a una temperatura de aproximadamente 27- 28ºC y humedad de 85-90%. Pasadas dos semanas, los huevos obtenidos se colocaron en tubos con algodón humedecido y comprimido al fondo de estos y luego se taparon con una torunda de algodón. Una vez eclosionados, las larvas obtenidas debieron tener entre 14 y 21 días de eclosión para poder ser utilizadas en el test.
Finalizada esta etapa, se colocó 1mL de solución en tubos eppendorf realizando un duplicado para cada uno de los compuestos. El tubo que contenía las larvas se colocó de forma vertical con el extremo abierto hacia arriba y se extrajeron de su superficie las larvas que fueron entonces consideradas viables por haber logrado subir. Se colocaron 100 larvas aproximadamente en cada tubo con 1mL de solución, con el fin de que las larvas quedaran sumergidas durante un período de 10 minutos. Finalizado este período se las extrajo y se las colocó en un sobre formado de papel filtro Whatman Nº1 de 7,5 x 8,5 cm, el cual fue rotulado indicando el nombre de la solución, doblado al medio por su mayor largo y cerrado con clips bull dog. Para cada solución evaluada se realizaron dos sobres. Luego se los incubó en las condiciones anteriormente descriptas por un periodo de 24 horas. Pasado este tiempo se los abrió y se realizó un conteo de larvas vivas y muertas de cada uno de los sobres, para evaluar el porcentaje de mortalidad de cada solución considerándolo el porcentaje de control.

5.2.5. Test de inmersión de adultos (modificado de Drummond et al.,1973)

Se utilizaron garrapatas en etapa de teleoginas (GT), preseleccionadas, para asegurar su viabilidad. En la preselección se tuvo en cuenta la forma uniforme y simétrica, un tamaño mayor a 8 milímetros, de color marrón, sin coloraciones amarillas, negras, blancas o rojas y además se evalúo su capacidad de movimiento. Se colocaron 10 GT en un tubo tipo falcón de 50mL, conteniendo 10mL de solución con compuestos o control (según se mencionó anteriormente) durante un periodo de tiempo de 30 minutos. Pasado este tiempo, las diez garrapatas sumergidas se extrajeron y fueron secadas suavemente con un papel absorbente. Luego, se pesaron de forma individual y se transfirieron a tubos tipo falcón de 15ml rotulados según el compuesto utilizado y las garrapatas correspondientes (cepa Mozo), así como el control para cada caso. Posteriormente se adicionó un algodón humedecido con agua destilada de unos 0,5 cm de diámetro y se tapó. Los tubos fueron incubados a una temperatura aproximada de 27- 28ºC, con una humedad relativa de 85 a 90% por un período de tiempo de 14 días. Terminado este período se extrajeron los tubos en los cuales había una garrapata por cada uno de ellos y los huevos obtenidos de cada teleogina, se pesaron e incubaron nuevamente durante treinta días. Pasado este tiempo, se registró visualmente el % de eclosión.

En este test se realizó el cálculo de la reproducción estimada y el porcentaje de control.

- Reproducción estimada (RE) = (peso de huevos/ peso de teleogina) x el porcentaje de eclosión x 2000.
- % de control = [(RE de teleoginas control- RE de teleoginas tratadas) / RE control] x 100.

5.2.6. Evaluación de la Citotoxicidad en espermatozoide bovino (Ferraro, Corvo, Bergalli, Ilarraz, Cabrera, Gil… & Álvarez, 2020)

Se usaron dosis comerciales de semen congelado de un toro Hereford (Gensur Ltda, Montevideo). Las dosis estaban congeladas en pajuelas de 0,5mL en un diluyente en base a TRIS-citrato-fructuosa con 20% de yema de huevo (TRILADYL, Minitube, Alemania). Al momento de utilizarlas, se descongelaron dos pajuelas a 37°C durante 40 segundos y se formó un pool con ambas. Luego se ajustó la concentración con PBS pH 7,4 a 40 millones de espermatozoides por mL. De dicho pool ajustado se tomaron alícuotas de 50µL y se agregó 50µL del compuesto diluido a 100µM o con DMSO al 1 % v/v en el control. Cada concentración se incubó, por duplicado en placas de 96 pocillos incluidos los controles, a 37°C durante un período de 30 minutos con agitación moderada. El análisis de motilidad se realizó visualmente, con un Microscopio Olympus BX 41 (Olympus, Japón) equipado con una platina caliente a 37 °C. Cada una de las muestras tuvo 10µL y se colocaron en una cámara de conteo de Makler (profundidad 10µm, Sefi-Medical Instruments, Israel).
Se filmaron cuatro campos microscópicos para cada muestra duplicada y en modo “play-back” se realizó visualmente el conteo de espermatozoides vivos (spzv) y muertos (spzm) 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, es decir que son capaces de progresar en su avance, sin moverse en círculos.
-% citotoxicidad del compuesto DM83 = [(número de células relativas del control - número de células relativas del DM83) *100] / número de células relativas del control

5.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para evaluar si estos compuestos utilizados presentan algún efecto acaricida utilizando el TIL, se realizó un test de Chi cuadrado evaluando la dependencia de las variables mortalidad *vs.* tratamiento (significancia con un valor $p \leq 0,05$). Para evaluar los resultados obtenidos de citotoxicidad, se realizó un test de Chi cuadrado evaluando la dependencia de las variables tratamiento *vs.* mortalidad (significancia con un valor $p \leq 0,05$). Para el análisis estadístico se utilizó el software RStudio (Paquete Rcmdr).

6. RESULTADOS

6.1. Test de Inmersión de larvas y Test de Inmersión de Adultos

Se exhiben los resultados del TIL sobre cepa Mozo y poblaciones de campo. Se comparan % de mortalidad de cada tratamiento con sus respectivos controles negativos y sus repeticiones destacando con el superíndice a aquellos valores de mortalidad que demostraron una dependencia del tratamiento usado. (Tabla 4 y 5).

Tabla 4. TIL con extractos vegetales. % de mortalidad de cada tratamiento con sus respectivos controles negativos y sus repeticiones con la cepa Mozo

Compuestos	**%Mortalidad**	
	Repetición 1	**Repetición 2**
control+	100	100
control-	0[a]	0[a]
T3	17,9[b]	13,2[b]
T4	1,4[a]	2[a]
T8	0[a]	1,9[a]
T15	0[a]	1,6[a]
26	2,2[a]	1,2[a]
T22	7,5[b]	2[b]
T44	3,7[a]	2,6[a]
T2	8,5[b]	2,6[a]

[a] valor de p superior a 0,05 [b] valor de *p* inferior a 0,05.

Las garrapatas presentaron una mortalidad dependiente del tratamiento al utilizarse los compuestos vegetales T3 y T22. Con el compuesto T2 se presentó una dependencia entre mortalidad *vs.* tratamiento solo en una repetición. Los demás compuestos vegetales no presentaron una mortalidad dependiente del tratamiento, en ninguna de las repeticiones.

Tabla 5. Resultados del TIL de compuestos sintéticos por duplicado en la cepa Mozo

Compuestos	**%Mortalidad**	
	Repetición 1	**Repetición 2**
control+	100	100
control-	0[a]	0[a]
794	5,1[a]	3,3[a]
1258	1,1[a]	1,6[a]
1378	6,9[a]	0[a]
DM83	44,3[b]	43,6[b]
CUR2	1,6[a]	4,1[a]
MAR106	2,1[a]	4,1[a]

[a] valor de p superior a 0,05 [b] valor de *p* inferior a 0,05.

El compuesto sintético DM83 presentó una mortalidad dependiente del tratamiento en ambas repeticiones. Los demás compuestos sintéticos no presentaron mortalidad dependiente del tratamiento.

Tabla 6. Resultados del TIA en la cepa Mozo para aquellos compuestos que dieron resultados significativos en las tablas 3 y 4

Compuestos	**% Control por repetición**									
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**
T3	54,3	0	82,9	57,9	60,9	72,1	69,6	0	39,8	43,5
T22	25,3	0	0	49	0	2,2	-	-	-	-
DM83	72,4	75,4	41,4	36,1	27,6	28,6	11,9	-	-	-

Para los tres compuestos evaluados por el TIA, la tabla 5 muestra que el porcentaje de control es muy variable entre las repeticiones de un mismo compuesto.

Tabla 7. Resultados del TIL en poblaciones de campo para el compuesto T3 y T22 que dieron resultados significativos en las tablas 3 y 4

Compuestos	**% de mortalidad**	
	Repetición 1	**Repetición 2**
control +	100	100
control -	0[a]	3 [a]
T3	0 [a]	0 [a]
T22	2,3[b]	1,3 [a]

En esta tabla se observa una dependencia entre las variables mortalidad y tratamiento solo en la repetición 1 del compuesto T22.

6.2. Citotoxicidad en esperma bovino

Al analizar el compuesto DM83 en esperma bovino a una concentración de 100 µM en ambas repeticiones, se obtuvo como resultado una mortalidad de 33,1% y 35,6% para cada una de las repeticiones. Mediante el test de Chi cuadrado se comprobó una dependencia entre las variables mortalidad *vs.* tratamiento (valor $p \leq 0,05$).

7. DISCUSIÓN

Las dos técnicas utilizadas TIL y TIA, demostraron que algunos compuestos afectaron la viabilidad de las garrapatas.

En el TIL el compuesto T2 presentó diferencia significativa con el control en solo una repetición. Esto puede deberse a que la cantidad de compuesto que penetra en cada garrapata podría no ser la misma por tratarse de una técnica de inmersión que no permite asegurar una dosis absorbida por cada larva. La dificultad que existe en obtener una solución homogénea también podría ser responsable de generar una diferencia en esta absorción (Scoralik, Daemon, de Oliveira Monteiro & Maturano, 2012; Cheng, Fan, Zhao, Li, Li, Zhang… & Tian, 2020).

Los resultados observados en el TIL en la cepa Mozo demostraron en los compuestos T3, T22 y DM83 que la mortalidad fue dependiente del tratamiento en ambas réplicas. Los resultados obtenidos con estos compuestos en el TIA en la cepa Mozo muestran que los porcentajes de control presentan una gran dispersión dentro de cada compuesto. Esta diferencia podría explicarse también porque no se sabe cuánto compuesto penetró en cada garrapata ya sea por la variabilidad individual o por una falla en la suspensión o solución lograda. Si bien se han cuestionado el uso de las técnicas de inmersión (Jonsson & Hope, 2007), y particularmente en este trabajo los resultados obtenidos no tienen buena repetibilidad, siguen siendo buenas herramientas de evaluación de moléculas. El TIL tiene algunas ventajas por las cuales se utiliza, es una técnica de bajo costo, fácil de realizar (Amaral, 1993) y también permite evaluar un mayor número de individuos por repetición. Por otro lado, el TIA permite evaluar otro estadío del parásito y la RE. Estos problemas de absorción se podrían solucionar cambiando la técnica utilizada por el ensayo de alimentación artificial que permite administrar de forma precisa la dosis de la sustancia a evaluar (Alzugaray, 2017).
De los compuestos analizados en el TIL con la cepa Mozo, el DM83 tuvo el mayor porcentaje de mortalidad, 43,9% (promedio entre las dos repeticiones). A su vez, este compuesto fue el que presentó el mayor porcentaje de inhibición de la enzima TIM (tabla 2). Al utilizarlo en el TIA en cepa Mozo presentó una gran dispersión en el porcentaje de control que va de 11,9% a 75,4%, lo que amerita a continuar su evaluación. Para el compuesto T22 se observa que, si bien demostró una dependencia entre las variables mortalidad vs. tratamiento con el TIL, los porcentajes de mortalidad no son altos y al evaluarlo con el TIA los porcentajes de control nunca superan al 50%. Esto puede deberse a que el compuesto puede ser efectivo en un solo estadio de la garrapata (Bravo et al., 2008). Otra razón que podría explicar el comportamiento del T22 al evaluarse con el TIA es el bajo número de individuos que pueden evaluarse mediante esta técnica, pudiendo no ser representativo.

De los dos compuestos T3 y T22 que se pudieron analizar sobre la cepa de campo, solo el T22 demostró dependencia entre las variables mortalidad *vs.* tratamiento, esto se observó solo en una de las repeticiones. Además de la variabilidad individual y de una probable falla en la suspensión o solución del compuesto, otro factor que puede explicar por qué los compuestos no demostraron dependencia entre las variables mortalidad *vs.* tratamiento puede ser la multirresistencia de la población de campo que se puede observar en la tabla 3.

La multirresistencia es la capacidad de adquirir diferentes mecanismos que le permitan al parásito resistir a diferentes clases de acaricidas, no relacionados químicamente, (Cuore et al., 2017). Ya que esta población cuenta con diferentes mecanismos de resistencia, podría significar una resistencia cruzada de la población de campo entre alguna de las moléculas para las cuales es resistente y uno de los compuestos evaluados en este trabajo. La resistencia cruzada se explica cuando dos o más principios activos comparten un mismo mecanismo o sitio de acción por lo que sufren un similar mecanismo de resistencia, lo cual generaría que la resistencia a uno de estos principios activos afecte también a los demás, determinando que no sean eficaces (Roush, 1993).

Para confirmar la eficacia de estos compuestos se recomendaría analizarlos con otra técnica y así descartar cualquier variabilidad asociada a la técnica utilizada.
Durante el análisis cuantitativo de la citotoxicidad del compuesto DM83 en espermatozoides, se pudo observar visualmente en los videos que efectivamente existía una respuesta citotóxica de acuerdo a los parámetros establecidos. Estos hallazgos indican que el compuesto DM83 afecta la viabilidad de los espermatozoides bajo las condiciones evaluadas. Esto podría tener consecuencias significativas en términos de fertilidad y capacidad reproductiva. Es importante destacar que este análisis se basa en la observación visual de los videos, por lo que sería necesario llevar a cabo estudios adicionales para confirmar estos resultados y determinar con precisión el grado de citotoxicidad inducido por el compuesto DM83.

8. CONCLUSIONES

De los compuestos naturales y sintéticos analizados, que provocaron toxicidad para las células de la garrapata en cultivo e inhibieron la actividad enzimática. Solo tres (T3, T22 y DM83) tuvieron efecto garrapaticida evaluado mediante el TIL en la cepa Mozo.

T3 y DM83 presentaron buenos porcentajes de control en el TIA sobre cepa Mozo. Sin embargo, las evaluaciones del compuesto T3 y T22 en una población de campo multirresistente no lograron los resultados esperados.

En los ensayos in vitro de citotoxicidad del compuesto DM83, observamos que al realizar el análisis estadístico presentó una clara dependencia entre la variable mortalidad *vs.* tratamiento, indicando que el compuesto a una concentración de 100µM genera una capacidad citotóxica frente a espermatozoides, lo que no implica que este compuesto sea tóxico para bovinos, para confirmar esto último se requeriría de seguir realizando otros estudios.

9. BIBLIOGRAFÍA

Alonso Díaz, M. A., Rodríguez Vivas, R. I., Fragoso Sánchez, H., & Rosario Cruz, R. (2006). Resistencia de la garrapata Boophilus microplus a los ixodicidas. *Archivos de Medicina Veterinaria*, *38*(2), 105-113.

Alzugaray Gastellú, M.A. (2017) Caracterización molecular y funcional de Bm05br de la garrapata Rhipicephalus (Boophilus) microplus y su potencial uso para el desarrollo de vacunas (Tesis Doctorado). Facultad de Ciencias, UDELAR, Uruguay.

Amaral, N. (1993). Guidelines for the evaluation of ixodicides against. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, *2*(2), 144-151.

Arguedas, M., Álvarez, V., & Bonilla, R. (2008). Eficacia del hongo entomopatógeno" Metharrizium anisopliae" en el control de" Boophilus microplus"(Acari: ixodidae). *Agronomía Costarricense: Revista de Ciencias Agrícolas*, *32*(2), 137-147.

Avila, D. (1998). *Análisis cuantitativo de los costos a nivel País y del productor por la presencia de la garrapata en el Uruguay* (Informe). Montevideo: IAEA-DILAVE-MGAP.

Barrios Inthamoussu, M., & Bruzzone González, L. (2019). *Situación de la garrapata del ganado Rhipicephalus microplus en Uruguay y estudio de diferentes planes de saneamiento en Lavalleja y Rocha* (Tesis de grado). Facultad de Veterinaria, Udelar, Montevideo.

Beati, L., & Keirans, J. E. (2001). Analysis of the systematic relationships among ticks of the genera Rhipicephalus and Boophilus (Acari: Ixodidae) based on mitochondrial 12S ribosomal DNA gene sequences and morphological characters. *Journal of Parasitology*, *87*(1), 32-48.

Bravo, M. J., Coronado, A., & Henríquez, H. (2008). Susceptibilidad de larvas y adultos de Boophilus microplus al ixodicida coumafos en explotaciones lecheras del estado Lara, Venezuela. *Zootecnia Tropical*, *26*(1), 41-46.

Brown, A. W. A., & Pal, R. (1971). *Insecticide resistance in arthropods* (2ª ed.). Geneva: World Health Organization. Recuperado de https://apps.who.int/iris/handle/10665/41685

Cardozo, H., Nari, A., Franchi, M., López, A., & 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., & Franchi, M. (1994). Epidemiología y Control de Boophilus microplus. En A. Nari & C. Fiel (Eds.), *Enfermedades parasitarias de importancia económica en Bovinos, Bases epidemiológicas para su prevención y control* (pp.369-407). Montevideo: Hemisferio Sur.

Cardozo, H., & Nari, A. (1986). Factores epidemiológicos en el control de Boophilus microplus. En Centro Médico Veterinario de Paysandú (Ed.), *Jornadas*

Uruguayas de Buiatría (Vol. XIV, pp. L1-L7). Paysandú: Centro Médico Veterinario de Paysandú.

Castelblanco Sepúlveda, L., Sanabria Rodríguez, O. J., Cruz Carrillo, A., & Rodríguez Molano, C. E. (2013). Reporte preliminar del efecto ixodicida de extractos de algunas plantas sobre garrapatas Boophilus microplus. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, *18*(1), 118-130.

Castro Janer, E., Rifran, L., González, P., Piaggio, J., Gil, A., & Schumaker, T. T. S. (2010). Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Acari: Ixodidae) resistance to fipronil in Uruguay evaluated by in vitro bioassays. *Veterinary Parasitology*, *169*(1-2), 172-177.

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. Montevideo: INIA. Recuperado de http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/2830/1/18429230712114518.pdf

Çelik, T. A. (2018). Introductory Chapter: Cytotoxicity. En *Cytotoxicity* (pp. 3-6). London: IntechOpen.

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.

Cuore, U. (2016). Estado de la resistencia a los Garrapaticidas en Uruguay. En Centro Médico Veterinario de Paysandú (Ed.), *Jornadas Uruguayas de Buiatría* (Vol. XLIV, pp,106-115). Paysandú: Centro Médico Veterinario de Paysandú.

Cuore, U. (2019). *Control sustentable de parásitos en condiciones de silvopastoreo con énfasis en garrapata Rhipicephalus (Boophilus) microplus y hemoparásitos*. Montevideo: INIA. Recuperado de https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/sites/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/files/documentos/publicaciones/inia-fpta-80-proyecto-338-2019_compressed.pdf

Cuore, U., Acosta, W., Bermúdez, F., Da Silva, O., García, I., Pérez Rama, R., ... Solari, M. A. (2015). Tick generational treatment. Implementation of a methodology to erradicate Rhipicephalus (Boophilus) microplus tick resistant to macrocyclic lactones in a population management. *Veterinaria (Montevideo)*, *51*(198), 2-2.

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., & Cicero, L. (2013). Epidemiologia y control de la garrapata Rhipicephalus (Boophilus) microplus. En C. Fiel & A. Nari.

Enfermedades parasitarias de importancia clínica y productiva en rumiantes (pp. 457-484) Montevideo: Hemisferio Sur.

Cuore, U., Solari, M. A., Cicero, L., Gayo, V., Nari, A., & Trelles, A. (2020). Tratamiento generacional de la garrapata. Veterinaria (Montevideo).

Cuore, U., Solari, M. A., & 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), 2-2.

Cuore, U., Trelles, A., Sanchis, J., Gayo, V., & 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., & 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

De Freitas, D. R., Vaz Junior, I. D. S., & Masuda, A. (2008). Expressão e atividade enzimática de glutationa s-transferase em tecidos de fêmeas de Boophilus microplus. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, *17*, 99-104.

Domínguez, A., Tamayo, M., Pérez, I. Y., Salas, H., Pérez, O., & Batista, A. (2009). Evaluación citotóxica y genotóxica del adyuvante AFCo1 por el ensayo de morfología de la cabeza del espermatozoide en ratón NMRI. *VacciMonitor*, 18(3), 13-17.

Drummond, R. O., Ernst, S. E., Trevino, J. L., Gladney, W. J., & Graham, O. H. (1973). Boophilus annulatus and B. microplus: laboratory tests of insecticides*. Journal of Economic Entomology*, *66*(1), 130-133.

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.

Fiel, C., & Nari, A. (1994). *Enfermedades Parasitarias de Importancia económica en bovinos, bases epidemiológicas para su prevención y control en Argentina y Uruguay.* Montevideo: Hemisferio Sur.

Fiel, C., & Nari, A. (2013). *Enfermedades parasitarias de importancia clínica y productiva en rumiantes: fundamentos epidemiológicos para su diagnóstico y control*. Montevideo: Hemisferio Sur.

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/

Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. (2022). *Comenzó la lucha contra la garrapata: temporada 2022-2023.* Recuperado de http://www.inia.uy/investigaci%C3%B3n-e-innovaci%C3%B3n/plataformas/Plataforma-de-Salud-Animal-/Comenzo-la-lucha-contra-la-garrapata-temporada-2022-2023

Jonsson, N. N., & 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.

Klafke, G.M., Sabatini, G.A., de Albuquerque, T.A., Martins, J.R., Kemp, D.H., Miller, R.J., y Schumaker, T.T. (2006). Pruebas de inmersión de larvas con ivermectina en poblaciones de la garrapata bovina Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Acari: Ixodidae) del Estado de Sao Paulo, Brasil. *Parasitología veterinaria*, 142(3-4), 386-390.

Miraballes, C., & Riet Correa, F. (2018). A review of the history of research and control of Rhipicephalus (Boophilus) microplus, babesiosis and anaplasmosis in Uruguay. *Experimental and Applied Acarology*, 75(4),383-398.

Moraes, J., Arreola, R., Cabrera, N., Saramago, L., Freitas, D., Masuda, A., ... Logullo, C. (2011). Structural and biochemical characterization of a recombinant triosephosphate isomerase from Rhipicephalus (Boophilus) microplus. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *41*(6), 400-409.

Muzzio, F. (2006, noviembre). Programa de la lucha contra la garrapata. En *I Seminario Taller Aportes a la lucha contra la garrapata*. FAO, Durazno.

Nari, A., Cardozo, H., Berdié, J., Canabez, F., & 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.

Nari, A., Hansen, J. H., Eddi, C., & Martins, J. R. (2000). Control de la resistencia a los antiparasitarios a la luz de los conocimientos actuales. En Centro Médico Veterinario de Paysandú (Eds.), X*XI World Buiatrics Congress y XXVIII Jornadas Uruguayas de Buiatría* (p.2). Paysandú: CMVP.

Nuñez, J. L., Muñoz, M., & Moltedo, H. L. (1982). *Boophilus microplus*. *La garrapata común del ganado vacuno*. Buenos Aires: Hemisferio Sur.

Petraccia, C. A., Cardozo, H., Nari, A., & Solari, M. A. (1983). Estudios de resistencia a garrapaticidas organofosforados (OF) en *Boophilus microplus*. *Veterinaria (Montevideo)*, *19*(83), 5-9.

Rodríguez, A. (2018). *Control biológico de garrapatas del ganado y otras plagas de agricultura*. Recuperado de https://ibem.bio.br/control-biologico-de-garrapatas-del-ganado-y-otras-plagas-de-agricultura/

Rosario Cruz, R., & Domínguez García, D. I. (2016). Biological and biochemical bases of pesticides resistance in Rhipicephalus (Boophilus) Microplus. En S. Trdan, *Insecticides Resistance*. Recuperado de https://www.intechopen.com/chapters/49576

Roush, R. T. (1993). Occurrence, Genetics and Management of Insecticide Resistance. *Parasitology Today*, *9*(5), 174-179.

Samish, M., & Rehacek, J. (1999). Pathogens and predators of ticks and their potential in biological control. *Annual Review of Entomology*, *44*, 159-182.

Sanchis, J., Cuore, U., Gayo, V., Silvestre, D., Invernizzi, F., Trelles, A., & Solari, M.A. (2008). Estudios sobre la ecología del *Boophilus microplus* en tres áreas del Uruguay. En Centro Médico Veterinario Paysandú (Eds.), Jornadas de Buiatría, (Vol. XXXVI, pp. 247-248). Paysandú: CMVP.

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.

Schwalbach, M. J., Greyling, J. P. C., & David, M. (2003). The efficacy of a 10% aqueous Neem (Azadirachta indica) seed extract for tick control in Small East African and Toggenburg female goat kids in Tanzania. *South African Journal of Animal Science*, *33*(2), 83-88.

Scoralik, M. G., Daemon, E., de Oliveira Monteiro, C. M., & Maturano, R. (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., & Gayo, V. (2007). Aplicación del control integrado de parasitos (CIP) en un establecimiento comercial. En *Seminario Regional Aplicación del control integrado de parasitos (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

Solari, M.A., Cuore, U., Trelles, A., & Mautone, G. (2009). *Ciclo parasitario de la garrapata*. Recuperado de https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/comunicacion/publicaciones/ciclo-parasitario-garrapata

Uruguay. (2008, abril 25). Ley N° 18.268: Lucha contra la Garrapata *Boophilus microplus* (garrapata común del bovino). Recuperado de https://legislativo.parlamento.gub.uy/temporales/leytemp9202318.htm

Venzal, J. M., Castro, O., Cabrera, P. A., De Souza, C. G., & Guglielmone, A. A. (2003). Las garrapatas de Uruguay: especies, hospedadores, distribución e importancia sanitaria. *Veterinaria (Montevideo)*, *38*(150-151), 17-28.

Recuperado de https://www.revistasmvu.com.uy/index.php/smvu/article/view/463/303

Weber Giordano, C. (2021). *Test de inmersión de larvas modificado en el perfil de sensibilidad de Rhipicephalus microplus a base de Amitraz* (Tesis de grado). Facultad de Veterinaria, Udelar, Montevideo.