



Universidad de la República Uruguay
CENUR Litoral Norte
Laboratorio de Moléculas Bioactivas

Tesis doctoral

**DESARROLLO DE HERRAMIENTAS PARA ENFRENTAR
LA RESISTENCIA DE LA GARRAPATA *Rhipicephalus
microplus***

Autora: TATIANA SAPORITI

Tutores: Phd. Guzmán Álvarez

Dr. Ulises Cuore

Artigas, Uruguay

2024

Dedicatoria

Este trabajo está dedicado a Guillermo Alejandro Arotce Othaix ya que ha sido un excelente compañero y pilar fundamental para decidirme a encarar este gran desafío y poder llevarlo adelante. Siempre incondicional física y emocionalmente, haciendo muchos sacrificios para apoyarme en este gran camino. Ha hecho maravillas para permitirme conseguir mis metas enseñándome a confiar en mí y sin dejarme renunciar. Se ha puesto la familia al hombro en infinidad de momentos para permitirme avanzar. Este trabajo es en gran parte fruto de sus esfuerzos y dedicación también por lo que le estaré siempre eternamente agradecida.

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a mis tutores, Guzmán Álvarez y Ulises Cuore. Guzmán me mostró un mundo nuevo de química, bioquímica y desarrollo farmacológico, desconocido para mí. Ha sido un excelente orientador en este trabajo y profesionalmente, brindándome apoyo incondicional y dando mucho de sí para ayudarme a sacar adelante este trabajo. Siempre extremadamente comprensivo, sensible, empático con las diferentes situaciones que nos tocaron atravesar en estos años. Ulises Cuore me ha acompañado en mis primeros pasos profesionales como veterinaria y en investigación. Ha estado a mi lado en mis cursos de post grado, tanto de maestría como de doctorado, orientándome, apoyándome y alentándome a seguir trabajando para alcanzar mis objetivos y superarme siempre. En segundo lugar, agradezco a mis padres que son quienes me han formado desde que nací formando los cimientos de la persona que hoy soy. Siempre buscando lo mejor para mí y ahora también para mi familia. Sostenes incondicionales para mi vida. El mismo agradecimiento va a mi hermana que ha sido siempre mi válvula de seguridad permitiéndome salir adelante. Agradezco a mis hijos y que surgieron en el medio de este proceso para alegrarme y llenarme de amor, así como ser fuente de aliento e inspiración a seguir. A mis amigas un agradecimiento inmenso, en especial a Leticia de Soto, Lorena Santos, Paula Seoane e Irina Fornio que son siempre motores en mi vida que no me dejan bajar los brazos y me llenan de confianza. Han estado presentes en todo este proceso de forma constante y cercana alentándome a seguir siempre. Un agradecimiento especial a los colegas y profesionales que han colaborado en diferentes aspectos en este trabajo. Especialmente a Josefina Bentacur, Eliza Ferrari, Juan Noboa y Facundo Goslino. En especial a Nallely Cabrera quien se tomó el tiempo de enseñarme sobre un área nueva para mí con mucha dedicación y calidez humana. Otro gran agradecimiento a todo el equipo del polo de desarrollo tecnológico del CENUR situado en EEMAC, quienes me han enseñado, acompañado y apoyado en todo momento, colaborando física e intelectualmente con este trabajo. Un especial agradecimiento a Zoraima Artía, Giuliana Bicco, Ileana Corvo, Mauricio Cabrera, Lía Randall, Cintya Perdomo, Andrés López y Lucía Bergalli, quienes han sido un gran apoyo técnico y humano en este recorrido sabiéndome acompañar e incluso alojar en sus hogares en los momentos en los que lo necesité.

Tabla de contenido

Dedicatoria	1
Agradecimientos	2
Tabla de contenidos	3
Tabla de abreviaturas	6
Resumen	8
Summary	8
Palabras Clave	9
Key words	9
Capítulo 1. Introducción y Antecedentes	10
1.1. Introducción	10
1.2. Antecedentes	12
1.2.1 Biología y ciclo de vida de la garrapata <i>R. microplus</i>	12
1.2.2 Resistencia a los garrapaticidas.....	16
1.2.3 Nuevas herramientas para el diagnóstico de resistencia.....	20
1.2.4 Proteínas blanco en el Control de garrapatas.....	22
1.2.5 Investigación actual en la búsqueda de nuevas herramientas para el control de las garrapatas.....	24
Capítulo 2. Hipótesis y Objetivos	26
Hipótesis	26
Objetivos	26
Capítulo 3. Desarrollo de una técnica de diagnóstico de resistencia por RMN	27
1. Materiales y métodos.....	27
1.1.Diseño experimental.....	27
1.2.Bioensayos fenotípicos para caracterizar los perfiles de resistencia de las poblaciones evaluadas	27
1.2.1. Evaluación de la muestra	27

1.2.2. TIA (Drummond et al., 1973).....	28
1.2.3. TIA Modificado para fluazuron (Reck et al., 2014; Saporiti, 2019).....	28
1.2.4. TPL (Miller et al., 2007; B. F. Stone & Haydock, 1962).....	29
1.2.5. TIL (Castro Janer et al., 2012).....	30
1.3.Evaluación por PCR de la resistencia en las poblaciones evaluadas.....	32
1.4.Procesamiento de muestras para la obtención de los espectros de RMN.....	37
1.5.Procesamiento de las muestras por RMN.....	37
1.6.Procesamiento estadístico de los espectros.....	37
2. Resultados y Discusión.....	38
2.1 Perfiles de resistencia de las garrapatas evaluadas por bioensayos y PCR.....	38
2.2. Puesta a punto de método de obtención de espectros y análisis metabolómico.....	41

Capítulo 2. Evaluación de moléculas como inhibidores de las enzimas TIM y GST.....47

1. Materiales y métodos.....	47
1.1. Diseño experimental.....	47
1.2. Evaluación de la actividad de los compuestos en las enzimas TIM y GST.....	47
1.2.1. Síntesis recombinante de TIM y GST.....	47
1.2.1.1.TIM.....	47
1.2.1.2.GST.....	48
1.2.2. Medición de la actividad enzimática.....	48
1.2.2.1.TIM.....	48
1.2.2.2.GST.....	49
1.2.3. Medición de la inhibición de la actividad enzimática.....	49
1.2.3.1.TIM.....	49
1.2.3.2.GST.....	50
1.3. Evaluación de la actividad de las moléculas por medio de bioensayos.....	50
1.3.1. Selección de la muestra de garrapatas a evaluar.....	50
1.3.2. TIL (basada en Castro Janer et al., 2012).....	50
1.3.3. TIA (basada en Drummond et al., 1973).....	51
1.4. Evaluación de la citotoxicidad y parámetros farmacocinéticos.....	52
1.4.1. Evaluación de la citotoxicidad en esperma bovino.....	52
1.4.2. Predicción de la citotoxicidad y otros parámetros farmacocinéticos.....	52

2. Resultados y discusión.....	53
2.1.Purificación de las enzimas recombinante TIM y GST.....	53
2.2.Medición de la actividad enzimática.....	53
2.3.Inhibición de la actividad enzimática.....	54
2.4.Resultados y discusión del efecto garrapaticida de los compuestos obtenido por medio de bioensayos.....	57
2.5.Citotoxicidad y parámetros farmacocinéticos del compuesto DM83.....	60
2.5.1. Citotoxicidad del compuesto DM83 evaluada en esperma bovino.....	60
2.5.2. Predicción de la citotoxicidad y otros parámetros farmacocinéticos.....	61
Conclusiones	63
Bibliografía	64

Tabla de abreviaturas

<i>R. microplus</i>	<i>Rhipicephalus microplus</i>
RE.....	Reproducción estimada
TIA.....	Test de inmersión de adultos
TIL.....	Test de inmersión de larvas
TPL.....	Test de paquete de larvas
PCR.....	Reacción en cadena de la polimerasa
RMN.....	Resonancia magnética nuclear
espín α	Espin positivo
espín β	Espin negativo
rf.....	Radio frecuencia
GST.....	Glutación s-transferasa
TIM.....	Triosa fosfato isomerase
DIILAVE.....	Division de Laboratorios Veterinarios
¹ HRMN.....	Espectroscopía de resonancia magnética nuclear de ¹ H
BAOR.....	Receptor octopamina β -adrenérgico
OCT/Tyr.....	Receptor octopamina/tiramina
ADN.....	Ácido desoxiribonucleico
dATP.....	Trifosfato de desoxiadenosina
dGTP.....	Trifosfato de desoxiguanina
dCTP.....	Trifosfato de desoxicitidina
dTT.....	Desoxitimidina trifosfato
ADNg.....	Ácido desoxiribonucleico genómico
pPCR.....	Producto de la reacción en cadena de la polimerasa
CPMG.....	Carr-Purcell- Meiboom-Gill
MNova.....	MestreLab Research, S.L.
AEMV.....	Análisis estadísticos multi variados
PCA.....	Análisis por componentes principales
MCPO.....	Mínimos cuadrados parciales ortogonales
R2.....	Bondad de ajuste

Q2.....	Capacidad de predicción
SNPs.....	Polimorfismos de nucleótido único
SNP.....	Polimorfismo de nucleótido único
CYP450.....	Citocromo P450
ROC.....	Características de funcionamiento del receptor
RmTIM.....	Triosa fosfato isomerase de <i>Rhipicephalus microplus</i>
HsTIM.....	Triosa fosfato isomerase de <i>Homo sapiens</i>
G3P.....	Gliceraldehído 3 –fosfato
DHAP.....	Dihidroxiacetona fosfato
alfa-GDH.....	Alfa-glicerolfosfato deshidrogenasa
CDNB.....	1-chloro-2,4-dinitrobenzeno
DCNB.....	3,4-dichloronitrobenzene
GSH.....	Grupo tiol del glutatión
CASA.....	Analizador de semen asistido por computadora
Spzv.....	Espermatozoides vivos
Spzm.....	Espermatozoides muertos
Spz.....	Espermatozoides

Resumen

La parasitosis por la garrapata *Rhipicephalus microplus* (*R. microplus*) puede representar una limitante para la producción bovina desde el punto de vista sanitario, así como económico. Por lo tanto, es muy importante su control, el cual se ha visto desafiado por la selección hacia la resistencia a los diferentes principios activos habilitados en Uruguay al punto de diagnosticarse poblaciones multirresistentes. Para sortear esta dificultad es que existen diferentes bioensayos que se utilizan de rutina y permiten determinar el perfil de resistencia de una población de *R. microplus*, lo que brinda una orientación más precisa para su tratamiento. Sin embargo, estos llevan aproximadamente 60 días en brindar resultados. La resonancia magnética nuclear es una técnica que nos permite elucidar las moléculas de una muestra, como pueden ser los metabolitos. De esta manera, mediante un estudio metabólico, se podrían identificar diferencias entre muestras de garrapatas resistentes y susceptibles a los diferentes grupos químicos garrapaticidas. Disponer de esta herramienta para el diagnóstico de resistencia podría acortar los tiempos de obtención de resultados. Además de abordar el diagnóstico es necesario contar con nuevas entidades químicas para el tratamiento garrapaticida. Para ello el estudio de moléculas en proteínas blanco es un camino a seguir. En este sentido las enzimas Triosa fosfato isomerasa y la Glutación S transferasa son importantes en el metabolismo de la garrapata. Por lo tanto, identificar moléculas que presenten actividad inhibitoria de estas, resulta en un importante primer paso en la búsqueda y detección de moléculas con poder garrapaticida. En este trabajo se logró desarrollar un método de diagnóstico que diferencia garrapatas susceptibles de resistentes en 7 días, además se identificaron moléculas con inhibición selectiva de enzimas esenciales de la garrapata que demostraron actividad garrapaticida en larvas y adultas.

Summary

Parasitosis caused by *Rhipicephalus microplus* (*R. microplus*) tick can signify a limitation for bovine production systems from a health and economic point of view. However, its control, which turns out to be a very important issue, has been challenged by the emergence of resistance to the different active ingredients registered in Uruguay. So much so that currently multi-resistant populations have been diagnosed. In order to get around this problem different bioassays exist that are routinely used and allow us to determine the resistance profiles of a *R. microplus* population, giving a more precise

orientation for its treatment. However, these results take approximately 60 days in giving the results. Nuclear magnetic resonance is a technique that allows the elucidation of molecules of a sample, such as metabolites. This way, differences between samples of susceptible and resistant ticks, to the different active ingredients, could be identified. Having this tool could shorten times for obtaining results once the sample has been received. Besides addressing the diagnosis problem, it is also necessary to count on new chemical entities for the tickicide treatments. Therefore, the study of molecules on the activity of blank proteins is one way to pursue. Thus Triosephosphate-isomerase and Glutathione S transferase are two important enzymes on ticks' metabolism. To identify molecules which present an inhibitory activity of these enzymes results on an important first step on the search and detection of molecules with a tickicide effect. This study managed to develop a diagnostic method that allows to differentiate susceptible from resistant tick populations on 7 days. Besides it has identified molecules with selective enzyme inhibition, on enzymes which are essential for ticks, as well as showing tickicide activity on adult and larvae ticks.

Palabras clave: *Rhipicephalus microplus*, Resistencia, diagnóstico, moléculas garrapaticidas, RMN.

Key words: *Rhipicephalus microplus*, Resistance, diagnosis, tickicide molecules, NMR.

Capítulo 1. Introducción y Antecedentes

1.1. Introducción

La producción ganadera cubre casi el 40% de la producción agrícola total en los países desarrollados y el 20% en los subdesarrollados. También apoya los medios de vida de 1300 millones de personas en el mundo y cubre el 34% del suministro de proteínas alimentarias a nivel mundial. De forma indirecta los productores procuran cuidar la salud de los pastizales, mejorando la fertilidad del suelo, manteniendo su biodiversidad, controlando incendios y acelerando los ciclos de los nutrientes, ya que la materia vegetal es la fuente de alimentación de los ganados (FAO, 2024b). En los últimos 3 años el comercio internacional de la carne bovina y por lo tanto su producción se ha visto en aumento observándose lo mismo en la producción lechera y su comercio (FAO, 2024a). La región se destaca por involucrar a los principales países exportadores de carne bovina, específicamente Brasil, Argentina, Uruguay y Paraguay (Labraga, 2016; Tardáguila Agromercados, 2023). En Uruguay particularmente se ha observado en los últimos años un aumento en la producción, así como en las exportaciones de la ganadería y lechería (Lyonnet, 2024). Particularmente de las exportaciones correspondientes al sector cárnico ingresaron 2.637 millones dólares (-2,6% vs. 2022/2023) de los cuales el 80% corresponde a carne bovina, 11% subproductos (primario, residual e industrializado) y en tercer lugar menudencias con el 4,2% de lo exportado, según reportes de INAC. Este también reporta que en volumen equivalente peso canal se exportaron, en el ejercicio 2023-2024, 527.902 toneladas aumentando un 11,3% respecto al ejercicio anterior (INAC, 2024), en este sentido la carne bovina continúa siendo el principal producto de exportación de Uruguay (Uruguay XXI, 2024). Por lo tanto, cualquier variable que revista un flajelo a la producción ganadera significa un gran impacto en la economía del país. Es aquí que la garrapata común del ganado *Rhipicephalus microplus* (*R. microplus*) se posiciona como una de las principales ectoparasitosis de los bovinos. No solamente por el impacto que tiene a nivel país donde las últimas estimaciones hablan de pérdidas de hasta 46 millones de dólares anuales (Muzzio, 2006 Cuore & Solari, 2022) sino del impacto a nivel sanitario y por lo tanto en el bienestar del animal ya que la sanidad es una de sus patas determinantes. El impacto económico de la parasitosis, según un informe de la IAEA (1998) (citado por Cuore et al., 2017), se asocia a mermas productivas, costos en los que hay que incurrir e incluso pérdidas debidas a enfermedades transmitidas por

estos parásitos. Las mermas productivas, estimadas en 0,7g por teleogina ingurgitada sobre el animal, se deben a variables que se asocian directamente a esta parasitosis como el estrés causado por la picadura de estos parásitos, así como la pérdida de sangre que estos pueden generar, daños en el cuero y ubres, así como la inoculación de toxinas. Por otro lado, también tiene un impacto indirecto en los animales debido a que es la puerta de entrada a enfermedades secundarias como la miasis (Alexander, 2006; FAO, 1984) y se destaca la tristeza parasitaria (Bock et al., 2004; FAO, 2004). Esta consiste en un complejo febril y anemizante que lo provocan dos enfermedades, la babesiosis y la anaplasmosis (Begeres de Almeida et al., 2006). La primera es causada en Uruguay por *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* y la segunda por *Anaplasma marginale* (Solari et al., 2013). Estos hemoparásitos se transmiten por las garrapatas, si bien *Anaplasma marginale* cuenta con otros organismos, así como fómites que le sirven de vector (Bock et al., 2004; Shimada et al., 2004). Estos hemoparásitos parasitan los glóbulos rojos de la sangre, dentro de los cuales se reproducen generando de esta manera anemia severa en los animales (Bock et al., 2004; Vally & Gentry, 2007). A esta parasitosis se asocia la problemática de los residuos de garrapaticidas en productos de origen animal. Es así que el uso y manejo inapropiado de garrapaticidas pone en riesgo la inocuidad alimentaria y consecuentemente los mercados comerciales para Uruguay (CONHASA, 2016). Es por esto que *R. microplus*, es considerado el ectoparásito más importante en bovinos y su combate ha sido reglamentado desde 1940, actualmente rigiendo la Ley 18.268 del 2008 (Venzal et al., 2003). Dado lo anterior expuesto y en concordancia con esta ley resulta imprescindible controlar esta parasitosis.

Un factor importante para lograr este control es la resistencia a los garrapaticidas. Esta se define como la reducción en la susceptibilidad de un parásito a determinado insecticida, como lo son los garrapaticidas, cuando es usado a la dosis recomendada y de acuerdo a todas las indicaciones para su uso (FAO, 2004). Resulta entonces en una capacidad que adquieren determinados individuos de una población de parásitos que los hace capaces de sobrevivir a dosis de químicos a las cuales otros individuos de la población no podrían sobrevivir (Woodham et al., 1983). Es así que la resistencia provee a las garrapatas de un modelo ideal de adaptación que les permite sobrevivir a estrés severo (Denholm & Rowland, 1992) como el generado por los garrapaticidas. La utilización de garrapaticidas reiteradamente y con una alta frecuencia ha llevado a que se den las condiciones para que se seleccione hacia esta resistencia (FAO, 2004). Inicialmente en Uruguay se observó resistencia a los arsenicales desde 1950 siendo citada por Cardozo y Franchi en 1994

(Cardozo & Franchi, 1994), le siguieron a esta los diagnósticos de resistencia a organofosforados en 1978 (Petraccia et al., 1983), piretroides sintéticos en 1994 (Cardozo & Franchi, 1994), las mezclas de piretroides y fosforados en 1994 (Cardozo & Franchi, 1994), el fipronil (5-amino-1-[2,6-dicloro-4-(trifluorometil)fenil]-4-(trifluorometilsulfinil)pirazol-3-carbonitrilo) en 2006 (Cuore et al., 2007), el amitraz (N,N'-[(Metilimino)dimetilidin]di-2,4-xilidino) en 2009 (Cuore et al., 2012) y las lactonas macrocíclicas en 2010 (Castro-Janer et al., 2010; Cuore et al., 2012). En los últimos años la situación de la resistencia se ha vuelto más difícil debido a la aparición de poblaciones multirresistentes y con resistencia múltiple a partir del 2009 (Cuore et al., 2012, 2017). Otro factor que impacta en lo que es el manejo de esta parasitosis a nivel predial y su asociación con poblaciones resistentes es el movimiento de animales portadores de *R. microplus*. Tanto es así que se ha visto asociado el surgimiento de resistencia a determinados principios activos en poblaciones *R. microplus* de predios donde no se hacía uso de esos principios activos, asociándose este surgimiento de resistencia a movimiento de animales portadores del parásito (Saporiti et al., 2021). Es así que el conocimiento del riesgo de introducción de garrapatas con nueva genética resistente a un predio, mediante un buen proceso de análisis de riesgo y posterior adquisición de medidas adecuadas para esta prevención, se torna clave (Miraballes et al., 2019).

1.2. Antecedentes

1.2.1 Biología y ciclo de vida de la garrapata *R. microplus*.

La garrapata del ganado, pertenecientes a la familia de las garrapatas duras, Ixodidae, y recientemente descrita como *R. microplus* (Murrell et al., 2000), cuenta con su presencia en Uruguay desde 1905 (Lahille, 1905). Si bien es conocido que su huésped predilecto es el bovino, también se la ha visto parasitando ovinos, equinos, perros y venados (Venzal et al., 2003). Según la ley N° 18.268 del 17 de abril de 2008 Uruguay se divide en dos zonas según la presencia de este ectoparásito, la zona libre donde no hay presencia del parásito, pudiendo surgir brotes ocasionales y la zona de control en la cual existe la presencia del parásito.

El ciclo biológico de la garrapata se divide en una fase parasitaria y una de vida libre. La fase parasitaria consta de tres estadios: larva, ninfa y adulto, estas etapas de vida se dan

sobre el mismo hospedero consistiendo en un ciclo monofásico (Nuñez et al., 1982). La duración de estos estadios no es mayormente alterada por las condiciones climáticas ya que se dan sobre el animal, cumpliéndose la totalidad del ciclo a los 23 días (Cuore & Solari, 2022). Sin embargo, esta fase parasitaria puede verse afectada por la resistencia del huésped al parásito, ya sea porque es de una especie inespecífica, así como corresponda a una raza más resistente como puede ser las razas cebuinas (Cardozo & Nari, 1986). Desde la pastura sube la larva al bovino para fijarse a su piel. Este estadio es difícil de observar debido a su tamaño (0,5 x 0,4 mm). La larva posee tres pares de patas y es en esta etapa donde inocula la *Babesia bovis*. Se alimenta de sangre y evoluciona hasta mudar su exoesqueleto entre los días 3-4 del ciclo transformándose en metalarva, que es de color blanquecina y su tamaño se encuentra duplicado (1mm). Esta cuenta con una doble cutícula que le otorga una cierta resistencia mecánica a la penetración del garrapaticida de efecto tópico. Al día 9 la ninfa se libera de su viejo exoesqueleto. Esta presenta 4 pares de patas y 3 hileras de dientes a cada lado del hipostoma y permanece del mismo tamaño que en la etapa anterior. Es en esta etapa que se inocula la *Babesia bigemina* (Cuore et al., 2013; Riek, 1964). Al día 13 comienza la segunda muda, adquiriendo en esta etapa el nombre de metaninfa. Esta es de mayor tamaño, entre 2,5 a 4 mm, y su doble envoltura de quitina (doble cutícula) le confiere un aspecto globoso. Al comenzar su etapa adulta a los 13-14 días, comienza la diferenciación sexual. Los machos se comienzan a observar a partir de los 13,5 días del ciclo y las hembras neoginas a los 14,5 días del ciclo. En esta posee 4 hileras de dientes a cada lado del hipostoma, y 4 pares de patas. La garrapata adulta también es capaz de inocular a la *Babesia bigemina* (Cuore et al., 2013; Riek, 1964). Al llegar los días 17-18 del ciclo las garrapatas alcanzan el estadio de partenogina semi-ingurgitada, quien puede ser fecundada por un macho. Si esto sucede continúa su alimentación para finalizar la fase parasitaria como teleogina ingurgitada. De no ser fecundada la partenogina muere. A los 19-21 días del ciclo se observan las primeras teleoginas, que con un tamaño de 8-13 mm, se desprenden del bovino naturalmente y caen al suelo (Cardozo & Nari, 1986; Cuore et al., 2013). Por su parte el macho que puede identificarse por su apéndice caudal y por ser más pequeño que la hembra, puede vivir por más de 40 días. Este tiene la característica de ser muy móvil, siendo el único que puede parasitar a otro bovino. Puede prenderse y desprenderse del bovino en busca de alimento y hembras para fecundar. Con respecto a los hemoparásitos puede inocular *B. bigemina* y ser transmisor mecánico de *A. marginale* (Shimada et al., 2004). La fase de vida libre consiste en las teleoginas, huevos y larvas que están

infestando el ambiente. La duración de este ciclo está condicionada por temperatura y humedad del ambiente observándose como resultado, que con una humedad relativa mayor a 80% y temperatura de 27°C se acorta el intervalo entre generaciones a un período de dos meses observándose también que eclosionan el 85% de los huevos. Por otro lado, en el verano las altas temperaturas asociadas a la baja humedad y en el invierno las bajas temperaturas ocasionarán que eclosione un bajo porcentaje de la masa de huevos, o las larvas que emergen serán poco viables. Más específicamente, tanto las teleoginas al desprenderse del bovino, como sus huevos y larvas pueden ser afectadas por la radiación solar, heladas, desecación e incluso por hongos entomopatógenos. De cualquier manera, en condiciones ambientales ideales eclosionará un 85% del total de huevos (Arguedas et al., 2008; Cardozo & Franchi, 1994; Cardozo & Nari, 1986; FAO, 2004; Sanchis et al., 2008). En Uruguay esa fase tiene una duración mínima de 2 meses y máxima a cielo abierto puede ser de hasta 13 meses (Cuore et al., 2019). La etapa desde que la teleogina se desprende del animal y cae al suelo, hasta el comienzo de la ovipostura se denomina protoquia y desde el comienzo hasta el fin de la ovipostura, ootoquia. Cada oviposición corresponde a 1000-4500 huevos por garrapata, en un período de 14 días en condiciones óptimas (27°C y >80% humedad). La masa de huevos tiene un peso aproximado de 0,1 gramos correspondiente a la mitad del peso de la garrapata (promedio 0,24gramos) (Cuore et al., 2013). La garrapata tiene un gran potencial reproductivo, incluso luego de un día sumergida bajo agua conserva su capacidad de oviponer. Sin embargo, cuando los huevos se encuentran sumergidos entre 7-14 días tienen una eclosión mínima o nula (Cardozo & Franchi, 1994). Luego de eclosionadas las larvas suben al extremo superior de las pasturas dado su geotropismo negativo. Aquí forman un cúmulo entre ellas esperando su encuentro con el huésped y protegiéndose así de las condiciones adversas (FAO, 2004). En Uruguay la viabilidad de las larvas en el ambiente puede ser de hasta 10 meses debido a nuestras condiciones climáticas (Cuore & Solari, 2022). Se define como generación de garrapatas al período transcurrido desde que una larva parasita al bovino, cae como teleogina, oviposita, eclosionan sus larvas y vuelven a parasitar a un bovino. En Uruguay considerando que existen diferentes duraciones del ciclo no parasitario, debido a factores climáticos, se dice que pueden desarrollarse de 1,5 a 3,5 - 4 generaciones al año (Cardozo et al., 1984; Cuore et al., 2013, 2019; Nari et al., 1979; Sanchis et al., 2008). La primera generación de garrapatas en Uruguay se da de agosto a octubre y corresponde a la descendencia de las garrapatas caídas en otoño. Aquí las condiciones climáticas son más favorables que en el invierno por lo que los ciclos se acortan y aumenta la fertilidad de la

descendencia de las garrapatas, responsables de la segunda generación (Cuore et al., 2013). Las cargas de garrapatas que se encuentran parasitando a los bovinos son bajas, en promedio de 2 a 4 por animal. Pero se ha observado que a la salida del invierno en predios con problemas de resistencia se pueden encontrar hasta 100 garrapatas ingurgitadas por animal (Cuore et al., 2012; Solari et al., 2008). La segunda generación va generalmente de noviembre a enero siendo la descendencia de las garrapatas caídas en agosto a octubre. En ésta las cargas parasitarias sobre el animal aumentan (Cuore et al., 2013). Por último, la tercera generación se desarrolla entre enero/febrero a mayo, observándose en esta la mayor carga de garrapatas por animal (Cuore y Solari, 2022). Las teleoginas que caen en los meses de otoño continúan con el ciclo poniendo huevos que eclosionarán, mientras que, las que caigan en invierno podrán verse afectadas en cuanto a su viabilidad reproductiva por el clima (Cuore et al., 2013). Las larvas que superan el invierno son las que suben como la primera generación de la próxima temporada de garrapatas (Cuore y Solari, 2022).

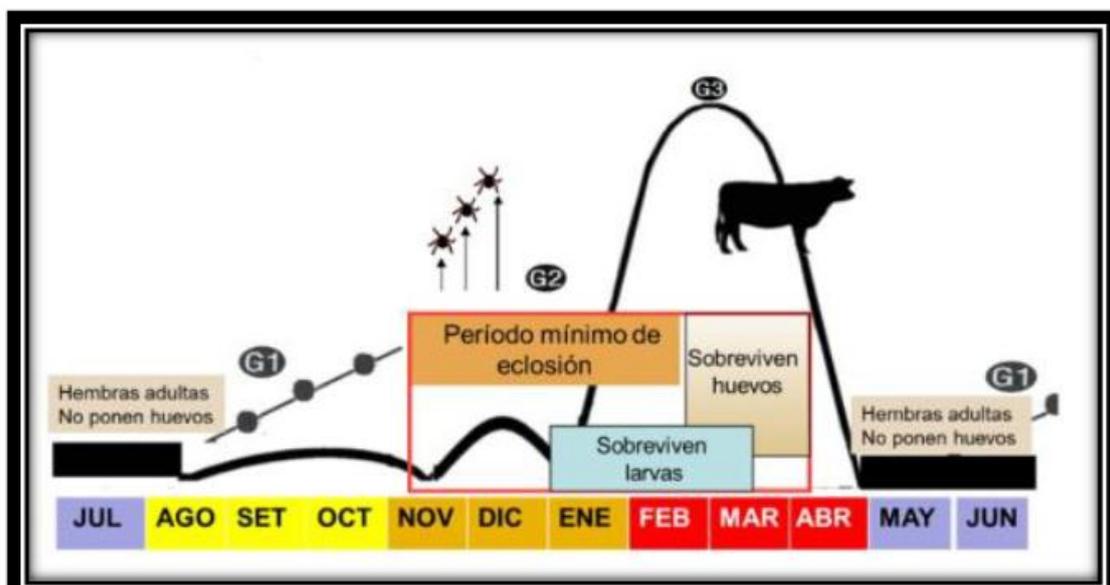


Figura 1. Modelo epidemiológico para la garrapata *Rhipicephalus microplus* (extraído de Nari, 1990)

1.2.2 Resistencia a los garrapaticidas

Actualmente existen 7 grupos químicos registrados como garrapaticidas en Uruguay. Estos son los piretroides, amidinas, organosfosforados, fenilpirazoles, lactonas

macrocíclicas, benzoilfenilureas e isoxazolinas (MGAP, 2024). Los piretroides, como la cipermetrina, alfa cipermetrina, deltametrina o flumetrina, son lipofílicos lo que permite que penetren la cutícula de las garrapatas, rica en lípidos, fácilmente. De ahí pasan a la hemolinfa y son llevados a las células nerviosas. En esta se adhieren a los canales de sodio generando un aumento del ingreso de este ión y así un estado excitatorio de la célula. También actúan como agonistas de los receptores colinérgicos nicotínicos y como antagonistas de receptores GABA. Se observa como resultado una parálisis rígida con hiperexcitabilidad, incoordinación y dificultad de movimiento, temblores, convulsión y finalmente efecto knock-down. Las amidinas, como el amitraz, penetran rápidamente la cutícula del parásito y actúan a nivel de las células nerviosas donde actúan de forma directa sobre los canales de sodio y es agonista de los receptores α adrenérgicos observándose una hiperexcitabilidad parálisis y muerte. También se puede observar que las teleoginas no ponen huevos debido a que no logran una buena contracción de su musculatura genital. Los organofosforados, como el ethion o el clorpirifos, se ligan de forma irreversible a la colinesterasa evitando que esta hidrolice a la acetilcolina por lo que este neurotransmisor se acumula y genera hiperexcitabilidad e hiperactividad, seguido de incoordinación muscular, convulsiones y posteriormente la muerte del parásito. Los fenilpirazoles, como el fipronil, generan una inhibición no competitiva del GABA, fijándose en el interior de este canal de cloro. De este modo inhibe el ingreso de este ión por lo que genera la muerte del parásito por hiperexcitación. Las lactonas macrocíclicas se dividen en dos subgrupos, las avermectinas, como la ivermectina, y las milbemicinas, como la moxidectina. Son antiparasitarios de amplio espectro afectando parásitos externos e internos del bovino. Su mecanismo de acción implica una unión al canal GABA que nivel muscular en los parásitos aumentan la conductancia de la membrana muscular generando un aumento del ingreso de cloro. De este modo hay una reducción de la resistencia de la membrana celular traduciéndose en ataxia y parálisis de la garrapata (Sartor et al., 2011). Las isoxazolinas, como el fluralaner, se adhieren al receptor GABA, evitando el ingreso de iones de cloro y por lo tanto manteniendo la estimulación de la célula. Como consecuencia hay una estimulación excesiva del sistema nervioso que lleva a la muerte del parásito (Gassel et al., 2014). Por último, las benzoilfenilureas, como el fluazuron, presentan un mecanismo de acción que no involucra al sistema nervioso del parásito, sino que actúa como inhibidor del desarrollo del parásito. Esto lo realiza evitando la síntesis de sus diferentes estructuras con quitina. Como resultado este no puede realizar las mudas, pierde hemolinfa, adquieren una coloración oscura y mueren

debido a la deshidratación. También se ve afectada la capacidad reproductiva afectándose la ovipostura y su eclosión (Sartor et al., 2011; Schmid et al., 1994).

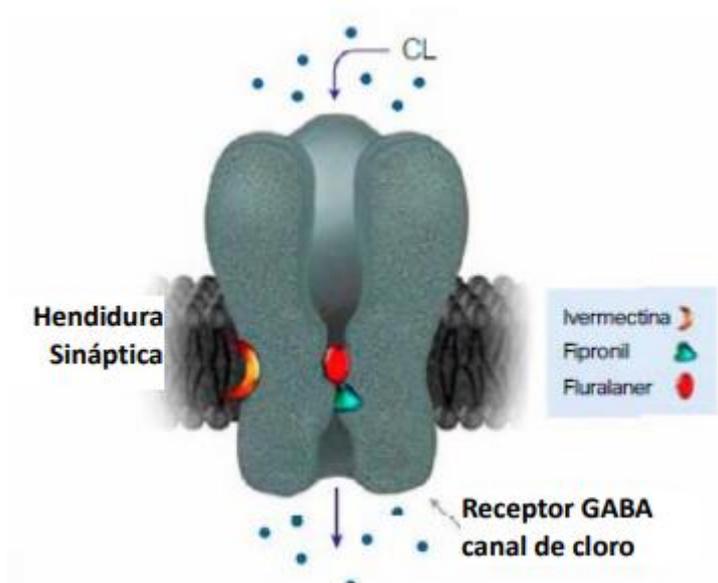


Figura 2. Mecanismo de acción del flluralaner (Rodrigues & Cury, n.d.)

Para estos grupos químicos la garrapata del ganado a desarrollado diferentes mecanismos de resistencia. Si bien se ha teorizado mucho al respecto de estos se han confirmado dos mecanismos de resistencia, uno asociado a modificaciones en el sitio de acción de las moléculas garrapaticidas y otro a una resistencia metabólica. En cuanto a los mecanismos relacionados a modificaciones del sitio de acción, para los piretroides sistémicos se han detectado modificaciones en el canal de sodio confiriendo a los parásitos que la tienen una resistencia a estos, denominándose esta resistencia como kdr (He, Chen, et al., 1999; Jonsson et al., 2010; Rodríguez-Vivas et al., 2012; Stone et al., 2014).

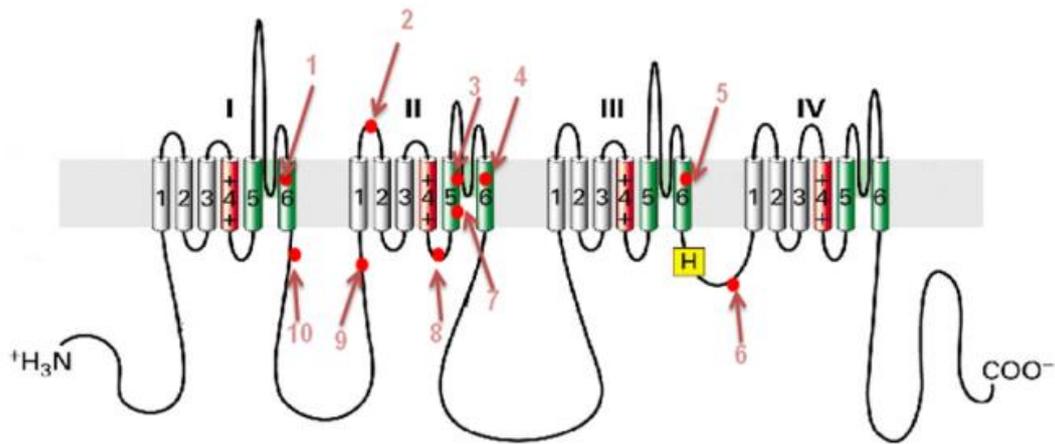


Figura 3. Mutaciones de la resistencia *kdr* en canales de sodio de diversos artrópodos. Se muestra con puntos rojos las mutaciones *kdr* en las que se ha confirmado la reducción de la sensibilidad a Piretroides sintéticos (Extraído de Rodríguez-Vivas et al., 2012).

Se han detectado mutaciones genéticas en la región del canal de GABA asociados a resistencia a dieldrin así como a fipronil, sugiriendo que cambios en este canal podrían generar la resistencia a estas moléculas (Castro Janer et al., 2019; Hope et al., 2010). Lo mismo se ha observado para el receptor de octopamina, de unión del amitraz (Chen et al., 2007; Jonsson et al., 2018). En cuanto al mecanismo de resistencia metabólica, este se ha observado para diferentes moléculas. Inicialmente se aisló una enzima tipo tipo carboxylesterasa de *R. microplus*. Dado que esta podría hidrolizar la permetrina, se presentó como de las primeras evidencias que sugerían que enzimas metabólicas también pueden participar en la resistencia a los piretroides (Riddles et al., 1983). Posteriormente el mecanismo de resistencia metabólica fue confirmado, como por ejemplo para los organofosforados donde se observa un aumento de enzimas involucradas en procesos de detoxificación (Carboxylesterasas) ante poblaciones resistentes a fosforados e incluso previamente enfrentadas a diazinon (Brito et al., 2017; Jamroz et al., 2000). También se pudo confirmar este tipo de resistencia para piretroides dado por enzimas como las esterasas, así como la mono-oxigenasa (Cossio-Bay et al., 2008; Jamroz et al., 2000; Pruett et al., 2002).

Ante la problemática que implica la resistencia, conocer los perfiles de resistencia de las poblaciones de campo es el puntapié inicial para realizar un plan sanitario de control de *R. microplus*. Es así que existen diversas técnicas *in vitro* que nos permiten diagnosticar la resistencia de poblaciones de garrapatas a los diferentes garrapaticidas. Algunas de estas consisten en bioensayos fenotípicos como por ejemplo el test de inmersión de adultos que consiste en sumergir 10 teleoginas en una solución con un determinado

garrapaticida o una mezcla para luego de un período de incubación, en condiciones ideales para la sobrevivencia de la garrapata (28°C, 85-90%HR, 12 horas de luz), poder evaluar no solo su mortalidad sino también su reproducción estimada ($RE = \text{peso huevos} * \text{peso hembras} * \% \text{ de eclosión} * 20000$) y a partir de esta el % de control ($\% \text{ control} = (RE \text{ control} - RE \text{ tratadas}) / RE \text{ control} * 100$), asumiendo el % de resistencia como la diferencia entre el porcentaje de control y 100, el porcentaje que no se logra controlar (Drummond et al., 1973). De esta manera se puede observar que para determinar el porcentaje de resistencia son considerados parámetros que se asocian a variables reproductivas y no estrictamente a la mortalidad. Otro bioensayo que suele utilizarse es el test de inmersión de larvas (TIL) donde en este caso se sumergen aproximadamente 100 larvas en una solución con la molécula garrapaticida a evaluar por un período de tiempo determinado y luego se colocan en sobres de papel filtro Whatman a incubar por 24 horas, en las condiciones ideales previamente descritas, para finalizar el ensayo contando la cantidad de larvas vivas y muertas y así calculando el % de larvas vivas, tomando a este como el % de resistencia (Shaw, 1966). Entre otros también se encuentran el test de paquete de larvas (TPL) en el cual se utilizan 100 larvas que se colocan en sobres de papel filtro Whatman, impregnados con una solución que contiene una determinada molécula garrapaticida a evaluar. Este se incuba con las larvas por 24 horas, en las condiciones ideales previamente descritas, y se evalúa el porcentaje de resistencia de igual modo que se realizó en el TIL (Stone & Haydock, 1962). Todas estas técnicas llevan aproximadamente entre 1,5 y 2 meses en poder brindar un resultado de resistencia. Durante este período el productor debe de realizar un tratamiento con un garrapaticida ya que de no hacerlo puede perder el control de la situación considerando que el ciclo parasitario de *R. microplus* es de 21 días (Núñez et al., 1987). El gran desafío en este momento es lograr a ciegas un tratamiento eficaz, ya que de optar por un grupo químico para el cual existe resistencia la situación igualmente puede llevar a un descontrol además de los costos en un tratamiento fallido. También existen técnicas moleculares de diagnóstico de resistencia que utilizan la reacción en cadena de la polimerasa (PCR de sus siglas en inglés), que nos permite obtener un resultado rápido de resistencia, sin embargo, dependen de conocer previamente los mecanismos genéticos de resistencia, y estos solo se conocen para unos pocos garrapaticidas (Sangster et al. 2002; FAO 2003).

Por lo tanto, se plantea como una necesidad poder desarrollar una herramienta diagnóstica de resistencia que permita brindar una respuesta rápida al productor para que pueda tomar decisiones en cuanto al garrapaticida a utilizar para obtener un resultado eficiente.

1.2.3. Nuevas herramientas para el diagnóstico de resistencia

Hoy en día se cuenta con una herramienta muy útil y rápida de diagnóstico que es la Resonancia Magnética Nuclear (RMN). Esta estudia núcleos atómicos que tienen un número impar de electrones como son los átomos de ^1H , ^{13}C , ^{19}F y ^{31}P . Estos núcleos son magnéticamente activos, es decir que poseen espín, ya que los núcleos poseen carga positiva y por lo tanto un movimiento de rotación sobre un eje que hace que se comporten como si fueran pequeños imanes. En ausencia de un campo magnético los espines se orientan al azar, pero sometidos a un campo magnético se orientan en la dirección del campo aquellos con espín positivo (espín α) y en dirección opuesta los que cuentan con espín negativo (espín β). Es importante tener presente que entre estos dos estados de espín hay una diferencia energética y cuanto mayor sea el campo magnético aplicado a esta muestra mayor será la diferencia energética entre los estados de espín. Cuando una muestra es irradiada por un pulso breve de radiación (en la región de radiofrecuencia, rf) los núcleos en estado de espín α son promovidos a estado de espín β (resuenan con la radiación). Cuando los núcleos retornan a su estado de espín inicial emiten señales cuya frecuencia depende de la diferencia de energía entre el estado de espín α y β . El espectrómetro de RMN detecta esta frecuencia y genera el espectro de RMN que es el registro de esta como una gráfica de frecuencia frente a intensidad. Un espectrómetro de RMN cuenta con un imán estable (con un controlador que produce un campo magnético preciso), un transmisor de radiofrecuencias (capaz de emitir frecuencias precisas), un detector para medir la absorción de energía de radiofrecuencia de la muestra y una computadora con un registrador para realizar las gráficas que constituyen el espectro de RMN.



Figura 4. Sistema de RMN 500 MHz donde se muestran las artes fundamentales del mismo.

Para obtener un espectro de una muestra, esta se coloca en una pequeña cantidad (del orden de los μL) junto al disolvente adecuado en un tubo de vidrio largo que se coloca dentro del campo magnético del aparato. El tubo se hace girar sobre su eje vertical mientras se lo somete a un campo magnético constante mientras que se lo irradia por rf de forma de excitar a todos los núcleos de la muestra simultáneamente. Los protones absorben la radiación y cambian de estado de espín (resuenan). Al volver a su estado inicial, los núcleos emiten una radiación de frecuencia cuya intensidad es correspondiente a la energía entre los estados de espín. Finalmente, la computadora convierte este dato en intensidad respecto a frecuencia de resonancia que se conoce como transformada de Fourier. En el espectro se observa en eje de las X la frecuencia a la que resuenan los átomos, llamada desplazamiento químico, y en el de las Y la intensidad. El desplazamiento químico es característico de cada átomo y el entorno que lo rodea cuando conforma estructuras como las moléculas (García Álvarez, 2017; García González et al., 2022). Por lo tanto, esta es una técnica que permite el análisis de las moléculas presentes en una muestra. De esta manera se podría llegar a elucidar moléculas como son los metabolitos derivados de una célula (Laurella, 2017) reflejando de este modo su identidad. En este sentido la metabolómica, que se refiere al estudio de estos metabolitos, mediante el uso de la RMN ha sido sugerida como una herramienta apropiada para detectar diferencias entre bacterias resistentes y susceptibles a antibióticos (García-Álvarez et al., 2013, 2015) así como para hongos resistentes y susceptibles a antifúngicos (Coen et al., 2006; Plummer et al., 2007). Por lo tanto, es posible que esta sea una buena

herramienta para poder estudiar diferencias entre las vías metabólicas de garrapatas susceptibles y resistentes a los diferentes garrapaticidas. Así sería posible contar con una herramienta que nos permita diagnosticar de forma rápida diferentes perfiles de resistencia en poblaciones de *R. microplus*.

1.2.4. *Proteínas blanco en el Control de garrapatas*

En un abordaje integral de control de la garrapata no basta solo con el conocimiento de los perfiles de resistencia de una población, también es necesario el desarrollo de nuevas entidades químicas capaces de controlar estas poblaciones resistentes. Sin embargo, la posibilidad de disponer de nuevas moléculas parasiticidas se ve comprometida por diferentes causas como el desarrollo de la resistencia parasitaria (Schwalback et al., 2003), los altos costos de desarrollo e investigación de estas y su relación con un bajo retorno (Nari A et al., 2003). Los garrapaticidas no escapan de esta situación siendo que han pasado más de 30 años entre el descubrimiento de las dos últimas moléculas, de diferentes grupos químicos, con efecto garrapaticida sobre *R. microplus* (Gassel et al., 2014; Kemp et al., 1990). Esto demuestra lo difícil que es disponer de nuevas moléculas garrapaticidas que pertenezcan a grupos químicos diferentes a los ya utilizados. Por lo tanto, la búsqueda de nuevos garrapaticidas sigue siendo necesaria para poder contar con estas herramientas que permitan controlar las parasitosis para *R. microplus*.

La búsqueda de nuevos garrapaticidas puede tener diversos caminos. Actualmente existen diferentes abordajes en el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos como son identificar nuevas moléculas que puedan regular de forma potente y selectiva la actividad de proteínas blanco (Schenone et al., 2013). Estas pueden ser enzimas claves para la vida de la garrapata como blanco de diferentes grupos químicos. Teniendo esto en cuenta surgen dos enzimas como blancos a inhibir por potenciales moléculas garrapaticidas, la Glutación s-transferasa (GST) y la Triosa fosfato isomerasa (TIM). Por un lado, la GST es una enzima que participa en procesos de detoxificación y antioxidantes (Freitas et al., 2008). Puntualmente ésta cataliza la reacción que conjuga al glutatión reducido con diversos compuestos electrofílicos, endógenos y exógenos, evitando así el daño oxidativo celular (Allocati et al., 2018; Hayes et al., 2005). Se ha asociado a la GST en el metabolismo de compuestos endo y xenobióticos en *R. microplus* dado un incremento en su transcripción, así como en su actividad (Freitas et al., 2008). También se ha visto

asociada su sobreexpresión a la resistencia en poblaciones de *R. microplus* de México (Rodríguez-Vivas et al., 2006).

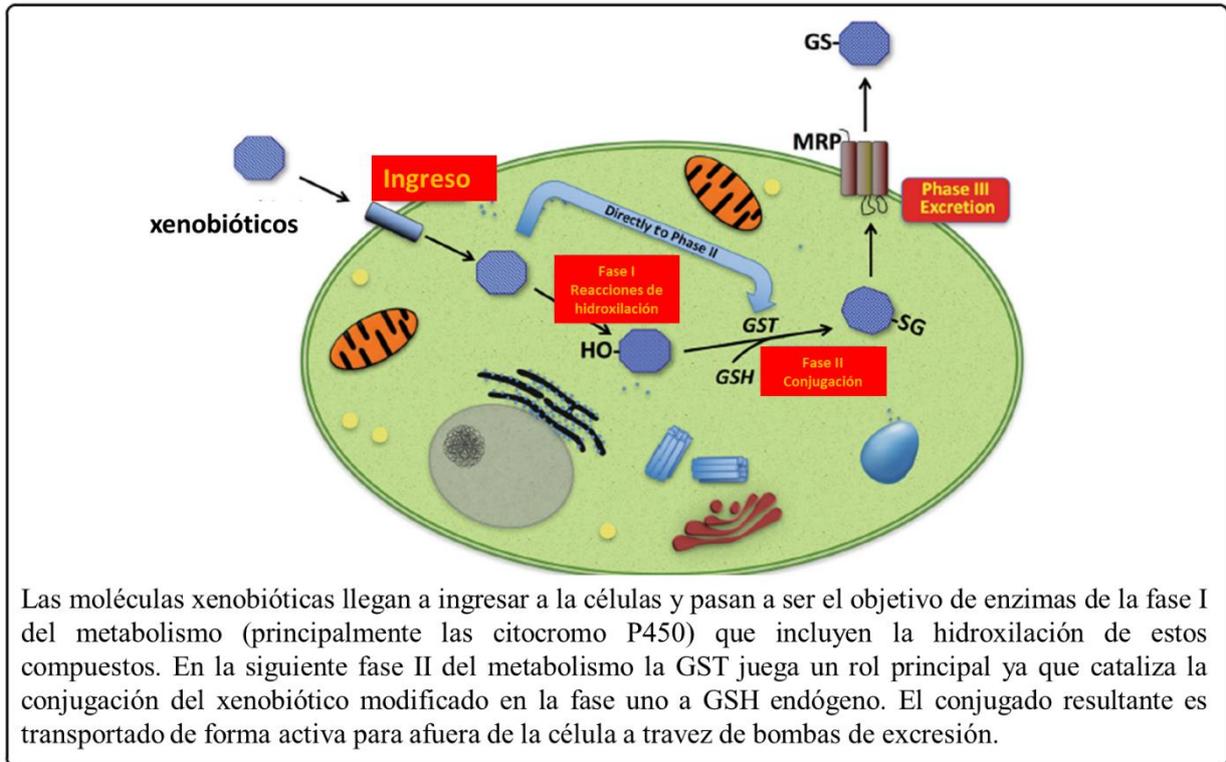


Figura 5. Esquema de la actividad de la GST dentro de la célula (modificado de Allocati et al., 2018).

Los inhibidores enzimáticos son moléculas que interfieren en la catálisis enzimática disminuyendo su velocidad o deteniendo la reacción por completo (Nelson & Cox, 2006). Se han realizado diferentes estudios para evaluar inhibidores de esta enzima como potenciales antiparasitarios en diferentes géneros de parásitos como *Fasciola hepatica* (Farahnak & Brophy, 2004), *Brugia malayi* (filariasis humana), *Setaria cervi* (filariasis bovina)(Ahmad & Srivastava, 2008), *Schistosoma japonicum* (Akumadu et al., 2020) y *Plasmodium falciparum* (Hiller et al., 2006). A su vez habiéndose demostrado que hay moléculas que presentan una actividad inhibidora de la GST (Meneghel, 2015) se posiciona esta enzima como un blanco de elección sobre el cual comenzar a evaluar moléculas potencialmente garrapaticidas.

Por su parte la TIM es una enzima importante que actúa en las vías de glucólisis, así como en las de gluconeogénesis de la garrapata *R. microplus* (Moraes et al., 2011). Cataliza la quinta reacción de la vía glucolítica donde isomeriza a la dihidroxiacetona fosfato a gliceraldehído 3- fosfato. Esta reacción es reversible y en la gluconeogénesis cataliza la reacción inversa, isomerizando el gliceraldehído 3-fosfato a dihidroxiacetona fosfato.

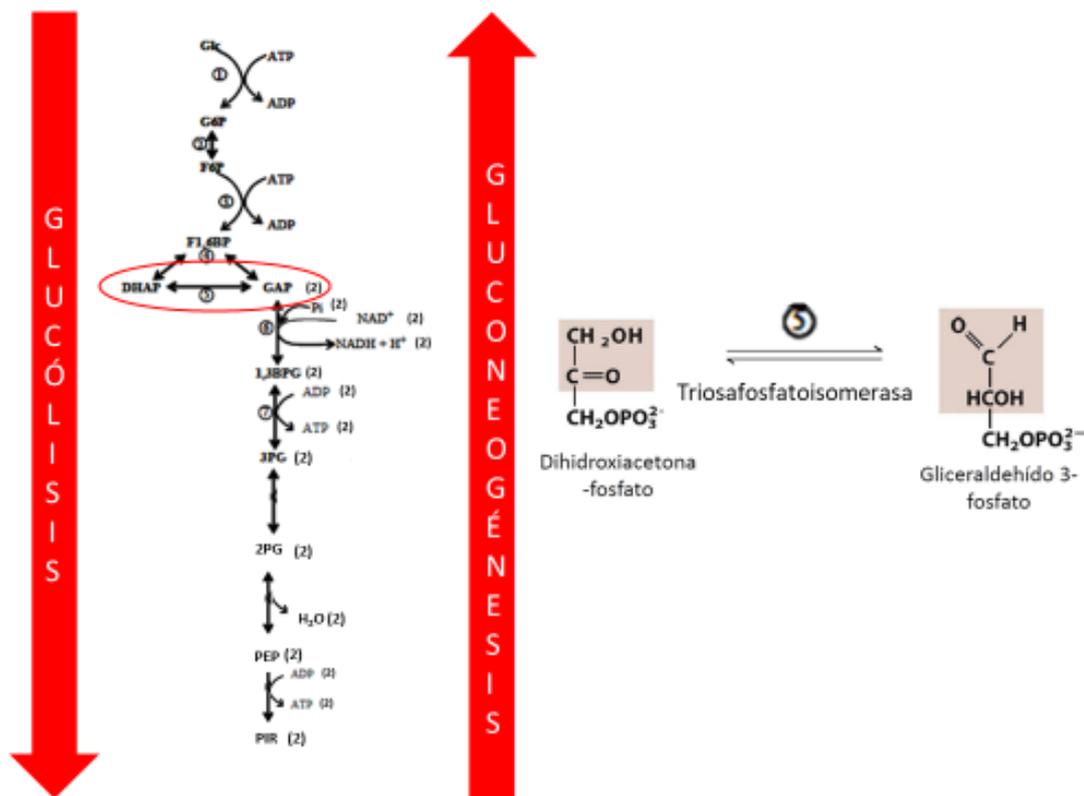


Figura 6. Descripción de la reacción de la triosafosfoisomerasa y lugar de participación en la glucólisis y gluconeogénesis.

De esta forma se posiciona como otro blanco molecular de trabajo con inhibidores, habiendo sido ya estudiada previamente no solo para otros parásitos como *Trypanosoma cruzi* (Álvarez et al., 2010), *Giardia lamblia* (García-Torres et al., 2016) y *Leishmania mexicana* (Alvarez, 2008), sino también para *R. microplus* (Saramago et al., 2018). Por lo tanto, identificar moléculas que presenten actividad inhibitoria de estas enzimas claves en procesos metabólicos como los mencionados anteriormente para este parásito resulta en un importante primer paso en la búsqueda y detección de moléculas con poder garrapaticida.

1.2.5. Investigación actual en la búsqueda de nuevas herramientas para el control de las garrapatas.

Es en este sentido que se han estudiado nuevas alternativas garrapaticidas que permitan sortear el problema de la resistencia a la vez de disminuir impactos en el ambiente (Nari & Hansen, 1999) y cuidar la inocuidad alimentaria (Cuore & Solari, 2022). Muchos de

estos incluyen evaluaciones con extractos vegetales (Cruz et al., 2013; Monteiro et al., 2017; Schwalback et al., 2003; Sepúlveda et al., 2013), hongos entomopatogénicos (Rodríguez Dos Santos, 2023) y bacterias (Samish & Rehacek, 1999). Otras herramientas que se han desarrollado, evaluado y utilizado para el control de la garrapata *R. microplus* son las vacunas. En Uruguay hace más de 20 años se han evaluado diferentes vacunas comerciales y con formulaciones experimentales, con antígenos recombinantes. De momento no se han obtenido resultados eficaces con estas por lo que no han sido aprobadas para su registro y uso en planes sanitarios (Cuore et al., 2019). Diferentes autores han determinado que la variabilidad genética del gen Bm86 podrían explicar esta falla en el resultado (Benavides et al., 2011; Sossai et al., 2005). En 2016 se evaluó la vacuna Go tick, de origen colombiano, cuyo inóculo corresponde a un extracto de proteínas de larvas de garrapatas, con un rango de peso molecular entre 25 y 110 kDa, a una concentración de 1000 µg por dosis contando con una eficacia del 54%. Por último, en 2022 se reportan resultados en Uruguay de una vacuna desarrollada a partir de proteínas expresadas de forma recombinante, provenientes de *R. microplus* de diferentes orígenes del país. En este caso la eficacia global reportada asciende a 70% (Cuore, 2022). De momento, en Uruguay, no se cuenta con vacunas ni garrapaticidas que manejen las tecnologías mencionadas anteriormente (MGAP, 2024).

Capítulo 2. Hipótesis y Objetivos

Hipótesis

1. Es posible utilizar estudios metabolómicos mediante la herramienta de RMN para diferenciar garrapatas susceptibles de resistentes.
2. Es posible detectar nuevas moléculas garrapaticidas mediante el uso de enzimas aisladas de la garrapata como proteínas blanco.

Objetivos

General

Generar herramientas que nos permita enfrentar la situación compleja que plantea la resistencia de la garrapata *R. microplus* a los garrapaticidas.

Específicos

1. Desarrollar una herramienta de diagnóstico rápido de resistencia mediante el uso de la RMN.
2. Detectar nuevas moléculas con acción garrapaticida, como inhibidores de enzimas blanco aisladas de la garrapata.

Capítulo 3. Desarrollo de una técnica de diagnóstico de resistencia por RMN

1. Materiales y métodos.

1.1. Diseño experimental.

Para el desarrollo de una técnica de diagnóstico rápida usando la RMN se utilizó a la cepa “Mozo”, susceptible a todos los principios activos habilitados en Uruguay y mantenida en la DILAVE desde 1973 sin ser presionada por garrapaticidas ni presentar infección con hemoparásitos (DILAVE, 2013). Con esta se realizaron 10 repeticiones utilizando teleoginas y huevos. Las teleoginas se evaluaron individualmente mientras que los huevos se evaluaron de manera grupal, por oviposturas de 10 garrapatas en su conjunto. Para confirmar que el análisis de ¹HRMN realizado a las muestras no reflejó en su resultado interferencia de la sangre ingerida por la garrapata se realizó una evaluación de teleoginas y huevos de la cepa Mozo que fueron extraídos de 4 animales diferentes, así como se comparó el espectro obtenido con la cepa Mozo vs muestras de sangre bovina.

Luego se evaluaron siete poblaciones de campo, evaluándolas en primer lugar por bioensayos tradicionales de diagnóstico de resistencia, PCR y secuenciación genética para caracterizar sus perfiles de resistencia a los garrapaticidas. Los bioensayos utilizados incluyeron el TIA para amitraz y la mezcla de cipermetrina y ethion, el TIA modificado para fluazuron, el TPL se realizó para cipermetrina, ethion, amitraz, fipronil e ivermectina y el TIL para ivermectina y fipronil (Castro Janer et al., 2012; Shaw, 1966). Finalmente, se evaluaron los huevos de estas poblaciones de campo mediante RMN, de manera grupal por oviposturas de 10 garrapatas en su conjunto, comparando entonces espectros de las siete poblaciones de campo, unas 35 muestras incluyendo 5 repeticiones cada una y la misma cantidad de muestras de la cepa Mozo obtenidas de diferentes animales. Se procesaron los datos obtenidos para poder realizar posteriormente un análisis estadístico multivariado y así poder agrupar los datos para correlacionarlos a los diferentes perfiles de resistencia.

1.2. Bioensayos fenotípicos para caracterizar los perfiles de resistencia de las poblaciones evaluadas.

1.2.1 Evaluación de la muestra.

Para la realización de los bioensayos se realizó previamente la evaluación de la muestra recibida para definir si podía ser utilizada para su estudio. Esta debe de llegar sin ovipostura, sin presencia de hongos y dentro de las 24 horas de haber sido extraídas. Luego se seleccionan las teleoginas a utilizar por un tamaño de 0,8 cm o superior, ser uniformes sin deformaciones, de consistencia levemente turgente y color verde oliva con leves vetas más claras. No deben presentar coloraciones rojizas, negras o blancas. Por último, se evalúa la viabilidad por medio de su movimiento y capacidad de caminar.

1.2.2. TIA (Drummond et al., 1973).

Por medio de esta técnica se evaluó la resistencia a amitraz, la mezcla de Cipermetrina (3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetilciclopropano carboxilato de 1-ciano-1-(3-fenoxibencil)metilo) y ethion (dietoxifosfinotioilsulfanilmetilsulfanil-dietoxisulfaniliden-λ5-fosfano) usando como control agua destilada. Para realizar la solución de inmersión se utilizaron productos comerciales de amitraz, (Acarmic, Microsules) a su concentración recomendada para baño de $8,5 \times 10^{-4}$ M, y de la mezcla cipermetrina y ethion (Mixan, La buena estrella) a su concentración recomendada para baño de $2,4 \times 10^{-4}$ M para cipermetrina y $0,1 \times 10^{-2}$ M. Estos productos fueron disueltos en agua destilada. A continuación, se pesaron 10 garrapatas seleccionadas para luego sumergir cada grupo de 10 garrapatas en 30 mL de cada solución (amitraz, mezcla y control) por 1 minuto. Transcurrido ese minuto se secaron levemente con papel secante y se colocaron en placas de petri identificadas por la fecha de realizada la inmersión, la población y el grupo de tratamiento al que corresponden. Estas placas se incuban posteriormente a condiciones ideales (28°C, 85-90%HR, 12 horas luz) por 2 semanas. Transcurridas las 2 semanas se registra el peso de los huevos ovipuestos y se colocan en un tubo de ensayo de vidrio de 1,5 cm de diámetro preparados con 1 mL de agua destilada y un algodón compactado al fondo hasta obtener un tapón de algodón de 1,5 cm de alto, evaluando siempre que la superficie del algodón quede seca. Estos tubos se taparon con una torunda de algodón y se incubaron a condiciones ideales (28°C, 85-90%HR, 12 horas luz) por 6 semanas. Transcurridas las 6 semanas se evaluó el porcentaje de eclosión por método visual. Con estos datos se calcula la RE, el % de control y el porcentaje de resistencia, según lo descrito en introducción.

1.2.3. TIA Modificado para fluazuron (Reck et al., 2014; Saporiti, 2019).

Esta técnica consistió en diluir el estándar de fluazuron (N-[[4-cloro-3-[3-cloro-5-(trifluorometil)piridin-2-il]oxifenil]carbamoil]-2,6-difluorobenzamida, Sigma- Aldrich, Saint Louis, USA) en una solución de 2 % de Tritón X-100 (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA) en acetona (grado técnico, Droguería Industrial del Uruguay, Montevideo, Uruguay) a una concentración de $9,9 \times 10^{-2}$ M, generando así una solución stock. Esta se diluyó con agua destilada para obtener una solución de inmersión de $1,5 \times 10^{-4}$ M, correspondiente a la concentración letal 95% de fluazuron para la cepa Mozo. El procedimiento realizado con esta solución es el mismo que el realizado para el TIA de amitraz y la mezcla de cipermetrina y ethion. La única diferencia es que para este estudio se realizaron 3 repeticiones por muestra y se tomó como % de resistencia al promedio obtenido entre los 3 % de resistencia de cada repetición.

1.2.4. TPL (Miller et al., 2007; Stone & Haydock, 1962).

Por medio de esta técnica se evaluó la resistencia a la cipermetrina, ethion, amitraz, fipronil e ivermectina. Por cada población evaluada se agregaba también un grupo control que consistía en paquetes impregnados con el solvente utilizado y además se corría en paralelo un estudio con *R. microplus* de la cepa Mozo. Las teleógenas recibidas se incubaron a en condiciones ideales (28°C, 85-90 % HR, 12 horas luz) durante 2 semanas. Cumplido este período de tiempo su ovipostura se colocó en tubos de ensayo de 1,5 cm de diámetro. A estos tubos de ensayo previamente se les colocó 1 mL de agua destilada seguido de algodón compactado en el fondo del tubo generando un tapón de 1,5 cm de alto evaluando siempre que la superficie del tapón de algodón quedara seca. Se monitorearon los huevos diariamente hasta detectar su eclosión. Cuando las larvas tenían entre 14 a 21 días de eclosionadas se las utilizó para realizar la prueba.

Se realizó una solución de una parte de tricloroetileno (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) y dos partes de aceite de oliva (Supelco, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) en una relación 2:1, donde se disolvieron los estándares analíticos de los principios activos para los que se evaluó la resistencia de las poblaciones analizadas; cipermetrina (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), ethion (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) , amitraz (amitraz comercial 12,5 %, Acarex), fipronil (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) e ivermectina (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Las concentraciones que se utilizaron para las diluciones fueron las correspondientes a las concentraciones discriminatorias para la cepa susceptible (Mozo), con la cual se pusieron a punto las técnicas en Uruguay. Estas corresponden a $7,2 \times 10^{-2}$ M para cipermetrina, 1×10^{-1} M para ethion, $6,8 \times 10^{-3}$ para amitraz, $6,9 \times 10^{-3}$ para

fipronil y $4,6 \times 10^{-2}$ para ivermectina (6'-butan-2-il-21,24-dihidroxi-12-[5-(5-hidroxi-4-metoxi-6-metiloxan-2-il)oxi-4-metoxi-6-metiloxan-2-il]oxi-5',11,13,22-tetrametilespiro[3,7,19-trioxatetraciclo[15.6.1.14,8.020,24]pentacosa-10,14,16,22-tetraen-6,2'-oxan]-2-ona) (Cuore & Solari, 2013).

Con cada una de estas soluciones se impregnaron papeles filtro (papel filtro hoja 50x50 cm, equiv. Whatman 1, DIU código: 20 67968) rectangulares de 7,5 x 8,5 cm identificados con el principio activo correspondiente a la dilución con la que se impregnaron y la fecha de impregnación. Para esto se utilizaron 0,67 mL de solución por papel distribuyendo la solución de forma homogénea con una pipeta multicanal (F1-Clip Tip, Thermo Fisher) usando nueve tips. Para lograr una mayor homogeneidad se realizaron seis descargas en paralelo, para llegar a los 0,67 mL totales, simétricamente a un lado y otro de la línea media del papel (teniendo como referencia su lado de 7,5 cm). Para el amitraz se realizó el mismo procedimiento, pero utilizando papel de nylon (2320, Cerex Advanced Fabrics, Pensacola, FL). Los papeles, una vez humedecidos, fueron colgados con un clip bull dog, para prevenir que estuviesen en contacto con cualquier superficie, dentro de una campana de extracción de gases a evaporar durante 24 horas. Transcurrido este plazo se los almacenó en freezer ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$), envueltos en papel aluminio, correctamente identificados.

Para testear las poblaciones de los distintos establecimientos muestreados se colocaron aproximadamente 100 larvas sobre cada papel. Estas larvas eran colectadas de la superficie del tubo de ensayo una vez que este era colocado de forma vertical con la abertura hacia arriba, de forma de asegurar que aquellas larvas que se evaluaban habían caminado hasta esa superficie y por lo tanto se las consideraba viables. Los papeles con las larvas se doblaron a la mitad, por el largo de 8,5 cm, cerrándolo en los costados y el borde superior con clips bull dog, formando así los paquetes de larvas. Para cada dilución se realizaron dos réplicas por población de garrapatas testeadas. Estos paquetes se llevaron a incubar a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$, 85-90 % HR, 12 horas luz durante 24 horas. Transcurridas las 24 horas se abrieron los sobres y se contabilizó la cantidad de larvas vivas y muertas por sobre. Si las larvas estaban todas muertas se consideró que las mismas eran susceptibles a ese principio activo y si se encontraban larvas vivas se asumía como resistente. Luego se calculó el porcentaje de mortalidad de cada sobre como $[\text{larvas muertas} / (\text{larvas muertas} + \text{larvas vivas})] * 100$. Cuando en las larvas utilizadas como control la mortalidad fue mayor a 5 % los resultados se corrigieron por la fórmula de Abbot (% de mortalidad

corregida= $[(\% \text{ de mortalidad del grupo tratado} - \% \text{ de mortalidad del grupo control}) / (100 - \% \text{ de mortalidad del grupo control})] * 100$. Cuando esta superó el 10 % se descartaron los resultados. La mortalidad media se calculó con el promedio de las mortalidades calculadas para ambas replicas realizadas por dilución para cada población. Por último, se realizó el cálculo del porcentaje de resistencia a partir de la mortalidad media como $100 - \% \text{ Mortalidad media}$.

1.2.5. TIL (Castro Janer et al., 2012)

Se utilizó esta técnica para evaluar la resistencia de las poblaciones de campo a la ivermectina y el fipronil. Junto a cada población evaluada se agregaba también un grupo control que consistía en la inmersión de 100 larvas en el solvente utilizado, por duplicado, y además se corría en paralelo un estudio con *R. microplus* de la cepa Mozo. Al igual que para el TPL las teleoginas recibidas se incubaron a en condiciones ideales (28°C, 85-90 % HR, 12 horas luz) durante 2 semanas para luego colocar su ovipostura en tubos de ensayo de 1,5 cm de diámetro. A estos tubos de ensayo previamente se les colocó 1 mL de agua destilada seguido de algodón compactado en el fondo del tubo creando un tapón de 1,5 cm de alto, evaluando siempre que la superficie del tapón de algodón quedara seca. Se monitorearon los huevos diariamente hasta detectar su eclosión y cuando las larvas tenían entre 14 a 21 días de eclosionadas se las utilizó para realizar la prueba.

Para la solución de inmersión con ivermectina se realizó inicialmente una solución stock de ivermectina (estándar analítico, SIGMA – Aldrich, Saint Louis, USA), en etanol absoluto a una concentración de $1,1 \times 10^{-2}$ M. Luego esta se diluyó con una solución de agua destilada y tritón X100 al 0,02% (v/v) para realizar una solución intermedia de una concentración de $1,1 \times 10^{-4}$ M. Por último, se realizó la solución de inmersión usando el mismo diluyente para alcanzar una concentración $8,2 \times 10^{-5}$ M, correspondiente a la concentración letal 99,9% para la cepa Mozo. En el caso del fipronil se realizó una solución stock de fipronil en acetona a una concentración de $2,3 \times 10^{-2}$ M. Luego esta se diluyó con una solución de agua destilada con Triton X 100 al 0,04% (v/v) y un 10% (v/v) de acetona para alcanzar una solución de inmersión a una concentración de fipronil de $8,7 \times 10^{-6}$ M correspondiente a la concentración letal 99,9% descripta para a cepa Mozo.

Con ambas moléculas se realizó el mismo procedimiento de inmersión y obtención de resultados. Este consistió en colocar 1 mL de solución de inmersión en un microtubo de

1,5mL, por duplicado para cada tratamiento y control que correspondía al diluyente utilizado para cada solución. Se colocaron los tubos conteniendo las larvas en forma vertical con el extremo abierto hacia arriba. Aquellas que se encontraron en el borde del tubo fueron consideradas viables y se utilizaron para el test. Se colocó un cúmulo de 2 mm de diámetro con aproximadamente 100 larvas en cada uno de ellos, dejando las larvas en inmersión durante 10 minutos homogeneizando manualmente. Luego se extrajeron las larvas y se colocaron en sobres de papel Whatman N°1 cortados en rectángulos de 8,5 a 7,5 cm, doblados a la mitad e identificados con la fecha, muestra y el tratamiento utilizado. Estos sobres se cerraron con pinzas cocodrilo y se incubaron por 24 horas en condiciones ideales (28 °C, 85%-90% HR y 12 horas luz). Transcurridas las 24 horas se abrieron los sobres y se evaluó el % de mortalidad, así como el porcentaje de resistencia según lo descrito anteriormente para el TPL.

1.3 Evaluación por PCR de la resistencia en las poblaciones evaluadas.

Se analizaron mediante PCR a teleoginas y huevos correspondientes a las poblaciones de campo evaluadas mediante bioensayos y se usó a la cepa Mozo como control. Para esto las muestras fueron conservadas a -80 °C hasta su procesamiento. Se detectaron mutaciones asociadas a la resistencia a estos garrapaticidas que están reportadas por lo que se detalla a continuación en la tabla 1 los genes asociados a resistencia para diferentes garrapaticidas que se estudiaron en este trabajo, el tamaño esperado de los fragmentos a obtener, los cebadores utilizados para amplificarlos, así como la secuencia de cada uno.

Tabla 1. Para cada garrapaticida se presentan los genes involucrados en el mecanismo de resistencia, los cebadores utilizados para amplificar la región génica donde se encuentran las variantes asociadas a la resistencia y el tamaño esperado en pares de bases (pb) de la región a amplificar.

Resistencia a piretroides	
<i>Dominio II: amplicón de 167 pb</i>	
Cebador directo	TACGTGTGTTCAAGCTAGCCAA
Cebador reverso	ACTTTCTTCGTAGTTCTTGCCA
<i>Dominio III: amplicón de 173 pb</i>	
Cebador directo	ACCCAAGTGAATAGAGAGCAAGAGGACCAACCGGAATACG
Cebador reverso	ACGCACTTGACTTGTCTTCTCTCTTTTGTTTCATTGAAATTGT
Resistencia a amitraz	
<i>Receptor octopamina β-adrenérgico (BAOR): amplicón de 183 pb</i>	
Cebador directo	GAAATCTGACGGACGAGGAA
Cebador reverso	GCGACACGATGAAGTAGTTG
<i>Receptor octopamina/tiramina (OCT/Tyr): amplicón de 417 pb</i>	
Cebador directo	AGCATTCTGCGGTTTTCTAC
Cebador reverso	GCAGATGACCAGCACGTTACCG
Resistencia a fipronil	
<i>Canal de cloro modulado por GABA: amplicón de 290 pb</i>	
Cebador directo	CGGATTGATCGTGGTTATTT
Cebador reverso	GTTGCTCTGCAAGTTTTGCC

Para la extracción de ADN se emplea el kit “Quick-DNA Miniprep plus kit (ZYMO)”. El kit utiliza una columna de unión de ADN “Zymo-Spin IIC-XLR Column”, que permite purificarlo de otros contaminantes como ARN y proteínas, por lo que puede utilizarse directamente en la reacción de PCR. Se utilizó el protocolo de extracción de ADN para tejidos sólidos según recomendaciones del fabricante, que consistió en cortar la garrapata y pesar hasta 25 mg en un tubo de microcentrífuga (de 1,5 mL). A este se le agregó 95 μ L de agua, 95 μ L de *Solid Tissue Buffer* y 15 μ L de proteinasa K. Se mezcló bien y se incubó en baño de agua a 55 °C durante 1-3 horas o hasta que el tejido se disgregó. Luego se centrifugó a 12.000 x g, durante 1 minuto y se transfirió la fracción soluble a un tubo de microcentrífuga limpio. Se agregaron 400 μ L de *Genomic Binding Buffer* y se transfirió la mezcla a una columna “Zymo-Spin IIC-XLR Column” en un tubo de recolección. Se centrifugó a 12.000 x g, durante 1 minuto y desechó el tubo de recolección con el líquido. En un nuevo tubo de recolección, se agregó 400 μ L de *DNA Pre-Wash Buffer*, se centrifugó durante 1 minuto, y se vació el tubo de recolección. Se añadieron 700 μ L de *g-DNA Wash Buffer*, se centrifugó durante 1 minuto y se vacó el tubo de recolección. Se añadieron 200 μ L de *g-DNA Wash Buffer*, se centrifugó durante 1 minuto y se vació el tubo de recolección. Finalmente se centrifuga durante 1 minuto para eliminar el excedente. Para eluir el ADN, se transfirió la “Zymo-Spin IIC-XLR Column” a un tubo de microcentrífuga (de 1,5 mL) y se añadieron 50 μ L de H₂O mili-Q. Se incubó durante 5 minutos y se centrifugó durante 1 minuto para recuperar el ADN.

Para determinar la concentración de ADN obtenida de cada muestra se mide la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro tipo NanoDrop 2000 (Thermo Scientific), esperando obtener aproximadamente 100 ng/ μ L de ADN en cada muestra. La absorbancia es directamente proporcional a la concentración de ADN, y el software que emplea el equipo la estima según la Ley de Lambert-Beer ($Abs=C*\epsilon*1$), donde C es la concentración de ADN, ϵ es el coeficiente de absortividad molar (para el ADN bicatenario es de 0,020 (μ g/mL)⁻¹ cm⁻¹) y 1 es el paso óptico (distancia que recorre el haz de luz dentro de la muestra y está definida por la cubeta). Para evaluar pureza se analizan los cocientes Abs 260/280 y Abs 260/230. El ADN extraído se conserva a -20 °C hasta su uso.

Para realizar la reacción de PCR se utilizaron los siguientes componentes en un tubo de ensayo: ADN molde (ADN genómico obtenido de la extracción descrita, a partir del cual se va a amplificar la región de interés), cebadores (los cuales están diseñados para hibridar en los extremos de la región a amplificar por lo que estos van a delimitar la secuencia de

interés), ADN polimerasa, desoxinucleótidos trifosfato - dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) y un buffer de pH y fuerza iónica adecuada. Para la síntesis se utilizó un termociclador ((Madigan *et al.*, 2015). La PCR fue realizada según dos protocolos diferentes que se presentan en la tabla 2, siendo el volumen de reacción de 30 μL en ambos casos.

Tabla 2. Protocolos empleados en la PCR. En ambos protocolos se emplea un volumen final de 30 μL . El Platinum™ PCR SuperMix ya contiene ADN polimerasa, los dNTPs y el buffer de reacción.

Protocolo 1		Protocolo 2	
Platinum™ PCR SuperMix	27 μL	PCR buffer 10X	3 μL
		dNTPs 10mM	0,6 μL
Cebador directo	0,5 μL	MgCl ₂ 50mM	0,9 μL
		Taq DNA polimerasa	0,07 μL
Cebador reverso	0,5 μL	Cebador directo	1 μL
		Cebador reverso	1 μL
ADN genómico	2 μL	ADN genómico	1 μL
		H ₂ O miliQ	Completar hasta 30 μL

Para evitar la contaminación cruzada de ADN, los PCR se preparan en una zona limpia separada de la zona donde se agrega el ADNg, para lo que se usa una zona exclusiva para PCR. En todas las reacciones de PCR se incluye un control negativo (usando H₂O miliQ en lugar de ADNg), en el cual no se espera que haya amplificación. Las condiciones empleadas para la PCR se resumen en la tabla 3.

Tabla 3. Condiciones térmicas utilizadas en las reacciones de PCR. Para cada par de cebadores corresponden diferentes ciclos, temperaturas y tiempos de desnaturalización, alineación y extensión.

Cebador	Desnaturalización inicial	Desnaturalización	Alineación	Extensión	Extensión final
BmNa (DOMINIO II)	95°C - 3 min	95°C - 30s	50 °C - 30 s	68°C - 30 s	68 °C - 5 min
		40 ciclos			
RmNa-cola (DOMINIO III)		95°C - 30s	65 °C - 30 s	68°C - 30 s	
		40 ciclos			
OAR		95°C - 30s	68 °C - 30 s	68°C - 30 s	
		40 ciclos			
BAOR		95°C - 30s	56 °C - 30 s	68°C - 30 s	
		30 ciclos			
GABA		95°C - 30s	58 °C - 30 s	68°C - 30 s	
		30 ciclos			

Para visualizar el resultado de la PCR se lleva a cabo una electroforesis en gel de agarosa, en la que los fragmentos de ADN migran en función de su peso molecular en presencia de un agente intercalante que permite su visualización en el gel. Para ello, se realiza un gel de agarosa al 2 %, usando como colorante de carga *DNA Loading Dye 6x* (Thermo Fisher) y un marcador de peso molecular en el rango de 100-3000 pb (GeneRuler 100 pb Plus, Thermo Fisher). Se utiliza una cuba de electroforesis horizontal, en la cual se coloca el amortiguador de corrida TAE 1x hasta cubrir el gel. Se deposita una gota del *DNA Loading Dye* en un parafilm por cada muestra a sembrar, luego se agregan 10 µL de la muestra sobre la gota de colorante y se homogeniza con la pipeta. Para cargar el gel, se introduce cuidadosamente la punta de la pipeta en el pocillo del gel y se dispensa el contenido (Asuar, 2023). Se realiza la corrida a 100 V durante aproximadamente 25-30 minutos. El gel se tiñe con *SYBR Safe DNA gel stain* y para la visualización del ADN se emplea un transiluminador UV.

La secuenciación del ADN se realizó en la empresa Macrogen, para lo cual se enviaron 10 μL de cada producto de PCR (pPCR) y los correspondientes cebadores para su secuenciación.

1.4. Procesamiento de muestras para la obtención de los espectros de RMN.

Se utilizaron garrapatas adultas en estadio de teleoginas, larvas y huevos. Las teleoginas se evaluaron de manera individual mientras que los huevos y larvas se evaluaron de forma grupal, pesando entre 150 y 300 mg provenientes de una ovipostura de al menos 10 teleoginas de una misma población. Estas muestras se colocaron en tubos de 1,5mL a los cuales se les agregó 300 μL de buffer fosfato pH 7,4 y 300 μL de cloroformo. Posteriormente las muestras fueron destruidas con un homogeneizador eléctrico (BeadBugTM microtube homogenizer AC/DC input 115 V AC) a una velocidad de 6 por 2 minutos. Esta muestra homogeneizada se centrifugó a 10000 rpm por 10 minutos para poder extraer la fase acuosa de su contenido. Seguido a esto se agregó 300 μL de agua deuterada a cada muestra y se analizó por RMN para obtener los correspondientes espectros.

1.5. Procesamiento de las muestras por RMN.

El equipo utilizado fue un RMN Bruker AVANCE III de 500 MHz que tiene la sensibilidad necesaria para estudios de metabolómica, debido a que cuenta con una sonda inversa con gradiente-z y alta sensibilidad de ^1H . Los espectros se obtuvieron utilizando supresión del pico de agua y en la modalidad de secuencias de pulsos del tipo Carr-Purcell- Meiboom-Gill (CPMG), para eliminar las señales correspondientes a proteínas y otros biopolímeros de alto peso molecular que podrían interferir en el análisis. El procesado de los espectros, incluyendo el apodizado, la corrección de fase, y la corrección de línea de base, se llevó a cabo con el software MNova (MestreLab Research, S.L.). Este programa permite la superposición, alineado, normalización, y reducción espectral (“binning”) (Anderson et al., 2011; Veselkov et al., 2009).

1.6 Procesamiento estadístico de los espectros

Los análisis estadísticos multi variados (AEMV) se efectuaron utilizando el paquete estadístico PLS_Toolbox (Eigenvector Inc.) implementado para MATLAB (The MathWorks Inc.). Fue necesario realizar un escalado por el factor de Pareto y un centrado en la media previamente, dado que las variables que se encontraron presentaron distintos

rangos de magnitud. De este modo, regiones del espectro que presentaron diferente rango de intensidad se pudieron comparar e incluir en un modelo paramétrico. Los AEMV empleados incluyeron métodos no supervisados y supervisados. Dentro de los primeros, el análisis por componentes principales (PCA), permitió discriminar entre las clases sin tener en cuenta la clasificación de los datos. También identificó patrones y tendencias, y detectó muestras atípicas o outliers. A continuación, se realizó un análisis supervisado que utilizó la información de la clasificación de las muestras para diferenciar entre clases; análisis de mínimos cuadrados parciales ortogonales (MCPO). El conocimiento previo de las muestras permitió maximizar la covarianza entre los grupos, explicando la separación a través de variables latentes, así como podría eventualmente identificar los metabolitos con valor predictivo que más aportan a la separación entre las clases. Los métodos se validaron por simulaciones de Monte Carlo (validación cruzada). Aquí los datos se dividen de forma aleatoria en subgrupos para reconstruir el modelo excluyendo cada vez cada uno de los subgrupos. Con esta información, se calcularon los parámetros de bondad de ajuste (R^2) y la capacidad de predicción (Q^2) del modelo, y se graficaron las curvas de ROC con la estimación de sensibilidad y especificidad, a través de los cuales se verificó el ajuste del modelo. La validación del método de predicción se realizó a través del test de permutaciones, que determina si la clasificación de las muestras en sus correspondientes grupos es significativamente mejor que cualquier otra clasificación obtenida de forma aleatoria. Para ello las clases de cada una de las muestras se permutó aleatoriamente y se construyó un nuevo modelo; este proceso se repite n veces (mínimo 100 iteraciones), esperando que los valores de R^2 y Q^2 disminuyan significativamente respecto a los del modelo original.

2. *Resultados y Discusión*

2.1 *Perfiles de resistencia de las garrapatas evaluadas por bioensayos y PCR.*

Se realizaron los bioensayos obteniendo los perfiles de resistencia fenotípica de las 60 poblaciones evaluadas. Todas estas demostraron ser multirresistentes a todas las moléculas testeadas excepto por la población 7, 8, 11, 12, 22, 44 y 46 que se pueden observar en la tabla 4. Estas poblaciones fueron por lo tanto seleccionadas para evaluar por RMN. Se destaca que muchas poblaciones que no demostraron resistencia por el TPL sí la demostraron por TIA o TIL. Esto puede deberse a la diferencia entre las concentraciones usadas para estos bioensayos, ya que el TPL utiliza la concentración

discriminatoria, mientras que el TIA utiliza la concentración sugerida para baño y el TIL las CL 99,9 %. Por otro lado, es importante tener presente que el TIA evalúa otras variables vinculadas a al desempeño reproductivo de las garrapatas y no solamente su mortalidad. Por último, ha sido sugerido en la literatura que las técnicas de TIL son más sensibles para detectar la resistencia a ivermectina y fipronil (Castro Janer et al., 2012). De este modo si alguna población daba susceptible a una molécula con el TPL y resistente por el TIA o TIL entonces era considerada resistente. Por otro lado, también se puede observar que existen poblaciones de campo que no presentan datos para el resultado de resistencia para fluazuron. Esto se debe a que llegaba una muestra de volumen insuficiente. La bibliografía ha demostrado que el TIA modificado para fluazuron si bien es una técnica recomendada para evaluar un gran número de muestras, ya que es práctica y el tipo de muestra requerida no es compleja de obtener, es poco precisa (Saporiti, 2019). Es por esto que para lograr una mayor sensibilidad se realizaron 3 repeticiones y si no se obtenía un volumen de muestra suficiente como para realizarlas no se realizaba este test.

Se pudo evaluar mediante PCR los SNPs reportados para el gen del dominio II del canal de sodio: T170C, G184C, C190A, C190G y G215T. Todas las poblaciones para las que se encontraron los SNPs evaluados tenían resistencia fenotípica a piretroides. Se destaca que se detectó la mutación del C190A en todas las poblaciones menos la 9 y 20. Esta se halló incluso en poblaciones que tenían individuos susceptibles a los piretroides en el análisis fenotípico lo cual coincide con hallazgos previos en un trabajo realizado en Uruguay (Janer et al., 2021) donde este SNP fue encontrado en todas las poblaciones evaluadas. Estas mutaciones podrían no estar expresándose, pero también podría ser debido a que la distribución de la resistencia dentro de una población de individuos no fuera homogénea. Por lo tanto, dentro de esta existan individuos susceptibles y resistentes. Si bien la población 9 demostró tener resistencia a los piretroides mediante los bioensayos fenotípicos, esta no se confirmó a nivel molecular. Esto podría explicarse porque se contó solo con una teleogina para realizar la evaluación que implica un nivel muy bajo de representatividad de la resistencia en la población. Por otro lado, podría ser que contara con algún mecanismo de resistencia que no esté descrito ni se conozca la genética que lo explique. No se detectaron los SNPs G184C, C190G ni G215T en ninguno de los establecimientos coincidentemente con los resultados obtenidos por Janer et al., 2021 donde tampoco se hallaron. El polimorfismo T170C (*super kdr*) fue diagnosticado en una de las muestras de la población 20, siendo esta la primera vez que se registra ese

polimorfismo en Uruguay. Para el caso de las poblaciones 10, 23 y 28, no se pudo evaluar la presencia de los SNPs dado que se disponía de una única muestra de garrapata y las secuencias obtenidas fueron descartadas por ser de mala calidad. No se encontraron los SNPs evaluados para el gen del dominio III del canal de sodio que demuestren la resistencia fenotípica observada en las poblaciones, así como fue observado por (Janer et al., 2021). En cuanto a la resistencia evaluada para amitraz por PCR para el gen OAR se observó que la mutación A22C se encuentra presente en la mayoría de las poblaciones evaluadas, incluso para la cepa Mozo. También se detectó la mutación T65C en varios establecimientos, pero en este caso no se identificó en la cepa de referencia Mozo. Estas mutaciones fueron previamente asociadas a la resistencia a amitraz (Chen et al., 2007), comparando garrapatas susceptibles y resistentes a este garrapaticida provenientes de México y Brasil. Sin embargo, los autores también reportan que estas mutaciones no están presentes en garrapatas australianas que contaban con resistencia a este fármaco. Esto expone la existencia de otros mecanismos de generación de resistencia diferentes de las mutaciones existentes en el blanco molecular. Entre estos, se encuentran variaciones en las enzimas que participan en la detoxificación metabólica de estos compuestos, y en particular los genes que codifican para las enzimas citocromo P450 (CYP450) son candidatos a estar vinculados a este mecanismo de resistencia (de La Canal et al., 2021). Resulta muy llamativo que se encuentra la mutación A22C en la cepa susceptible de referencia; Mozo. Sin embargo, se ha detectado la presencia de estas dos mutaciones (A22C y T65C) en garrapatas susceptibles al amitraz provenientes de las Islas Filipinas (Alota et al., 2021). Por lo tanto, hace creer que si bien estas mutaciones puedan contribuir a la resistencia al amitraz no sean determinantes de la misma. No se detectó ninguno de los SNPs para el gen OAR en los establecimientos 9, 10, 13, 14, 21, 23, 27 y 28. Varios de estos establecimientos (9, 13, 14 y 21) mostraron alta resistencia al amitraz por bioensayos fenotípicos. En estos casos el no hallar la mutación podría deberse al bajo volumen de muestra, lo que constituye una limitante para el análisis genético, dado que la representatividad de la población en estos casos no es buena. También como se mencionó anteriormente expone la posibilidad de la existencia de otros mecanismos de generación de resistencia diferentes de las mutaciones existentes en el blanco molecular. En cuanto a la resistencia al amitraz vinculada al gen BAOR no se detectó ninguno de los SNPs estudiados en el trabajo. En cuanto a los 7 SNPs asociados al gen GABA para la resistencia al fipronil, ninguno fue detectado en este estudio, si bien en estudios anteriores los han detectado. Por ejemplo, un estudio detectó los SNPs G842C, G856T/C, G949A,

A982G y G985T en garrapatas de Uruguay y Brasil (Castro Janer et al., 2019). Otro estudio más reciente realizado en garrapatas de Uruguay reportó el SNP G856T/C en varias poblaciones de campo. Sin embargo, sugieren que no hay asociación de este alelo con la resistencia evaluada a nivel fenotípico (Janer et al., 2021), algo que podría estarse viendo reflejado en este trabajo.

Tabla 4. Resultados de resistencia por bioensayos y PCR de las poblaciones seleccionadas para evaluar por RMN

Nº de población	Se concluye resistencia por bioensayos a						Se sugiere resistencia por PCR a		
	Cip	Eth	Ami	Fipro	Ivm	Flz	Cip	Ami	Fipro
MOZO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	C190A	A22C	NO
7	Sí	Sí	Sí	Sí	NO	ND	C190A	A22C/T65G	NO
8	Sí	Sí	NO	NO	NO	Sí	C190A	A22C/T65G	NO
6	Sí	NO	NO	NO	NO	ND	C190A	A22C/T65G	NO
5	Sí	Sí	Sí	Sí	NO	Sí	C190A	A22C/T65G	NO
9	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	NO	NO	NO
10	Sí	Sí	Sí	Sí	NO	Sí	ND	NO	NO
11	Sí	Sí	NO	Sí	NO	Sí	C190A	A22C/T65G	NO

Cip (cipermetrina), Eth (ethion), Ami (amitraz), Fipro (fipronil), Ivm (ivermectina), Flz (fluazuron). ND (no hay datos).

2.2 Puesta a punto de método de obtención de espectros y análisis metabólico.

Inicialmente se buscó trabajar también con larvas, pero las muestras no se lograron destruir con el homogeneizador eléctrico, por lo que se intentaron otras alternativas como un homogeneizador manual de vidrio, ultrasonido, un mortero con la muestra a temperatura ambiente y luego congelada con nitrógeno líquido, no teniendo éxito en ninguno de los casos. Dado este resultado se continuó trabajando con la muestra homogeneizada de teleoginas y huevos. Se fijó la cantidad óptima de muestra a ser utilizada para la extracción de metabolitos realizando los espectros correspondientes y viendo la calidad de los mismos. Se decidió utilizar como muestra preferencial huevos, debido a que representan mejor la genética de las poblaciones en estudio. Como se explicó en la sección anterior no fue posible obtener muestras en cantidad suficiente con un mínimo de 10 espectros por muestra de poblaciones con resistencia a un solo grupo químico. Si fue posible obtener un número de muestras necesario para analizar el comportamiento de poblaciones resistentes y susceptibles. Para ello analizamos 35 espectros de poblaciones resistentes (con variado perfil de resistencia según se demostró en la sección anterior) y 35 de susceptibles (cepa Mozo). Con estos espectros realizamos el análisis estadístico descrito en la metodología para desarrollar un método de

discriminación entre las dos poblaciones. Todos los espectros obtenidos se alinearon (Figura 7) y procesaron previamente al análisis estadístico y desarrollo del método, luego se analizaron inicialmente con un PCA (Figura 8).

Figura 7. A) Todos los espectros obtenidos procesados y alineados B) Acercamiento de la zona aromática donde se puede ver una mayor diversidad de señales y diferencias en la población susceptible y las resistentes, donde en estas últimas hay mayor diversidad de metabolitos aromáticos.

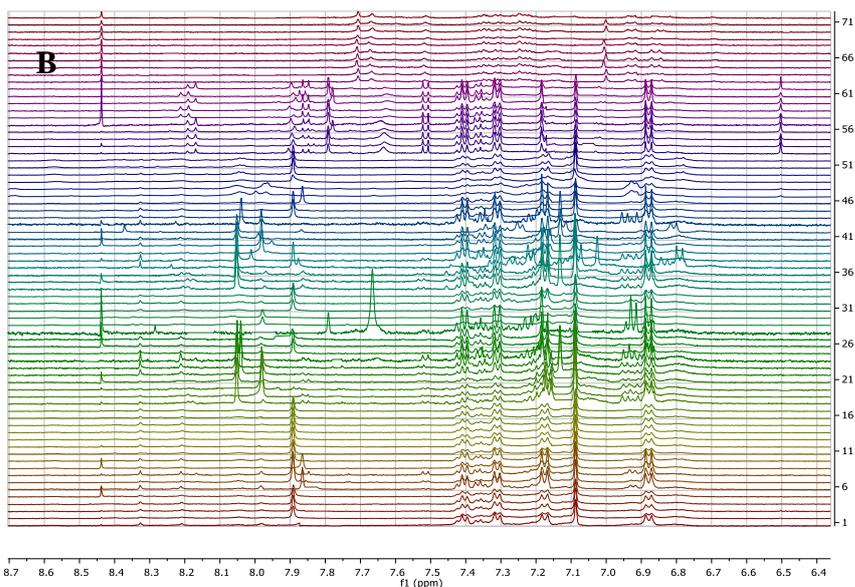
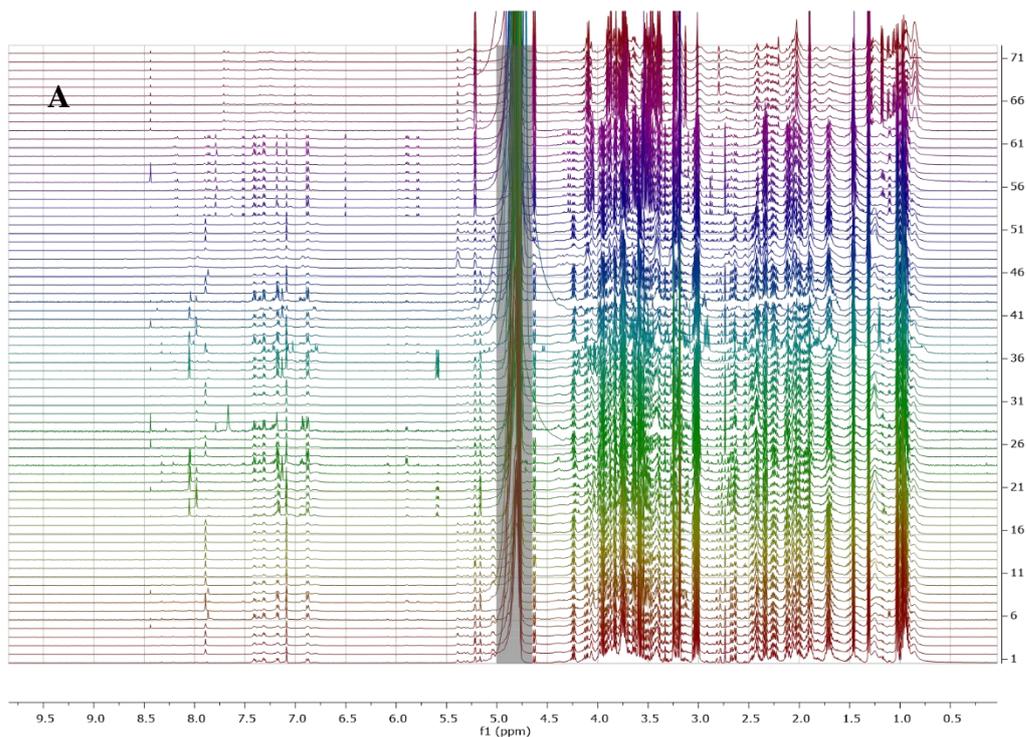
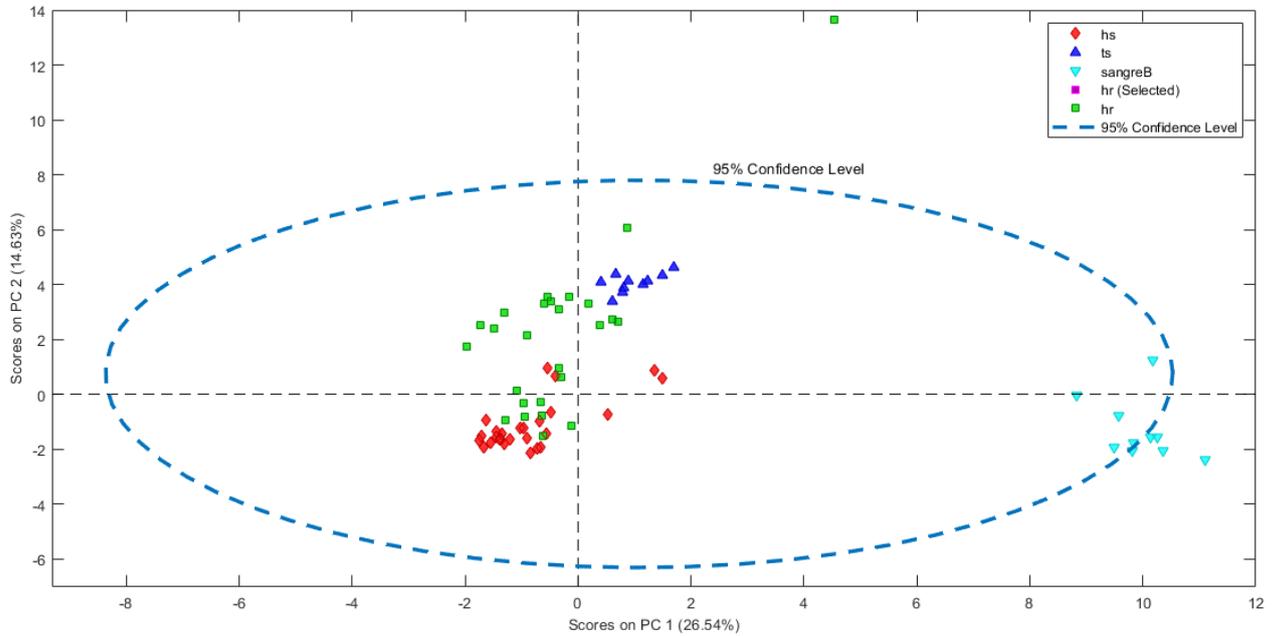


Figura 8. PCA de todas las muestras estudiadas, es el primer paso para agrupar posibles diferencias entre el conjunto de señales de los espectros en la figura se muestra las diferentes clases, en rojo metabolitos de huevo de cea Mozo, en azul metabolitos de teleoginas de Mozo, en celeste suero bovino, en verde metabolitos de huevo de poblaciones resistentes.



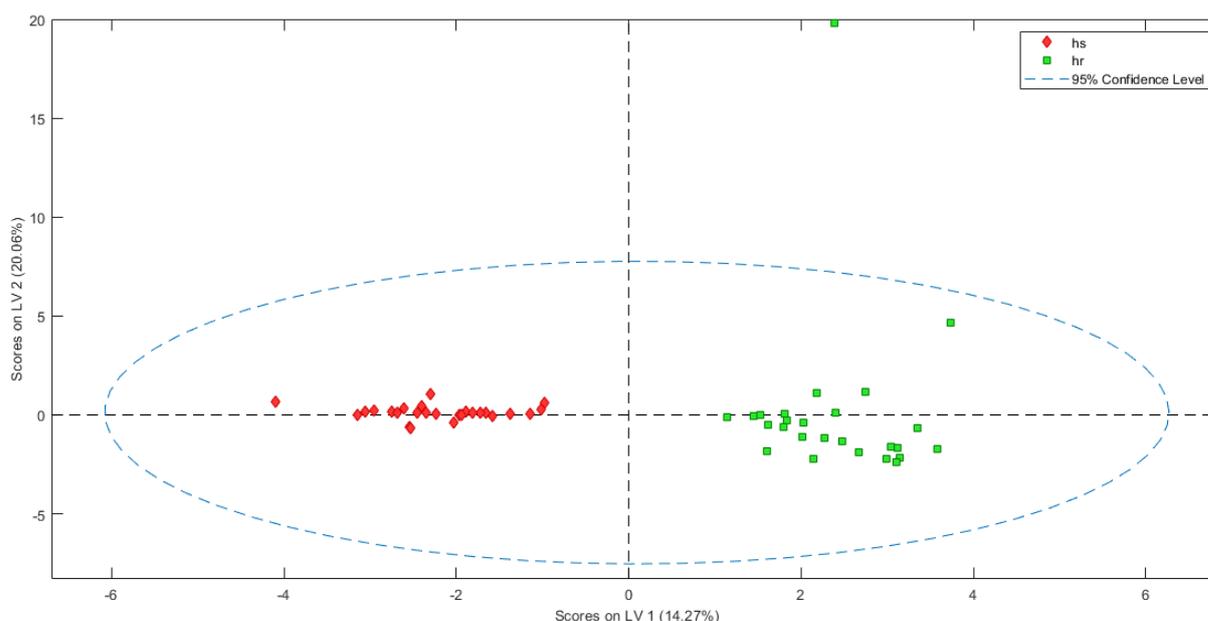
hs (huevos de cepa sensible Mozo), *ts* (teleógina de cepa sensible Mozo), *sangreB* (suero bovino), *hr* (huevos de poblaciones resistentes).

Del estudio de PCA se puede observar la calidad de las réplicas entre las diferentes clases de espectros donde mayoritariamente se agrupan las muestras de las distintas clases y también se identifica una que escapa de los grupos clasificados. Esta última se debe a la baja calidad del espectro por la cantidad de muestra analizada. También observamos que el suero de bovino no interfiere con el análisis de las muestras si es que existiría contaminación de metabolitos del mismo en las muestras de teleoginas, de todas formas, también hay que comparar con espectros de sangre total bovina. Según este análisis la calidad de los espectros es suficiente para realizar el siguiente análisis de mínimos cuadrados parciales ortogonales (MCPO). Este permite desafiar las muestras y buscar diferencias significativas desarrollando un método que sea capaz de identificar muestras de dos poblaciones distintas. Para ello realiza un proceso interactivo de comparación de muestras donde compara sin clasificación de clases las distintas muestras y realiza las agrupaciones que puede medir la calidad del método mediante los parámetros de Q2 y R2.

Estos deben ser mayores a 0.6 y 0.8 respectivamente y los arrojados en el proceso interactivo deben ser menores a estos, es decir los Q2 y R2 del método desarrollado con las poblaciones clasificadas debe ser mejor estadísticamente que los del método desarrollado con las muestras sin clasificar.

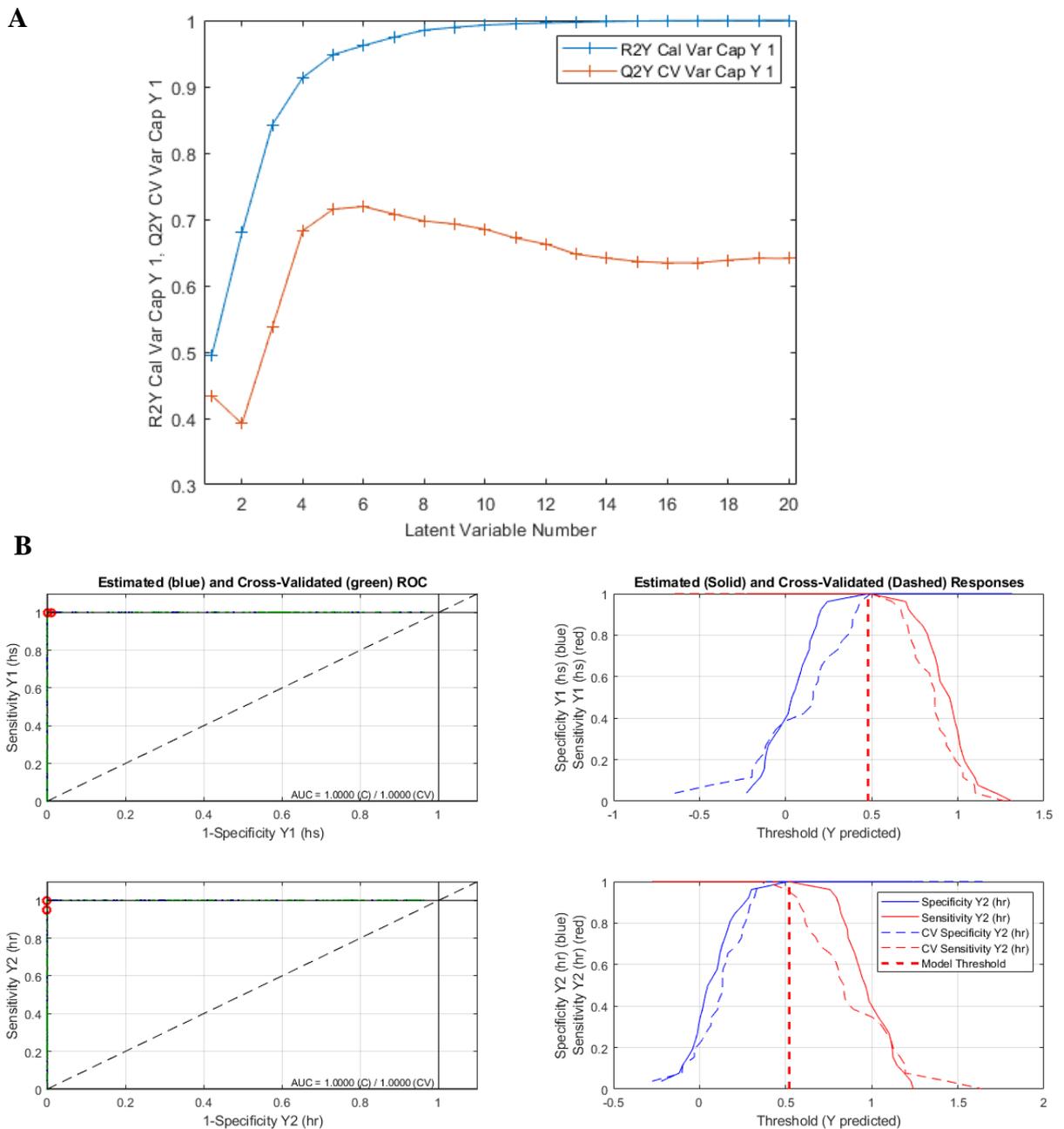
El análisis mediante MCPO (Figura 9), demuestra que las poblaciones susceptibles y resistentes tienen un perfil metabólico significativamente diferente y que es posible entonces identificar poblaciones problema por este método debido a que los valores estadísticos fueron superiores al del estudio randomizado, demostrado así la robustez del método (Figura 10).

Figura 9. MCPO de los 35 espectros de metabolitos de huevo de cepa Mozo susceptible (rojo) y de 35 espectros de poblaciones resistentes (verde).



Además, se puede observar que la variabilidad dentro de las poblaciones resistentes es baja considerando los perfiles descritos mediante el diagnóstico por bioensayo y molecular, alertando la homogeneidad de la resistencia en las poblaciones de campo en la zona analizada (norte del Río Negro, principalmente Artigas y Tacuarembó). Lo mismo podemos decir de la homogeneidad de la cepa Mozo debido a que estas muestras fueron tomadas en distintas épocas, de distintos animales y aun así tienen perfiles metabólicos estadísticamente similares.

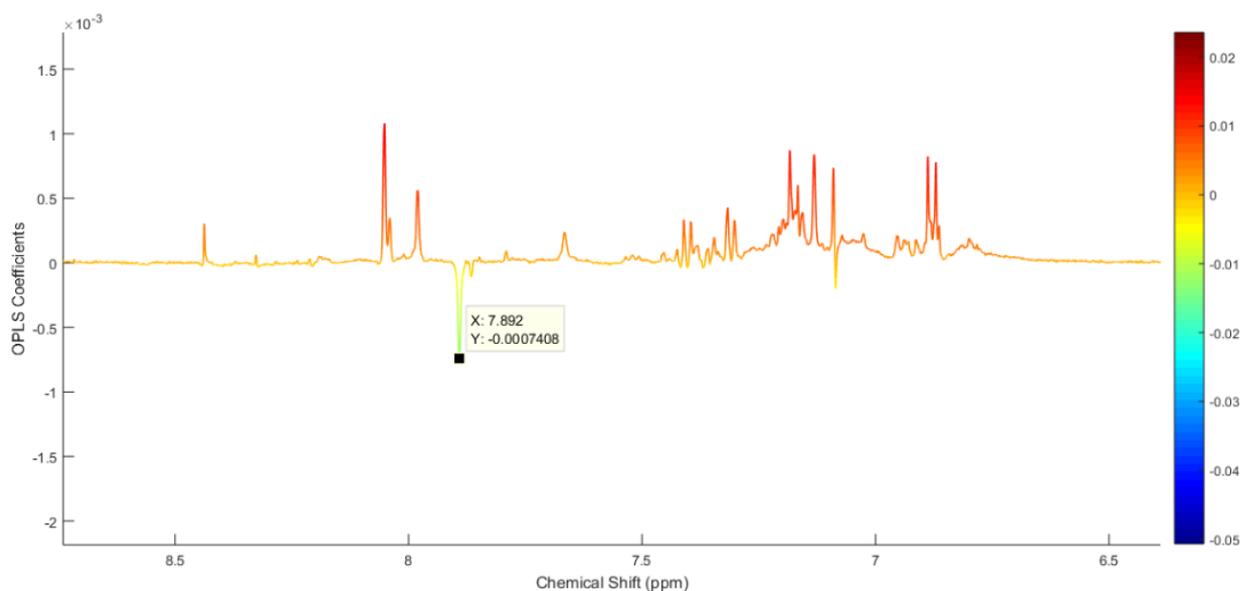
Figura 10. Análisis estadístico del método A) parámetros de bondad de ajuste (R^2) y la capacidad de predicción (Q^2) del modelo, y B) curvas de ROC con la estimación de sensibilidad y especificidad.



La calidad de los espectros además permite un análisis más detallado de los metabolitos presentes, de estos espectros ricos en información, se podría analizar los mecanismos de resistencia a estos garrapaticidas. En la figura 11 se muestran las señales de protón que diferencian a la población susceptible de las resistentes y preliminarmente se puede observar la presencia de metabolitos como histidina, n-acetil aspartato, lactosa, manosa

uridina monofosfato entre más de 10 metabolitos diferentes que se encuentran en una y no en otra población.

Figura 11. Gráfico de señales de HIRMN de susceptibles vs resistentes. En la región positiva están las resistentes y en la negativa las susceptibles.



Finalmente se puede decir entonces que es posible diferenciar poblaciones resistentes de susceptibles mediante muestras de metabolitos de huevo de garrapata, por ende, el método desarrollado puede diferenciar una muestra problema de campo y clasificarla en susceptible o resistente, sin poder por el momento determinar el tipo de resistencia. Entonces esto permitiría un diagnóstico rápido y preliminar en menos de 5 días, y dar una respuesta al productor para la toma de decisiones. Para poder realizar un método que diferencie la resistencia entre grupos químicos es necesario contar con un mayor número de muestras por tipo de resistencia, pero preliminarmente se podría decir que es posible hacer un diagnóstico más detallado en esas condiciones debido a que la única muestra incluida en este ensayo que tenía una resistencia a un solo grupo químico fue una de las que se puede observar cómo levemente diferente en la Figura 8 donde hay una superposición de muestras con la cepa Mozo.

Capítulo 4. Evaluación de moléculas como inhibidores de las enzimas TIM y GST.

1. Materiales y métodos.

1.1 Diseño experimental.

El estudio de moléculas con efecto garrapaticida comenzó por la evaluación de estas enzimas recombinantes de *R. microplus* GST y TIM. Se seleccionaron un grupo de moléculas que pertenecían a la colección de moléculas del Laboratorio de Moléculas Bioactivas, según su actividad antiparasitaria frente a otros parásitos, así como por su similitud estructural con otras moléculas inhibidoras de estas enzimas. Luego la TIM fue producida por el laboratorio del Dr. Ruy Pérez Montfort del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Autónoma de México y la GST por el laboratorio del Dr. Itabajara da Silva Vaz Jr (Faculdade de Veterinaria, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil). Se evaluaron específicamente 86 moléculas como potenciales inhibidores de la TIM (Álvarez et al., 2017; Lawrence & Mason, 2012) y 160 con la GST. Por último, se continuó trabajando con las que presentaron mayor poder inhibitorio (inhibición >30%) para realizar una curva de dosis respuesta. Por otro lado, se evaluó el efecto garrapaticida por medio de bioensayos para 33 compuestos seleccionados según su efecto antiparasitario frente a otros parásitos (*F hepatica*, *T. cruzi* y *Leishmania spp.*) y aquellos que demostraron inhibición de las enzimas evaluadas. Por último, se evaluó la citotoxicidad y otros parámetros farmacocinéticos del compuesto más prometedor en esperma bovino y por medio del software de libre acceso SwissADME software (<http://www.swissadme.ch> accedido 25 noviembre 2024).

1.1. Evaluación de la actividad de los compuestos en las enzimas TIM y GST.

1.2.1. Síntesis recombinante de TIM y GST.

1.2.1.1. TIM.

Para la producción de las enzimas TIM de *R. microplus* (RmTIM) y *Homo sapiens* se clonaron los genes en el sistema de plásmido pET 3^a (RmTIM) y pET3^b (HsTIM) (Aguirre et al., 2011). Se purificó desde células BL21(DE3) codon plus RIL que se crecieron en medio Luria Bertani con ampicilina 100 µg/mL y cloranfenicol 30 µg/mL. Los cultivos se indujeron con 1 mM de isopropil-beta-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) (21 °C por 16 hrs). Las células inducidas se centrifugaron y el paquete celular se sonica en amortiguador A (fosfato de sodio 50 mM pH8, NaCl 500 mM, imidazol 10 mM), después de ultra

centrifugado a 40K rpm, el sobrenadante se purificó en una columna de níquel His Trap HP 5 mL con un gradiente de 10 a 500 mM de imidazol. Se utilizó enterocinasa para eliminar la etiqueta de His. La purificación fue monitoreada por electroforesis en SDS-PAGE (Saramago et al., 2018).

1.2.1.2. GST

Las secuencias decodificantes para RmGST fueron clonadas en lisógenos de XL1-Blue/rBmGST luego de crecimiento en un medio de Luria – BertNI (Rosa de Lima et al., 2002). Cultivos de *Escherichia coli* BL21(DE3) y *E. coli* AD494(DE3) se transformaron con plásmidos pET43a_GST-Av, pET43a_GST-HI, pET43a_GST-Rd y pET43a_GST-Rm, pET43a_GST-Ra respectivamente. Los cultivos se indujeron con la adición de IPTG 1mM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) por 6 o 18 horas a 37°C. El cultivo fue posteriormente centrifugado a 16,000 x g por 10 min a 4 °C y los pellets lavados con PBS pH 7,2 para almacenarse a – 20 °C. Luego se resuspendieron los pellets con el PBS y se lisaron con ultrasonido en 5 ciclos de 30 pulsos por 30 segundos (Pulse Sonics Vibra-cell VCX 500- 700, Sonics & Materials, Inc., Newtown, CT, USA). Las proteínas se purificaron por cromatografía de afinidad usando 1 mL de GSTrap 4B (Ge Healthcare, Chicago, IL, USA). Se equilibra la columna inicialmente con un buffer PBS 7,4. Se coloca la muestra y se lava con PBS pH 7.4. Para eludir las proteínas se utilizó un buffer 50 mM Tris-HCl 10 mM reducido en glutatión pH 8,0. La purificación de la proteína fue luego verificada por electroforesis SDS-PAGE. Se cuantificó la proteína purificada mediante medición de la absorbancia UV a 280nm. Las fracciones que contenían proteína se dializaron con Tris-HCl pH 7.4 100mM por 12 horas a 4°C (Ndawula et al., 2019). Esto fue realizado en el Laboratorio del Dr. Itabajara da Silva Vaz Jr (Faculdade de Veterinaria, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil).

1.2.2. Medición de la actividad enzimática.

1.2.2.1 TIM.

La actividad enzimática de la RmTIM y HsTIMse determinó a 25 °C siguiendo la conversión de gliceraldehído 3 –fosfato (G3P) a dihidroxiacetona fosfato (DHAP) utilizando como enzima acoplante la alfa-glicerolfosfato deshidrogenasa (alfa-GDH) y monitoreando la disminución de la absorbancia a 340 nm y 25°C en un lector multiplacas Varioskan™ Flash Multimode Reader (Thermo Scientific™,Waltham, MA, USA). La

mezcla de reacción (1mL pH 7,4) contenía 10 mM de EDTA, 0,2 mM NADH, 1mM gliceraldehido 3 fosfato y 0,9 unidades de glicerol fosfato deshidrogenasa. El inicio de la reacción estaba determinado por el agregado de 5 ng/mL de RmTIM. De esta manera el 100% de actividad enzimática fue determinada por la reacción de la enzima sin compuesto con 2 hrs de incubación como control negativo a 10% DMSO (Saporiti et al., 2022).

1.2.2.2 GST

La actividad enzimática de la RmGST se determinó usando los sustratos 1-chloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) y 3,4-dichloronitrobenzene (DCNB) (Sigma- Aldrich) a 25°C con espectrofotómetro VersaMax™ Microplate Reader) midiendo el aumento en la absorbancia producido por el aumento en el conjugado (CDNB-SH). Este es producto de la reacción catalizada por la GST, quien conjuga el 1-chloro-2,4-dinitrobenzene con el grupo tiol del glutatión (GSH). Las lecturas se realizaron cada 15 segundos por 30 minutos a 340nm observándose un aumento en la absorbancia (da Silva Vaz et al., 2004; He, C. Chen, et al., 1999). Para la mezcla de reacción se diluyeron los sustratos CDNB a 1 mM y DCNB a 1 mM en metanol y se agregaron a la reacción en buffer Tris-HCl a 100 mM y pH 7.4 y glutatión reducido a 3 mM. Esta mezcla se realizó en placas de 96 pocillos y se agregó 1.6 µg de proteína recombinante en un volumen final de 100 µL. El control negativo consistió en buffer, GSH, and CDNB sin agregado de la enzima a 10% DMSO. Cada ensayo se realizó por triplicado en dos experimentos independientes.

1.2.3. Medición de la inhibición de la actividad enzimática.

2.6.3.1. TIM

La inhibición de la actividad enzimática de la RmTIM y HsTIM se realizó mediante su incubación a 5 µg/mL en amortiguador trietanolamina 100 mM pH 7.4, 10mM de EDTA y 10% de DMSO a 25°C por 1 hora. La mezcla también contenía los compuestos disueltos en DMSO a 10 y 100µM de concentración final a 10% DMSO. Luego de transcurrida la hora de incubación se agregaron 10 µL de esta mezcla a la mezcla de reacción alcanzando un volumen final de 100 µM en placas de 96 pocillos. La medición de la inhibición se realizó nuevamente por la lectura de la disminución en la absorbancia a 340 nm y 25°C en un lector multiplacas Varioskan™ Flash Multimode Reader (Thermo Scientific™, Waltham, MA, USA). Es importante aclarar que ninguno de los compuestos

agregados en esta reacción afectó la reacción de la glicerol-fosfato-deshidrogenasa (corroborada *in situ* en la reacción de inhibición, con el agregado de glicerolfosfato deshidrogenasa y volviendo a medir)(Saporiti et al., 2022). La concentración inhibitoria 50% fue tomada como la concentración de compuesto necesaria para reducir la actividad enzimática un 50% y fue analizada usando la regresión sigmoideal de la OriginLab 8.5 (Corporation, Northampton, MA, USA). Los ensayos fueron realizados por triplicados en dos ensayos independientes (Saporiti et al., 2022).

1.2.3.2. GST

Los compuestos evaluados como potenciales inhibidores de la RmGST fueron diluidos en DMSO 100% (v/v). Para el ensayo se utilizó Tris HCl a 100 mM pH 7.4 con un 10% (v/v) DMSO en presencia o en ausencia (control negativo) de 100 μ M de los compuestos a evaluar (pre-incubación de 5 min a 25°C) y siguiendo las condiciones utilizadas para evaluar la actividad enzimática de la RmGST. Estos se realizaron por triplicado en dos ensayos independientes.

2.7. Evaluación de la actividad de las moléculas por medio de bioensayos.

Para realizar estos estudios se utilizó la cepa susceptible Mozo aportada por la DILAVE, Montevideo (tanto adultas como larvas).

1.3.1. Selección de la muestra de garrapatas a evaluar

Al igual que para la realización de los bioensayos se realizó previamente la evaluación de la muestra recibida para definir si podía ser utilizada para su estudio. Esta debe de llegar sin ovipostura, sin presencia de hongos y dentro de las 24 horas de haber sido extraídas. Luego se seleccionan las teleoginas a utilizar por un tamaño de 0,8cm o superior, ser uniformes sin deformaciones, de consistencia levemente turgente y color verde oliva con leves vetas más claras. No deben presentar coloraciones rojizas, negras o blancas. Por último, se evalúa la viabilidad por medio de su movimiento y capacidad de caminar.

1.3.2. TIL (basada en Castro Janer et al., 2012)

Para realizar las soluciones de inmersión los compuestos a evaluar se diluyeron en DMSO y se llevan a una concentración de 3,0 mM sin sobrepasar el 15 % v/v de DMSO en agua (Cover et al., 2022). Se utiliza como control negativo DMSO al 15 % v/v en agua, y como control positivo Ivermectina (Sanimax, Laboratorio Adler) a una concentración de

$8,2 \times 10^{-5}$ M (concentración letal 99 definida por Castro-Janer et al., 2012). Las teleoginas seleccionadas se incubaron en condiciones ideales (28°C, 85% - 90% HR, 12 horas luz), a las 2 semanas se pasaron las ovipositoras a tubos de ensayo de vidrio de 1,5cm de diámetro que contenían una torunda de algodón humedecido con agua destilada compactado al fondo. Luego se taparon con algodón para incubarse a condiciones ideales (28°C, 85% - 90% HR, 12 horas luz). Se utilizaron las larvas a los 14 a 21 días de eclosionadas para realizar la inmersión. Luego se colocó 1 mL de solución de inmersión en un tubo de 1,5mL, por duplicado para cada tratamiento y control. Se colocaron los tubos conteniendo las larvas en forma vertical con el extremo abierto hacia arriba y se utilizaron aquellas que se encontraron en el borde del tubo ya que fueron consideradas viables. Se colocó un cúmulo de 2 mm de diámetro con aproximadamente 100 larvas en cada uno de los tubos con la solución de inmersión, dejando las larvas en inmersión durante 10 minutos y homogeneizando manualmente. Luego se extrajeron las larvas y se colocaron en sobres de papel Whatman N°1 cortados en rectángulos de 8,5 a 7,5 cm y doblados a la mitad. Estos sobres se cerraron con clip bulldog y se incubaron por 24 horas a las condiciones ya mencionadas. Transcurridas las 24 horas se abrieron los sobres y se evaluó el % de mortalidad, tomándose éste como % de control.

1.3.3. TIA (basada en Drummond et al., 1973)

Se utilizaron las teleoginas seleccionadas según lo descrito anteriormente y las soluciones de inmersión se realizaron diluyendo el compuesto a evaluar en DMSO a una concentración de 3,0 mM sin sobrepasar el 15 % v/v de DMSO en agua (Cover et al., 2022). Se utiliza como control negativo DMSO al 15 % v/v en agua, y como control positivo Amitraz (Acarmic, Laboratorio Microsules) a una concentración de $8,5 \times 10^{-4}$ M (concentración comercial para baño). Se pesaron y luego sumergieron 7 garrapatas de la cepa Mozo en un tubo tipo Falcon conteniendo 10 mL de solución con el compuesto (según se mencionó anteriormente) durante 30 minutos. Luego de la inmersión, las hembras se extrajeron y secaron cuidadosamente con papel absorbente, y colocaron individualmente en tubos tipo Falcon de 15 mL identificados con la garrapata que contenían y el tratamiento (Compuesto o control). A estos se les agregó algodón humedecido con agua destilada (esfera de 0,5 cm de diámetro) se los tapó con una torunda de algodón y se incubaron a condiciones ideales (28°C, 85% - 90% HR y 12 horas luz) durante 14 días. Luego se registró el peso de la masa de los huevos, se humedeció nuevamente la esfera de algodón con agua destilada, se tapó y se incubaron nuevamente

bajo condiciones ideales (28°C, 85% - 90% HR y 12 horas luz) por un período de dos meses. Transcurrido este período se registró el porcentaje de eclosión por el método visual. Finalmente se calculó la reproducción estimada y el % de control según lo descrito anteriormente para los estudios de resistencia mediante el TIA.

2.8. Evaluación de la citotoxicidad y parámetros farmacocinéticos

1.4.1. Evaluación de la citotoxicidad en esperma bovino

Las muestras de esperma se obtuvieron de toros Polled Hereford del banco de semen de Gensur Ltda Montevideo. Se mantuvieron congeladas bajo nitrógeno líquido en pajuelas de 0,5 mL (Andromed, Minitube, Alemania) hasta su uso (Figura 11). Se descongelaron muestras de dos pajuelas y se preparó una reserva de esperma en una solución tampón de fosfato salino PH 7,4 a una concentración de 40 millones de espermatozoides por mL, luego 50 µL de esta suspensión de esperma se mezcló con 50 µL del compuesto diluido a 100 µM o con DMSO al 1 % v/v en el caso del control. El compuesto se ensayó por duplicado en placas de 96 pocillos incluyendo los controles. Las placas se incubaron a 37 °C durante 30 minutos con agitación moderada. Luego 10 µL de cada muestra se colocaron en una cámara de conteo de Makler (profundidad 10 µm, Sefi-Medical Instruments, Israel). Mediante el uso del sistema Androvision (Minitube, Tiefenbach, Alemania) del CASA (Analizador de semen asistido por computadora) y utilizando un microscopio Olympus BX 41 (Olympus, Japón) equipado con una platina caliente a 37 °C, se filmaron cuatro campos microscópicos para cada duplicado de la muestra y se realizó visualmente el conteo de espermatozoides vivos (spzv), como aquellos que mostraron parámetro de motilidad progresiva, y muertos (spzm) de cada muestra de los cuatro campos microscópicos en 100 células. Con esos datos se calculó la cantidad de células relativas luego de 30 minutos de incubación (spz totales - spzv) y el % citotoxicidad del compuesto ($[(\text{número de células relativas del control} - \text{número de células relativas del compuesto}) * 100] / \text{número de células relativas del control negativo}$).

1.4.2. Predicción de la citotoxicidad y otros parámetros farmacocinéticos

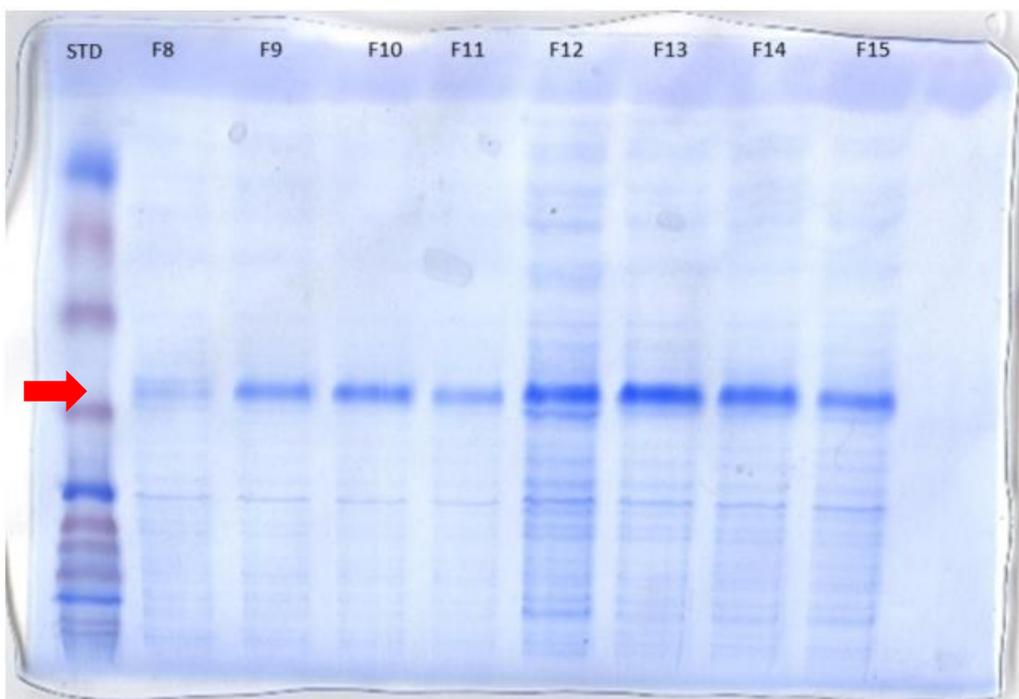
Para usar el software SwissADME se utilizó como imput el código SMILES, para la molécula que se mostró más prometedora, generado por el software ChemBioOffice 2010.

2. Resultados y discusión

2.1. Purificación de las enzimas recombinante TIM y GST

Se confirmó la purificación de la RmTIM y HsTIM mediante una electroforesis en SDS-PAGE observando una única banda de aproximadamente 27 kDa (figura 12). De igual modo se confirmó la purificación de la GST mediante una electroforesis en SDS-PAGE observando una única banda de aproximadamente 25 kDa.

Figura 12. SDS-PAGE. Banda de 27kDa marcada en una electroforesis SDS- PAGE confirmando la purificación de la RmTIM STD (estándar de pesos moleculares), F8 (8° fracción purificada), F9 (9° fracción purificada), F10 (10° fracción purificada), F11 (11° fracción purificada), F12 (12° fracción purificada), F12 (12° fracción purificada), F13 (13° fracción purificada), F14 (14° fracción purificada), F15 (15° fracción purificada). La flecha roja señala los pesos moleculares correspondientes a los 27kDa.



2.2. Medición de la actividad enzimática.

También se comprobó la actividad enzimática de la TIM mediante la conversión de G3P a DHAP observándose una disminución en la absorbancia, es decir el consumo de NADH según lo reportado en esas condiciones. A su vez se demostró la actividad enzimática de la GST frente al CDNB, con el cual se realizó el trabajo, pero no contra el DCNB, obteniendo para el primer sustrato un aumento en la absorbancia. Bajo las condiciones

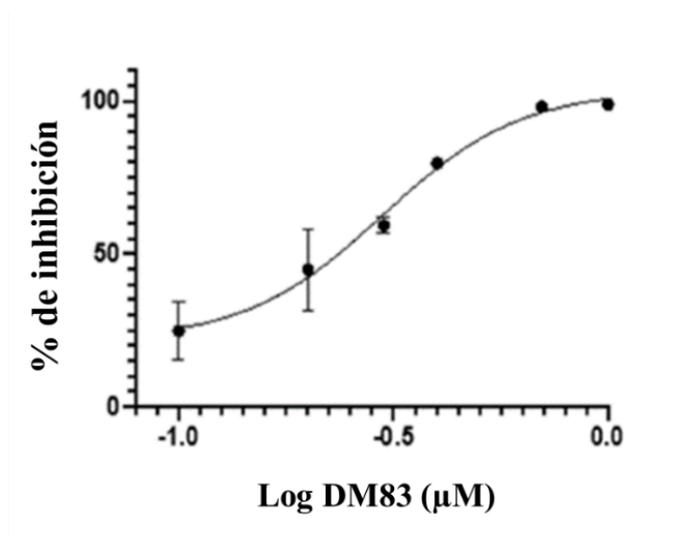
testeadas la GST demostró una actividad de $(36 \pm 3) \times 10^{-3}$ nmol de producto por segundo⁻¹ por μg de proteína⁻¹.

2.3. *Inhibición de la actividad enzimática.*

Para el caso de la TIM se realizó la evaluación de la inhibición de la actividad enzimática evaluando a los compuestos a dos concentraciones, $10\mu\text{M}$ y $100\mu\text{M}$, mientras que para la GST solo se pudo realizar la evaluación a $100\mu\text{M}$. De cualquier manera, tanto para la TIM como para la GST se observaron compuestos que lograban inhibiciones de su actividad superiores al 30%.

Particularmente para la TIM se observaron 15 compuestos que lograron inhibir la actividad de la enzima en un rango de 38% al 100% de inhibición a diferentes concentraciones. En este sentido se observa que para algunos compuestos se logra una inhibición de la actividad enzimática diferente al ser evaluado a diferentes concentraciones. Incluso en algunos casos esta fue superior cuando este es evaluado a una concentración de $10\mu\text{M}$ que a $100\mu\text{M}$. Esto podría deberse a que en estos casos el compuesto no se solubiliza a concentraciones altas generando que se agregue sobre sí mismo y evitando de este modo que interactúe con la enzima, por lo tanto, perdiendo su actividad inhibitoria. Para mejorar este aspecto podrían evaluarse a futuro nuevas soluciones para poder mejorar su dilución. Los compuestos que se destacan con mayor actividad de inhibición enzimática son el 1404 (100% a $10\mu\text{M}$), 1387 (100% a $10\mu\text{M}$), 1386 (100% a $10\mu\text{M}$) y DM80 (99% a 10 y $100\mu\text{M}$).

Figura 13. Curva Dosis-Respuesta para el compuesto DM83 evaluado como inhibidor de la enzima RmTIM. % inhibición (porcentaje de inhibición enzimática), Log DM83 (μM) (logaritmo de la concentración μM del compuesto DM83).



Si bien se buscó obtener, para todos los casos de los compuestos presentados en la tabla 4, su correspondiente CI50%, en muchos casos no fue posible o no de forma precisa ya que no se logró llegar a las concentraciones necesarias para obtener una buena evaluación dosis respuesta por falta de compuesto o por problemas de solubilidad. El compuesto DM83, no solamente logra una respuesta uniforme a las diferentes concentraciones evaluadas, sino que también demuestra una CI 50% de $0.4 \mu\text{M}$ la más baja reportada hasta el momento para esta enzima (figura 13). También este compuesto no afectó la enzima humana a concentraciones mayores a $50 \mu\text{M}$, siendo este entonces selectivo para la TIM de la garrapata. Además, se evaluó también el ligando libre del DM83 y no fue activo, por lo que la inhibición es debida principalmente al complejo metálico.

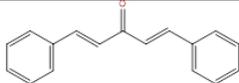
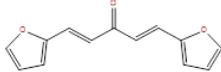
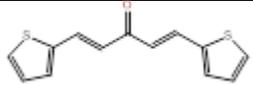
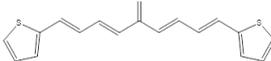
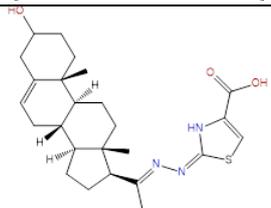
Tabla 4. Resultados de la inhibición de la actividad enzimática en la TIM y concentración inhibitoria 50% de aquellos compuestos que demostraron una inhibición enzimática superior al 30%.

Compuestos	Estructura	% Inhib100* y 10** μM	CI 50% μM
910		60**	23±2
1367		82*	<10
1366		38**	ND
1378		77**	30
1404		100*	<10
799		88*	<10
1387		100*	<10
1088		50*	>50
1408		72**	>50
1385		89*	<10
1386		100*	<10
879		95*	<10
MAR 106		69**	25±4
MAR 105		65*	10±1
DM83		99*	0,4

%INHIB*100 μM (porcentaje de inhibición enzimática a 100 μM), % INHIB *10 μM (porcentaje de inhibición enzimática a 10 μM), CI 50% (concentración inhibitoria del 50% de la actividad enzimática), ND (no hay datos).

Para el caso de los compuestos evaluados con la GST se observa que hubo 5 compuestos que lograron inhibir la GST en más de un 30% (Tabla 5). A su vez en todos los casos se consigue definir la CI 50% destacándose los compuestos 794 y 1258 con una CI 50% de $7.0 \pm 1.1 \mu\text{M}$ y $9.0 \pm 0.3 \mu\text{M}$ respectivamente.

Tabla 5. Resultados de la inhibición de la actividad enzimática y concentración inhibitoria 50% de aquellos compuestos que demostraron una inhibición enzimática superior al 30%.

Compuestos	Estructura	% Inhib 100 μM	CI 50% μM
794		58	7.0 ± 1.1
795		>50	18 ± 6
796		92	50 ± 5
798		>50	50 ± 5
1258		59	9.0 ± 0.3

% Inhib100 μM (porcentaje de inhibición enzimática a 100 μM), CI 50% (concentración inhibitoria del 50% de la actividad enzimática).

2.4. Resultados y discusión del efecto garrapaticida de los compuestos obtenido por medio de bioensayos.

De los compuestos evaluados mediante el TIL se observó que 18 de estos tenían un efecto garrapaticida ya que se registraba algún porcentaje de mortalidad. A su vez se puede observar que los resultados de cada repetición por compuesto son diferentes, lo que sugeriría alguna falla en la técnica que no permite el mismo nivel de absorción/ ingestión por individuo. Para mejorar esto se podría trabajar en la solución de inmersión, así como aumentar el período de tiempo de inmersión. Otra alternativa podría ser la de evaluar los compuestos a una solución inferior a la evaluada. Ya que, si en el caso de los ensayos de inhibición enzimática con la TIM esta variación en la concentración en algunos casos demostró una inhibición mayor, podría suceder lo mismo con los TIL. Sin embargo, otra alternativa podría ser la de utilizar otras técnicas que podrían asegurar niveles de administración más precisos por individuo, como pueden ser los ensayos de alimentación

artificial que implican administrar vía oral con sangre el compuesto a cada garrapata (Kuhnert, 1996; Pohl et al., 2011).

Tabla 6. Resultados de compuestos que demostraron % de mortalidad obtenidos mediante el TIL.

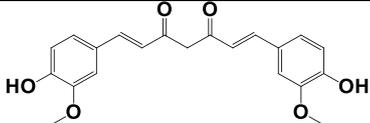
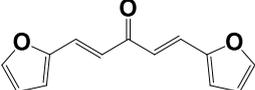
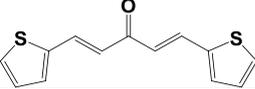
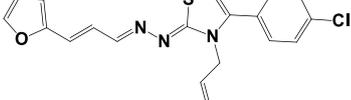
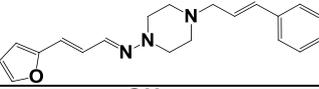
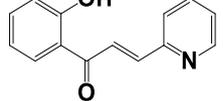
Compuestos	1rep % Mt	2rep % Mt	% Mt promedio
885	11	42	26,5
1456	4,6	3,7	4,2
266	7,1	8,3	7,7
912	30	7,1	18,6
715	6,7	28	17,4
903	8,8	15	11,9
796	3,6	2,0	2,8
906	2,8	1,4	2,2
809	2,9	2,6	2,8
795	12	1,4	6,7
1455	1,3	8,8	5,1
794	5,1	3,3	4,2
1258	1,1	1,6	1,35
1378	6,9	0	3,5
DM83	75	63	69
MAR 106	2,1	4,1	3,1

1rep %MT (porcentaje de mortalidad de la primera repetición), 2rep %Mt (porcentaje de mortalidad de la segunda repetición), %Mt promedio (porcentaje de mortalidad entre la primera y segunda repetición). Los compuestos coloreados son aquellos que también presentaron una inhibición de la actividad enzimática.

De los compuestos que demostraron generar algún % de mortalidad por medio del TIL hubo 7 que también contaron con inhibición de la actividad de las enzimas evaluadas. Particularmente aquellos que también contaron con inhibición de la TIM fueron el 1378, Mar 106, DM 83. Por otro lado, los que a la vez inhibieron la actividad de la GST fueron

el 794, 795, 796 y 1258, los compuestos 795 y 796 además inhibieron el crecimiento de células de garrapata a 100 μM (Tabla 7). Los compuestos que presentaron mejores datos de repetibilidad para estas 2 muestras fueron el 1456, 266, 796, 906, 809, 1258, 794 y MAR 106 y los que mostraron los peores fueron el 885 y el 912. Hubo compuestos que si bien inhibieron la actividad enzimática no fueron exitosos al evaluarlos por bioensayos. Estas diferencias entre estos ensayos pueden estar sugiriendo que las moléculas no están logrando alcanzar a la enzima por lo que amerita a seguir trabajando en una mejor formulación para la solución de inmersión, así como cambiar por un bioensayo de alimentación artificial y agregar el monitoreo de la concentración de compuesto a nivel de la garrapata.

Tabla 7. Resultados de compuestos que demostraron generar mortalidad cualitativamente medida mediante el TIL y a su vez habían demostrado un % de inhibición en células de garrapata, realizados previamente en el Laboratorio de Moléculas Bioactivas.

Compuestos	Estructura	% de inhibición células garra/ IC ₅₀
906		95/ 24 \pm 3 μM
795		80
796		93/ 15 \pm 3 μM
266		77
912		52
885		91/ 17 \pm 4 μM

Por otro lado, hay compuestos que demostraron tener algún efecto garrapaticida con el TIL (Tabla 7) y que tenían estudiado previamente el efecto citotóxico en células de

garrapata (BME26) pero no fueron inhibidores de ninguna de las dos enzimas estudiadas. Por lo tanto, se desconoce el mecanismo de acción de estos, lo cual podría indicar un camino de estudio a seguir que a su vez nos podría orientar a nuevos blancos moleculares.

El compuesto DM 83 fue el que demostró la mayor mortalidad promedio con el TIL (69%) y a su vez logró porcentajes de inhibición de la actividad de la TIM excelentes y uniformes y selectivo. Ante la baja disponibilidad de teleoginas Mozo sobre las cuales poder realizar el TIA se opta por priorizar el realizar con este compuesto el TIA. Los resultados de % de control para las 7 garrapatas evaluadas se muestran en la tabla 8. Se destaca que la garrapata evaluada como repetición 6 tiene como resultado un porcentaje de control negativo ya que su control negativo obtuvo un porcentaje de eclosión de solamente el 40%, mientras que el resto de los controles negativos correspondientes a las otras 6 repeticiones obtuvieron un 100% de control. Es posible que ante la falta de teleoginas haya habido una falla en la elección del control de esta.

Tabla 8. Resultados de las garrapatas evaluadas mediante el TIA con el compuesto DM83.

Repetición	Peso de teleoginas	Peso de huevos	% eclosión	ER	%Control
1	0,289	0,055	5	19031,1	96,7
2	0,328	0,075	85	388719,5	20,5
3	0,25	0,079	30	189600	58
4	0,296	0,045	100	304054,1	36,1
5	0,282	0,072	100	510638,3	6,3
6*	0,259	0,036	95	264092,7	-280,2
7	0,271	0,048	100	354243,5	11,4

*% eclosión (porcentaje de huevos eclosionados), ER (reproducción estimada), % Control (porcentaje de control), * el control negativo de esta garrapata fue deficiente ya tuvo solamente un 40% de eclosión.*

Se pudo observar que los porcentajes de control variaron entre 11,4% y 96,7%. Esta variación está principalmente relacionada a la variación observada en el peso y porcentaje de eclosión de los huevos. Nuevamente esto podría estar explicado porque no está llegando la misma cantidad de compuesto a cada individuo. En este sentido plantearse trabajar en la formulación de baño, aumentar el período de inmersión, modificar la concentración de la solución de baño o recurrir al uso de otro bioensayo. De cualquier manera, se posiciona como un compuesto prometedor sobre el cual continuar trabajando.

2.5. Citotoxicidad y parámetros farmacocinéticos del compuesto DM83.

2.5.1. Citotoxicidad del compuesto DM83 evaluada en esperma bovino.

El análisis cualitativo del efecto del compuesto DM83 en esperma bovino a una concentración de 100 μ M demostró un % de citotoxicidad de 33,1% y 35,6% para cada una de las repeticiones realizadas. Teniendo en cuenta la potencia de inhibición de este compuesto en la TIM, su selectividad y se puede considerar que esta es una baja toxicidad en células de mamífero y que podría ser un compuesto prometedor para realizar otros estudios preclínicos como por ejemplo evaluar la toxicidad *in vivo* en roedores.

2.5.2 Predicción de la citotoxicidad y otros parámetros farmacocinéticos.

El software SwissADAME brinda información predictiva respecto a diferentes parámetros farmacocinéticos como la dosis letal 50% (mg/Kg) en roedores, potencial de mutagenicidad (test de Ames), solubilidad (mg/mL), absorción gastrointestinal (humanos), permeabilidad en la piel (humanos), estabilidad metabólica y lipofiliidad (Consenso log *po/w*) que se presentan en la tabla 9.

Tabla 9. Resultados obtenidos para el compuesto DM83 con el software swissADMA

Comp	Mutag	LD 50 (mg/Kg)	Lipofil	Sol (mg/mL)	Abs GI	Perm. En piel (log Kp cm/s)	Estab. Met
DM83	Negativa	1700	>5	$<3 \times 10^{-4}$	Alta	-4,9	Media
Amitraz	Negativa	400	4,8	$1,6 \times 10^{-3}$	Alta	4,2	Alta

Comp (Compuesto), Mutag (Mutagenicidad), LD 50 (dosis letal 50), Lipofil (lipofiliidad), Sol (solubilidad), Abs GI (Absorción gastrointestinal), Perm en piel (permeabilidad en la piel), Estab. Met (Estabilidad metabólica).

Según los resultados obtenidos se puede observar que los resultados de solubilidad y liposolubilidad podrían estar explicando la dificultad obtenida al general las soluciones para las pruebas de inmersión en garrapatas. La alta absorción a nivel gastrointestinal y estabilidad metabólica media plantean la posibilidad de pensar en una formulación eficiente que permitiría que la garrapata ingiera este compuesto a través de la sangre bovina. De cualquier modo, en primer lugar, sería recomendable confirmar su actividad a través de ensayos de alimentación artificial en garrapatas. Posteriormente habría que trabajar en pensar en una formulación que sortee toda la maquinaria de preestómagos con los que cuentan los bovinos. Esto es importante ya que su tránsito a través de estos generar inestabilidades bioquímicas que podrían impactar directamente en la integridad del compuesto. En cuanto a la LD 50, es muy importante destacar que es muy superior a 400

mg/Kg, detectada para Amitraz en roedores. Esto lo posiciona como un compuesto seguro para su uso, así como la baja capacidad mutagénica.

Conclusiones

Fue posible desarrollar un método que diferencia garrapatas susceptibles de resistentes utilizando el análisis de metabolitos de huevo de garrapata mediante el uso de RMN. Esto demuestra la posibilidad de contar con un diagnóstico rápido y preliminar de resistencia, en menos de 5 días, y dar una respuesta a tiempo al productor para la toma de decisiones. Por otro lado, esta técnica demuestra un gran potencial para poder realizar un diagnóstico de resistencia más detallado para las diferentes moléculas garrapaticidas y, al reflejar lo que sucede a nivel metabólico en estos parásitos, también serviría como una gran herramienta para determinar nuevos mecanismos de resistencia a estas moléculas. Un camino en esta dirección consistiría en poder determinar que metabolitos se pueden asociar específicamente a la resistencia por molécula. Para esto es clave poder obtener muestras de poblaciones con perfiles de resistencia a menos moléculas simultáneamente, así como un análisis más detallado del espectro correspondiente al metabolismo de estas poblaciones. Por otro lado, estudios más detallados de estos espectros podría explicar las diferencias observadas entre los resultados obtenidos para las poblaciones resistentes mediante los bioensayos y estudios genéticos.

Se lograron identificar mediante estudios fenotípicos y target dirigido 22 compuestos como potenciales garrapaticidas a ser desarrollados en un programa de estudios preclínicos. Además, se identificó el inhibidor más potente reportado para la TIM, un compuesto selectivo de baja toxicidad inespecífica y con un prometedor perfil farmacológico a ser desarrollado como garrapaticida. En principio se podría comenzar a trabajar en su formulación para lograr una mejor absorción por parte de las garrapatas y así asegurar una mejor llegada al sitio de acción.

El trabajo finalizó con dos publicaciones realizadas, "Phenotypic and Target-Directed Screening Yields New Acaricidal Alternatives for the Control of Ticks" (Saporiti et al., 2022) y "Novel tick glutathione transferase inhibitors as promising acaricidal compounds" (Ozelame et al., 2022).

Bibliografía

- Aguirre, B., Costas, M., Cabrera, N., Mendoza-Hernández, G., Helseth, D. L., Fernández, P., Tuena de Gómez-Puyou, M., Pérez-Montfort, R., Torres-Larios, A., & Gómez Puyou, A. (2011). A Ribosomal Misincorporation of Lys for Arg in Human Triosephosphate Isomerase Expressed in *Escherichia coli* Gives Rise to Two Protein Populations. *PLoS ONE*, 6(6), e21035. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021035>
- Ahmad, R., & Srivastava, A. (2008). Inhibition of Filarial Glutathione-S-transferase by various classes of compounds and their evaluation as novel antifilarial agents. *Helminthologia*, 45(3), 114–120. <https://doi.org/10.2478/s11687-008-0022-3>
- Akumadu, B. O., Pandian, R., Olfson, J., Worth, R., Thulo, M., Mentor, T., Fanucchi, S., Sayed, Y., Dirr, H. W., & Achilonu, I. (2020). Molecular basis of inhibition of *Schistosoma japonicum* glutathione transferase by ellagic acid: Insights into biophysical and structural studies. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 240, 111319. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2020.111319>
- Alexander, J. L. (2006). Screwworms. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 228(3), 357–367. <https://doi.org/10.2460/javma.228.3.357>
- Allocati, N., Masulli, M., Di Ilio, C., & Federici, L. (2018). Glutathione transferases: substrates, inhibitors and pro-drugs in cancer and neurodegenerative diseases. *Oncogenesis*, 7(1), 8. <https://doi.org/10.1038/s41389-017-0025-3>
- Alota, S. L., Edquiban, T. R. J., Galay, R. L., Bernardo, J. M. G., Sandalo, K. A. C., Divina, B. P., & Tanaka, T. (2021). Determination of resistance status to amitraz in the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* from Luzon, Philippines, through bioassay and molecular analysis. *Experimental and Applied Acarology*, 83(3), 399–409. <https://doi.org/10.1007/s10493-021-00593-8>
- Álvarez, G., Aguirre-López, B., Varela, J., Cabrera, M., Merlino, A., López, G. V., Lavaggi, M. L., Porcal, W., Di Maio, R., González, M., Cerecetto, H., Cabrera, N., Pérez-Montfort, R., de Gómez-Puyou, M. T., & Gómez-Puyou, A. (2010). Massive screening yields novel and selective *Trypanosoma cruzi* triosephosphate isomerase dimer-interface-irreversible inhibitors with anti-trypanosomal activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45(12), 5767–5772. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.09.034>
- Álvarez, G., Perdomo, C., Coronel, C., Aguilera, E., Varela, J., Aparicio, G., Zolessi, F., Cabrera, N., Vega, C., Rolón, M., Rojas de Arias, A., Pérez-Montfort, R., Cerecetto, H., & González, M. (2017). Multi-Anti-Parasitic Activity of Arylidene Ketones and Thiazolidene Hydrazines against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp. *Molecules*, 22(5), 709. <https://doi.org/10.3390/molecules22050709>

- Alvarez L. A. (2008). *Inactivación especie.específica de la Triosafofato Isomerasa de Leishmania mexicana* [Grado- Licenciatura en farmacia]. Universidad autónoma del estado de Hidalgo.
- Anderson, P. E., Mahle, D. A., Doom, T. E., Reo, N. V., DelRaso, N. J., & Raymer, M. L. (2011). Dynamic adaptive binning: an improved quantification technique for NMR spectroscopic data. *Metabolomics*, 7(2), 179–190. <https://doi.org/10.1007/s11306-010-0242-7>
- Arguedas, M., Álvarez, V., & Bonilla, R. (2008). Eficacia del hongo entomopatógeno *Metharizium anisopliae* en el control de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Agronomía Costarricense: Revista de Ciencias Agrícolas*, 32(2), 137–147.
- Begeres de Almeida, M., Py Tortelli, F., Riet-Correa, B., Montiel Ferreira, J. L., Soares, M. P. R., Farias, N. M., Riet-Correa, F., & Schild, A. L. (2006). Tristeza parasitária bovina na região sul do Rio Grande do Sul: estudo retrospectivo de 1978-2005. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 26(4), 237–242.
- Benavides, U., Acevedo, C., Parizi, L., Seixas, A., Masuda, A., & da Silva, Vaz. J. (2011, November 7). Determinación del polimorfismo del gen Bm86 de la garrapata del ganado bovino *Boophilus microplus*, en poblaciones de zonas endémicas de Uruguay. *Jornadas Técnicas de La Facultad de Veterinaria*.
- Bock, r., Jackson, L., de Vos, A., & Jorgensen, W. (2004). Babesiosis of cattle. *Parasitology*, 129(S1), S247–S269. <https://doi.org/10.1017/S0031182004005190>
- Brito, L. G., de Oliveira, L. N., da Silva Barbieri, F., Huacca, M. E. F., dos Santos Pereira, S., da Silva, R. R., de Freitas Fernanades, C. C., & de Sena Oliveira, M. C. (2017). Molecular quantitative assay for esterase-mediated organophosphate resistance in *Rhipicephalus microplus*. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 8(5), 725–732. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.05.006>
- Cardozo, H., & Franchi, M. (1994). Epidemiología y Control de *Boophilus microplus*. In Nari A. & Fiel C. *Enfermedades parasitarias de importancia económica en Bovinos; Bases epidemiológicas para su prevención y control en Argentina y Uruguay*. (1st ed., pp. 369–402). Emisferio Sur.
- Cardozo, H., & Nari, A. (1986). Factores epidemiológicos en el control de *Boophilus microplus*. *XIV Jornadas Uruguayas de Buiatría*, 189–207.
- 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, 4–10.
- Castro Janer, E., Klafke, G. M., Fontes, F., Capurro, M. L., & Schumaker, T. S. S. (2019). Mutations in *Rhipicephalus microplus* GABA gated chloride channel gene associated with fipronil resistance. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 10(4), 761–765. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.03.009>

- Castro Janer, E., Sato Schumaker, T. T., Marcondes Klafke, G. M., Rifran, L. R., González, P., Niell, C., Namindome, A., Gil, A., Piaggio, J., Ricardo Martins, J., Mendes, M. C., & Miller, R. J. (2012). Garrapata: resistencia a fipronil e ivermectina en rodeos vacunos de uruguay y brasil Proyecto FPTA 243: Adecuación de bioensayos para la determinación de resistencia de *Boophilus microplus* a fipronil e ivermectina, y verificación de resistencia cruzad. 14–17. <http://www.inia.uy/Publicaciones/Documentos/compartidos/18429230712114518.pdf>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.12.017>
- Chen, A. C., He, H., & Davey, R. B. (2007). Mutations in a putative octopamine receptor gene in amitraz-resistant cattle ticks. *Veterinary Parasitology*, *148*(3–4), 379–383. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.06.026>
- Coen, M., Bodkin, J., Power, D., Bubb, W. A., Himmelreich, U., Kuchel, P. W., & Sorrell, T. C. (2006). Antifungal Effects on Metabolite Profiles of Medically Important Yeast Species Measured by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *50*(12), 4018–4026. <https://doi.org/10.1128/AAC.00439-06>
- CONHASA. (2016). *Acta CONHASA extraordinaria 22 de Abril del 2016*. . <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/institucional/informacion-gestion/actas/acta-n-2262016-0>
- Cossio-Bay, R., Miranda-Mi, E., Ortiz-Naje, A., & Neri-Orant, S. (2008). *Boophilus microplus* Pyrethroid Resistance Associated to Increased Levels of Monooxygenase Enzymatic Activity in Field Isolated Mexican Ticks. *Journal of Biological Sciences*, *8*(2), 404–409. <https://doi.org/10.3923/jbs.2008.404.409>
- Cuore, U. (2022). Control integrado en la garrapata *Rhipicephalus microplus* perspectivas en el uso de vacunas recombinantes contra la garrapata resultados preliminares obtenidos con una vacuna de desarrollo nacional. *XLIX Jornadas Uruguayas de Buiatría*, 26–37.
- Cuore, U., Altuna, M., Cicero, L., Fernandez, F., Luengo, L., Mendoza, R., Nari, A., Pérez Rama, R., Solari, M. A., & Trelles, A. (2012). Aplicación del tratamiento generacional de la garrapata en la erradicación de una población multirresistente de *Rhipicephalus microplus* en Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)*, *48*(187), 5–13.
- Cuore, U., Cardozo, H., Solari, M. A., & Cicero, L. (2013). Epidemiología y control de la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. In C. Fiel y A. Nari. *Enfermedades parasitarias de importancia clínica y productiva en rumiantes* (Vol. 1, pp. 457–484). Hemisferio Sur.

- Cuore, U., & Solari M. A. (2022). Manual práctico para el control de la garrapata común del ganado y enfermedades asociadas. https://cev.org.uy/Manual_garrapata.pdf
- 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), 13–19.
- Cuore, U., Solari, M. A., Trelles, A., Petruccelli, D., Losiewicz, S., & Vallejo, S. (2019). Control sustentable de parásitos en condiciones de silvopastoreo con énfasis en garrapata *Rhipicephalus (boophilus) microplus* y hemoparásitos. In control sustentable de parásitos en condiciones de silvopastoreo con énfasis en garrapata *Rhipicephalus (boophilus) microplus* y hemoparásitos serie 80 fpta INIA (1st ed., Vol. 1, pp. 57–64). Editorial Hemisferio Sur.
- Cuore, U., Trelles, A., Sanchís, J., Gayo, V., & Solari M. A. (2007). Primer diagnóstico de resistencia al Fipronil en la garrapata común del ganado *Boophilus microplus*. *Veterinaria (Montevideo)*, 42, 35–41.
- da Silva Vaz, I., Torino Lermen, T., Michelon, A., Sanchez Ferreira, C. A., Joaquim de Freitas, D. R., Termignoni, C., & Masuda, A. (2004). Effect of acaricides on the activity of a *Boophilus microplus* glutathione S-transferase. *Veterinary Parasitology*, 119(2–3), 237–245. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2003.11.004>
- de La Canal, L. H., Dall’Agnol, B., Webster, A., Reck, J., Martins, J. R., & Klafke, G. M. (2021). Mechanisms of amitraz resistance in a *Rhipicephalus microplus* strain from southern Brazil. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 12(5), 101764. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2021.101764>
- de Oliveira Cruz, E. M., MartinsCosta-Junior, L., Oliveira Pinto, J. A., de Alexandía Santos, D., Alvez de Araujo, S., Arrigoni-Blank, M. de F., Bacci, L., Barreto Alves, P., de Holanda Cavalcanti, S. C., & Blank, A. F. (2013). Acaricidal activity of *Lippia gracilis* essential oil and its major constituents on the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Veterinary Parasitology*, 195(1–2), 198–202. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.12.046>
- Denholm, I., & Rowland, M. W. (1992). Tactics for Managing Pesticide Resistance in Arthropods: Theory and Practice. *Annual Review of Entomology*, 37(1), 91–112. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.37.010192.000515>
- Drummond, R. O., Ernst, S. E., Trevino, J. L., Gladney, J. W., & Graham, O. H. (1973). *Boophilus annulatus* and *Boophilus microplus*: Laboratory Tests of Insecticides. *Journal of Economic Entomology*, 66(1), 130–133.
- FAO. (1984). *Ticks and tick borne disease control. A practical field manual.* (Vol. 1). FAO.

- FAO. (2004). Module 1. Ticks: acaricide resistance: diagnosis, management and prevention. In *Guidelines resistance management and integrated parasite control in ruminants* (1st ed., Vol. 1, pp. 25–77). FAO.
- FAO. (2024a). *Food Outlook – Biannual report on global food markets*. FAO. <https://doi.org/10.4060/cd3177en>
- FAO. (2024b). *Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura*. El Papel de La FAO En La Producción Animal.
- Farahnak, A., & Brophy, P. (2004). Inhibition assay study of purified glutathione s-transferase from *Fasciola hepatica* and sheep liver tissue by hexachlorophene. *Acta Medica Iranica*, 42(2), 168–171.
- Freitas, D. R. J. de, Vaz Junior, I. da S., & Masuda, A. (2008). Expressão e atividade enzimática de glutathione s-transferase em tecidos de fêmeas de *Boophilus microplus*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 17(2), 99–104. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612008000200007>
- García Álvarez, L. (2017). Resonancia magnética nuclear como técnica alternativa para estudios de susceptibilidad a antimicrobianos y del metabolismo de microorganismos difíciles de cultivar. [Doctoral]. Universidad de La Rioja.
- García González, M. A., Sánchez Mendonza, E., Waksman Minsky, N. H., & Saucedo, A. L. (2022). Fundamentos y analogías para entender mejor la espectroscopía de RMN. *Educación Química*, 33(4), 3–13. <https://doi.org/10.22201/fq.18708404e.2022.4.0.81520>
- García-Álvarez, L., Busto, J. H., Avenzoza, A., Sáenz, Y., Peregrina, J. M., & Oteo, J. A. (2015). Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy as a Technique for Gentamicin Drug Susceptibility Studies with *Escherichia coli* ATCC 25922. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(8), 2433–2438. <https://doi.org/10.1128/JCM.00604-15>
- García-Álvarez, L., Busto, J. H., Peregrina, J. M., Fernández Recio, M. A., Avenzoza, A., & Oteo, J. A. (2013). Nuclear Magnetic Resonance Applied to Antimicrobial Drug Susceptibility. *Future Microbiology*, 8(4), 537–547. <https://doi.org/10.2217/fmb.13.8>
- García-Torres, I., de la Mora-de la Mora Ignacio, Marcial-Quino J, Gómez-Manzo S, Vanoye-Carlo A, Navarrete-Vázquez G, Colín-Lozano B, Gutiérrez-Castrellón P, Sierra-Palacios E, López-Velázquez G, & Enríquez-Flores S. (2016). Proton pump inhibitors drastically modify triosephosphate isomerase from *Giardia lamblia* at functional and structural levels, providing molecular leads in the design of new anti-giardiasis drugs. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1860(1), 97–107.
- Gassel, M., Wolf, C., Noack, S., Williams, H., & Ilg, T. (2014). The novel isoxazoline ectoparasiticide fluralaner: Selective inhibition of arthropod γ -aminobutyric acid- and l-glutamate-gated chloride channels and

- insecticidal/acaricidal activity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 45, 111–124. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2013.11.009>
- Hayes, J. D., Flanagan, J. U., & Jowsey, I. R. (2005). Glutathione transferases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 45(1), 51–88. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095857>
- He, H., Chen, A., B. Davey, R., Wayne Ivie, G., & George, J. E. (1999). Characterization and molecular cloning of a glutathione S-transferase gene from the tick, *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 29(8), 737–743. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(99\)00056-9](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(99)00056-9)
- He, H., Chen, A. C., Davey, R. B., Ivie, G. W., & George, J. E. (1999). Identification of a Point Mutation in the para-Type Sodium Channel Gene from a Pyrethroid-Resistant Cattle Tick. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 261(3), 558–561. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.1076>
- Hiller, N., Fritz-Wolf, K., Deponte, M., Wende, W., Zimmermann, H., & Becker, K. (2006). *Plasmodium falciparum* glutathione S-transferase—Structural and mechanistic studies on ligand binding and enzyme inhibition. *Protein Science*, 15(2), 281–289. <https://doi.org/10.1110/ps.051891106>
- Hope, M., Menzies, M., & Kemp, D. (2010). Identification of a Dieldrin Resistance-Associated Mutation in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*; (Acari: Ixodidae). *Journal of Economic Entomology*, 103(4), 1355–1359. <https://doi.org/10.1603/EC09267>
- INAC. (2024). *Síntesis del ejercicio agrícola 2023/2024*. https://Www.Inac.Uy/Innovaportal/v/26729/37/Innova.Bs/Sintesis-Del-Ejercicio-Agricola-2023_2024#:~:Text=Los%20corderos%20con%20un%2017,Click%20aqu%C3%AD.
- Jamroz, R. C., Guerrero, F. D., Pruett, J. H., Oehler, D. D., & Miller, R. J. (2000). Molecular and biochemical survey of acaricide resistance mechanisms in larvae from Mexican strains of the southern cattle tick, *Boophilus microplus*. *Journal of Insect Physiology*, 46(5), 685–695. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(99\)00157-2](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(99)00157-2)
- Janer, E. C., Díaz, A., Fontes, F., Baraibar, F., Saporiti, T., & Olhagaray, M. E. (2021). Molecular survey of pyrethroid and fipronil resistance in isolates of *Rhipicephalus microplus* in the north of Uruguay. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 12(5), 101747. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2021.101747>
- Jonsson, N. N., Cutullè, C., Corley, S. W., & Seddon, J. M. (2010). Identification of a mutation in the para-sodium channel gene of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* associated with resistance to flumethrin but not to cypermethrin. *International Journal for Parasitology*, 40(14), 1659–1664. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2010.07.006>

- Jonsson, N. N., Klafke, G., Corley, S. W., Tidwell, J., Berry, C. M., & Koh-Tan, H. C. (2018). Molecular biology of amitraz resistance in cattle ticks of the genus *Rhipicephalus*. *Frontiers in Bioscience*, 23(2), 4617. <https://doi.org/10.2741/4617>
- Kemp, D. H., Hughes, S., Binnington, K. C., Bird, P., & Nolan, J. (1990). Mode of action of CGA 157419 on the cattle-tick *Boophilus microplus*. *VII International Congress of Parasitology*, 1048.
- Kuhnert, F. (1996). Feeding of Hard Ticks In Vitro: New Perspectives for Rearing and for the Identification of Systemic Acaricides. *Altex*, 13, 76–87.
- Labraga, J. (2016). Exportaciones de carne bovina del MERCOSUR: Una cuantificación de los efectos comerciales de medidas sanitarias nuevas y tradicionales. <https://doi.org/10.18235/0010114>
- Lahille, F. (1905). Contribution A L'Etude Des Ixodides De La Republique Argentine (Vol. 2). Kessinger Publishing.
- Laurella SL. (2017). Resonancia magnética nuclear Una herramienta para la elucidación de estructuras moleculares (1a ed.). Editorial de la Universidad de La Plata.
- Lawrence, C., & Mason, T. (2012). Zebrafish Housing Systems: A Review of Basic Operating Principles and Considerations for Design and Functionality. *ILAR Journal*, 53(2), 179–191. <https://doi.org/10.1093/ilar.53.2.179>
- Lyonnet, J. (2024, November 4). Celulosa, soja, lácteos y carne sostienen el aumento de las exportaciones. <https://Blasinayasociados.Com/Celulosa-Soja-Lacteos-y-Carne-Sostienen-El-Aumento-de-Las-Exportaciones/>.
- MGAP. (2024, October 28). *Listado de garrapaticidas*. <https://Www.Gub.Uy/Ministerio-Ganaderia-Agricultura-Pesca/Datos-y-Estadisticas/Datos/Listado-Garrapaticidas-0>.
- Miller, R. J., Davey, R. B., White, W. H., & George, J. E. (2007). A Comparison of Three Bioassay Techniques to Determine Amitraz Susceptibility in *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*, 44(2), 283–294. <https://doi.org/10.1093/jmedent/44.2.283>
- Miraballes, C., Riet-Correa, F., Saporiti, T., Lara, S., Parodi, P., & Sanchez, J. (2019). Probability of *Rhipicephalus microplus* introduction into farms by cattle movement using a Bayesian Belief Network. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 10(4), 883–893. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.04.009>
- Monteiro, I. N., Monteiro, O. dos S., Costa-Junior, L. M., da Silva Lima, A., Andrade, E. H. de A., Maia, J. G. S., & Mouchrek Filho, V. E. (2017). Chemical composition and acaricide activity of an essential oil from a rare chemotype of *Cinnamomum verum* Presl on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*, 238, 54–57. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.03.016>

- Moraes, J., Arreola, R., Cabrera, N., Saramago, L., Freitas, D., Masuda, A., da Silva Vaz, I., Tuena de Gomez-Puyou, M., Perez-Montfort, R., Gomez-Puyou, 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. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2011.02.009>
- Murrell, A., Campbell, N. J. H., & Barker, S. C. (2000). Phylogenetic Analyses of the *Rhipicephaline* Ticks Indicate That the Genus *Rhipicephalus* Is Paraphyletic. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *16*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1006/mpev.2000.0762>
- Muzzio, F. (2006). Aportes a la lucha contra la garrapata. In *Programa de la lucha contra la garrapata. I Seminario Taller* (pp. 1–69). MGAP.
- Nari, A. (1990). Methods currently used for the control of one-host ticks: their validity and proposals for future control strategies. *Parasitología*, *32*, 133–143.
- 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. *III Jornadas Latinoamericanas y VI Uruguayas de Buiatría*, 103–114.
- Nari A, Eddi C, Martins JR, & Benavides E. (2003). Resistencia a los antiparasitarios: Estado actual con énfasis en América Latina. Estudio FAO Producción y Sanidad Animal 157. (1st ed., Vol. 1). FAO.
- Nari A, & Hansen JW. (1999, May). Resistance of Ecto- and Endo-parasites: Current and Future Solutions. *67th General Session. International Committee*.
- Ndawula, C., Sabadin, G. A., Parizi, L. F., & da Silva Vaz, I. (2019). Constituting a glutathione S-transferase-cocktail vaccine against tick infestation. *Vaccine*, *37*(14), 1918–1927. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.02.039>
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2006). Enzimas. In *Lehninger. Principios de Bioquímica* (4th ed., pp. 190–237). Ediciones Omega S.A.
- Núñez, J. L., Muñoz Cobeñas, M. E., & Moltedo, L. (1982). *Boophilus microplus. La garrapata común del ganado vacuno*. (Vol. 1). Hemisferio Sur.
- Núñez, J., Muñoz, M., & Moltedo, H. (1987). *Boophilus microplus. La garrapata común del ganado vacuno*. (Vol. 1). Emisferio Sur.
- Ozelame, K. P. C., Mattia, M. M. C., Dedavid e Silva, L. A., Randall, L. M., Corvo, I., Saporiti, T., Seixas, A., da Silva Vaz, I., & Alvarez, G. (2022). Novel tick glutathione transferase inhibitors as promising acaricidal compounds. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, *13*(5), 101970. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2022.101970>

- Petraccia, C., Cardozo, H., Nari, A., & Solari M. A. (1983). Estudios de resistencia a garrapaticidas organofosforados (OF) en *Boophilus microplus*. *Veterinaria (Montevideo)*, 19, 5–9.
- Plummer, R., Bodkin, J., Power, D., Pantarat, N., Bubb, W. A., Kuchel, P. W., & Sorrell, T. C. (2007). Effect of Caspofungin on Metabolite Profiles of *Aspergillus* Species Determined by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(11), 4077–4084. <https://doi.org/10.1128/AAC.00602-07>
- Pohl, P. C., Klafke, G. M., Carvalho, D. D., Martins, J. R., Daffre, S., da Silva Vaz, I., & Masuda, A. (2011). ABC transporter efflux pumps: A defense mechanism against ivermectin in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *International Journal for Parasitology*, 41(13–14), 1323–1333. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2011.08.004>
- Pruett, J. H., Guerrero, F. D., & Hernandez, R. (2002). Isolation and Identification of an Esterase from a Mexican Strain of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Journal of Economic Entomology*, 95(5), 1001–1007. <https://doi.org/10.1093/jee/95.5.1001>
- Reck, J., Klafke, G. M., Webster, A., Dall’Agnol, B., Scheffer, R., Souza, U. A., Corassini, V. B., Vargas, R., dos Santos, J. S., & de Souza Martins, J. R. (2014). First report of fluazuron resistance in *Rhipicephalus microplus*: A field tick population resistant to six classes of acaricides. *Veterinary Parasitology*, 201(1–2), 128–136. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.01.012>
- Riddles PW, Davey PA, & Nolan J. (1983). Carboxylesterases from *Boophilus microplus* hydrolyze trans-permethrin. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 20, 133–140.
- Riek, R. F. (1964). The life cycle of *Babesia bigemina* (Smith and Kilborne, 1893) in the tick vector *Boophilus microplus* (Canestrini). *Australian Journal of Agricultural Research*, 15(5), 802–821.
- Rodrigues, D., & Cury, M. C. (n.d.). *Manual técnico de Exolt. Olvide todo lo que usted conoce sobre control de garrapatas. Llegó Exolt 5%*. Nutritec-MSD.
- Rodríguez Dos Santos, A. M. (2023). Prospección, aislamiento y evaluación del potencial de hongos nativos acaropatogénicos en el control de *Rhipicephalus microplus* en Uruguay. *INNOTEC*, 26, 1. <https://doi.org/10.26461/26.07>
- Rodriguez-Vivas, R. I., Alonso-Díaz, M. A., Rodríguez-Arevalo, F., Fragosó-Sánchez, H., Santamaria, V. M., & Rosario-Cruz, R. (2006). Prevalence and potential risk factors for organophosphate and pyrethroid resistance in *Boophilus microplus* ticks on cattle ranches from the State of Yucatan, Mexico. *Veterinary Parasitology*, 136(3–4), 335–342. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.05.069>

- Rodríguez-Vivas, R. I., Hodgkinson, J. E., & Trees, A. J. (2012). Resistencia a los acaricidas en *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: situación actual y mecanismos de resistencia. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 3, 9–24.
- Rosa de Lima, M. F., Sanchez Ferreira, C. A., Joaquim de Freitas, D. R., Valenzuela, J. G., & Masuda, A. (2002). Cloning and partial characterization of a *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) glutathione S-transferase. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32(7), 747–754. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(01\)00157-6](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(01)00157-6)
- Samish, M., & Rehacek, J. (1999). Pathogens and predators of ticks and their potential in biological control. *Annual Review of Entomology*, 44(1), 159–182. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.44.1.159>
- Sanchis, J., Cuore, U., Gayo, V., Silvestre, D., Invernizzi, F., Trelles, A., & Solari, M. A. (2008). Estudios sobre la epidemiología del *Boophilus microplus* en tres áreas del Uruguay. . *XXXVI Jornadas de Buiatría*, 247–248.
- Saporiti, T. (2019). Uso del test de inmersión de adultos modificado para fluazuron y del test de paquete de larvas para diagnosticar la resistencia de 14 poblaciones de campo de *Rhipicephalus microplus* a los 6 grupos químicos habilitados en Uruguay [Magister Thesis]. Universidad de la República.
- Saporiti, T., Cabrera, M., Bentancur, J., Ferrari, M. E., Cabrera, N., Pérez-Montfort, R., Aguirre-Crespo, F. J., Gil, J., Cuore, U., Matiadis, D., Sagnou, M., & Alvarez, G. (2022). Phenotypic and Target-Directed Screening Yields New Acaricidal Alternatives for the Control of Ticks. *Molecules*, 27(24), 8863. <https://doi.org/10.3390/molecules27248863>
- Saporiti, T., Losiewics, S., Trelles, A., Miraballes, C., Riet-Correa, F., & Cuore, U. (2021). Susceptibility profile and associated factors analysis of *Rhipicephalus microplus* for five chemical groups on field populations from the north of Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)*, 57(215), 1–11.
- Saramago, L., Gomes, H., Aguilera, E., Cerecetto, H., González, M., Cabrera, M., Alzugaray, M. F., Da Silva Vaz Junior, I., Nunes da Fonseca, R., Aguirre-López, B., Cabrera, N., Pérez-Montfort, R., Merlino, A., Moraes, J., & Álvarez, G. (2018). Novel and Selective *Rhipicephalus microplus* Triosephosphate Isomerase Inhibitors with Acaricidal Activity. *Veterinary Sciences*, 5(3), 74. <https://doi.org/10.3390/vetsci5030074>
- Sartor, I. F., Sakate, M., & Alvares Santarém, V. (2011). Agentes Empregados no Controle de Ectoparasitos. In *de Souza Spinosa, Lima Górnial y Bernardi. Farmacología aplicada a medicina veterinaria*. (5th ed., Vol. 1, pp. 549–558). Guanabara Koogan.
- Schenone, M., Dančík, V., Wagner, B. K., & Clemons, P. A. (2013). Target identification and mechanism of action in chemical biology and drug discovery. *Nature Chemical Biology*, 9(4), 232–240. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1199>

- Schmid, H., Oechslein, W., Hess, E., Kobel W, & Mayer W. (1994). *Technical Summary for Registration. Acatak Pour-On Tick Development Inhibitor*. CIBA-GEIGY.
- Schwalback, M., Greyling, J., & David, M. (2003). The efficacy of a 10% aqueous Neem (<i>Azadirachta indica</i>) seed extract for tick control in Small East African and Toggenburg female goat kids in Tanzania. *South African Journal of Animal Science*, 33(2).
<https://doi.org/10.4314/sajas.v33i2.3760>
- Sepúlveda L, Rodríguez OJ, Cruz A, & Molano C. (2013). Reporte preliminar del efecto ixodicida de extractos de algunas plantas sobre garrapatas *Boophilus microplus*. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 18(1), 118–130.
- Shaw, R. D. (1966). Culture of an organophosphorus Resistance, strain of *B. microplus* and an assessment of its spectrum. *B. Entomol. Res.*, 56(L 2400), 389–405.
- Shimada, M. K., Yamamura, M. H., Kawasaki, P. M., Tamekuni, K., Igarashi, M., Vidotto, O., & Vidotto, M. C. (2004). Detection of *Anaplasma marginale* DNA in Larvae of *Boophilus microplus* Ticks by Polymerase Chain Reaction. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1026(1), 95–102.
<https://doi.org/10.1196/annals.1307.012>
- Solari, M. A., Cuore, U., Snachis, J., & Gayo, V. (2008). Control integrado de parásitos con énfasis en *Boophilus microplus* y *Babesia* spp. aplicado en un establecimiento. https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/sites/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/files/documentos/publicaciones/control_integ_parasitos.pdf.
- Solari, M. A., Dutra, F., & Quintana, S. (2013). Epidemiología y prevención de los hemoparásitos (*Babesia* y *Anaplasma*) en el Uruguay. In Fiel, C.; Nari, A. 41 (2013). *Enfermedades parasitarias de importancia clínica y productiva en rumiantes* (1st ed., Vol. 1, pp. 657–688). Hemisferio Sur.
- Sossai, S., Peconick, A. P., Sales-Junior, P. A., Marcelino, F. C., Vargas, M. I., Neves, E. S., & Patarroyo, J. H. (2005). Polymorphism of the bm86 Gene in South American Strains of the Cattle Tick *Boophilus microplus*. *Experimental and Applied Acarology*, 37(3–4), 199–214. <https://doi.org/10.1007/s10493-005-3262-7>
- Stone, B. F., & Haydock, K. P. (1962). A method for measuring the acaricide-susceptibility of the cattle tick *Boophilus microplus* (Can.). *Bulletin of Entomological Research*, 53(3), 563–578.
<https://doi.org/10.1017/S000748530004832X>
- Stone, N. E., Olafson, P. U., Davey, R. B., Buckmeier, G., Bodine, D., Sidak-Loftis, L. C., Giles, J. R., Duhaime, R., Miller, R. J., Mosqueda, J., Scoles, G. A., Wagner, D. M., & Busch, J. D. (2014). Multiple mutations in the para-sodium channel gene are associated with pyrethroid resistance in

- Rhipicephalus microplus* from the United States and Mexico. *Parasites & Vectors*, 7(1), 456. <https://doi.org/10.1186/s13071-014-0456-z>
- Tardáguila Agromercados. (2023, September 24). <https://rurales.elpais.com.uy/la-semana-ganadera/mercosur-se-consolida-como-principal-exportador-de-carne-vacuna>. <https://Rurales.Elpais.Com.Uy/La-Semana-Ganadera/Mercosur-Se-Consolida-Como-Principal-Exportador-de-Carne-Vacuna>.
- Uruguay XXI. (2024). *Sector Ganadero en Uruguay. Informe Ganadero Junio 2024*.
- Vally, T., & Gentry, P. A. (2007). Hematopoietic system. In M. Grant Maxie (Ed.), *Jubb, Kennedy and Palmer's. Pathology of domestic animals*. (Vol. 3, pp. 239–247). W.B. Saunders.
- 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, 17–28.
- Veselkov, K. A., Lindon, J. C., Ebbels, T. M. D., Crockford, D., Volynkin, V. V., Holmes, E., Davies, D. B., & Nicholson, J. K. (2009). Recursive Segment-Wise Peak Alignment of Biological ¹H NMR Spectra for Improved Metabolic Biomarker Recovery. *Analytical Chemistry*, 81(1), 56–66. <https://doi.org/10.1021/ac8011544>
- Woodham, C. B., González, O. A., López, L. A., & Guereña, M. R. (1983). Progresos en la erradicación de las garrapatas *Boophilus* en México 1960-1980. *Revista Mundial de Zootecnia*, 48, 18–24.