



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

**“Evaluación de la eficacia *in vivo* de dos carbamatos de nueva  
síntesis sobre *Rhipicephalus microplus*”**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS**

P R E S E N T A

**Sandra Lizeth Iturbe Requena**

TUTOR

Dr. Fernando Alba Hurtado (UNAM-FESC)

COMITÉ TUTORAL

Dra. Yazmín Alcalá Canto (UNAM-FMVZ)

Dr. Enrique Ángeles Anguiano (UNAM-FESC)



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

---

# AGRADECIMIENTOS

---

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, por permitir mi desarrollo humano y profesional.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para realizar mis estudios.

Al proyecto PAPIIT IN221515 “Evaluación de la genotoxicidad, mutagenicidad y mecanismo de acción de dos nuevos etil-carbamatos inhibidores del desarrollo de garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*” por el financiamiento para realizar este trabajo.

Al Dr. Fernando Alba Hurtado por sus enseñanzas, su apoyo y por su confianza para la realización de este trabajo.

A los miembros del comité tutorial: Dra. Yasmín Alcalá Canto y Dr. Enrique Ángeles Anguiano por su apoyo y sus aportaciones que enriquecieron este trabajo.

A los miembros del jurado: Dra. Ana María Velázquez Sánchez, Dra. Yolanda Vera Montenegro, Dr. Rodrigo Rosario Cruz y Dra. María Guadalupe Prado Ochoa, por sus valiosas observaciones.

Al Dr. Enrique Ángeles Anguiano, a la Dra. Ana María Velázquez Sánchez y a sus equipos de trabajo por el diseño y síntesis de los compuestos evaluados en este trabajo.

A la Dra. María Guadalupe Prado Ochoa, por su apoyo, sus consejos y por ser un gran ejemplo a seguir.

Al Dr. Marco Antonio Muñoz Guzmán por sus consejos y aportaciones a mi formación profesional.

Al M. en C. César Cuenca Verde por su apoyo técnico en el Laboratorio de Inmunología y Biología Molecular de Parásitos para la realización de este trabajo, por su colaboración, sus aportaciones y su amistad.

A mis compañeros y hermanos BQD Omar Escobar Chavarría y M en C Tabata González por su apoyo y amistad.

A mis compañeros de laboratorio pMVZ Roberto López López y pMVZ Alejandro Casas, por su apoyo en la realización de este trabajo y su gran compañerismo.

A todos muchas gracias.

*Dedicada a*

*Mis padres Marcos y Lidia, mi hermana Nayeli y a Oscar*

*por su amor y apoyo total en cada uno de mis pasos.*

**“Empieza haciendo lo necesario, después lo posible, y de repente te encontrarás haciendo lo imposible.” - San Francisco de Asís**

---

# ÍNDICE

---

ÍNDICE.....	5
RESUMEN.....	7
ABREVIATURAS.....	8
INTRODUCCIÓN.....	9
SITUACIÓN EN MÉXICO DE LA GARRAPATA <i>Rhipicephalus sp.</i> .....	9
GENERALIDADES DE <i>R. microplus</i> .....	10
Clasificación taxonómica.....	10
Morfología.....	11
Ciclo biológico.....	13
PATOGENIA.....	14
CONTROL.....	16
Control químico.....	16
APLICACIÓN DE IXODICIDAS.....	20
RESISTENCIA A LOS IXODICIDAS.....	20
Mecanismos de resistencia.....	22
Mecanismos de resistencia en las familias de ixodicidas.....	22
Resistencia a ixodicidas el mundo.....	23
Situación de la resistencia a ixodicidas en México.....	24
Manejo de la resistencia a ixodicidas.....	25
CARBAMATOS.....	25
Mecanismo de acción.....	26
CARBAMATOS DE NUEVA SÍNTESIS.....	27
JUSTIFICACIÓN.....	30
OBJETIVOS.....	31
Objetivo general.....	31
Objetivos particulares.....	31
HIPÓTESIS.....	32
MATERIAL Y MÉTODOS.....	33
Ubicación.....	33
Material biológico.....	33
Compuestos evaluados.....	33
Técnica de cámaras.....	34
DISEÑO EXPERIMENTAL.....	35

<b>ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b> .....	40
<b>RESULTADOS</b> .....	41
<b>Conteo total de hembras repletas en cámaras</b> .....	41
<b>Porcentaje de oviposición</b> .....	44
<b>Porcentaje de inhibición de la oviposición</b> .....	47
<b>Porcentaje de eclosión</b> .....	49
<b>Reducción total de larvas producidas</b> .....	51
<b>DISCUSIÓN</b> .....	53
<b>CONCLUSIONES</b> .....	58
<b>REFERENCIAS</b> .....	59

---

## RESUMEN

---

La resistencia a los ixodicidas es el principal problema para el control de *Rhipicephalus microplus* en zonas tropicales y subtropicales del mundo. Lo anterior, ha conducido a diseñar, sintetizar y probar nuevas moléculas para el control de esta parasitosis. El objetivo del estudio fue determinar *in vivo* la supervivencia, la oviposición y la viabilidad de una cepa de garrapatas resistentes de *R. microplus* tratadas con dos nuevos carbamatos (*Etil 4-clorofenil carbamato* y *Etil 4-bromofenil carbamato*) en diferentes estadios de desarrollo (larvas, ninfas y adultas) mediante la técnica de cámaras. Los parámetros medidos fueron el total de hembras repletas por cámara, el porcentaje de oviposición de las hembras repletas, el porcentaje de inhibición de la oviposición, el porcentaje de eclosión de larvas de los huevos producidos por estas garrapatas y la reducción de larvas producidas.

Los compuestos fueron evaluados a la concentración inhibitoria de la eclosión (CIE<sub>99</sub>) obtenida previamente *in vitro*. El total de hembras repletas en cámaras disminuyó ( $p < 0.05$ ) con el tratamiento hasta en un 99%. El porcentaje de oviposición no se vio afectado ( $p > 0.05$ ), sin embargo, el porcentaje de inhibición de la oviposición disminuyó hasta en un 75% ( $p < 0.05$ ) en las garrapatas que sobrevivieron al tratamiento en comparación con su control. Además, se observó que el porcentaje de eclosión disminuyó hasta en un 100%, en presencia del tratamiento. La eficacia total calculada de estos productos se encuentra por arriba del 98%. En conclusión, estos nuevos carbamatos mostraron un buen potencial ixodicida *in vivo*, sin embargo, se requiere la realización de estudios complementarios para considerarlos una nueva opción farmacéutica en el control de garrapatas.

---

# ABREVIATURAS

---

%Ec	Porcentaje de eclosión
%InhOp	Porcentaje de inhibición de la oviposición
%Op	Porcentaje de oviposición
AChE	Acetilcolinesterasa
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> . Análisis de varianza
c.b.p.	Cuanto baste para
CIE	Concentración inhibitoria de la eclosión
DMSO	Dimetilsulfóxido
EE	Error estándar
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
g	Gramos
IO	Índice de Oviposición
kg	Kilogramos
LQM	Laboratorio de Química Medicinal
mg	Miligramos
mL	Mililitros
NOM	Norma Oficial Mexicana
PI	Pos-infestación
SAGARPA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación

---

# INTRODUCCIÓN

---

Las garrapatas son los ectoparásitos hematófagos más importantes del ganado en zonas tropicales y subtropicales del mundo (Anderson y Magnarelli, 2008). En México, las especies que afectan al ganado bovino son principalmente *Rhipicephalus microplus* y *Rhipicephalus annulatus* (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2006).

La infestación por estos ectoparásitos causa pérdidas económicas severas a la producción bovina, debido a que provoca anemia, disminución del consumo de alimento, disminución en la producción de carne, disminución en la producción de leche y daños a la piel de los animales. También restringe de manera importante la movilización del ganado debido a la transmisión de organismos causantes de enfermedades como la babesiosis y anaplasmosis. Adicionalmente, se incrementa el costo de producción por el empleo obligado de productos químicos y mano de obra para el control de garrapatas, además de los costos por tratamientos de las hemoparasitosis que transmiten (SAGARPA, 2014).

## **SITUACIÓN EN MÉXICO DE LA GARRAPATA *Rhipicephalus sp.***

En nuestro país (Figura 1) el territorio libre de garrapatas ocupa una porción importante del norte así como áreas del centro y comprende 94.4 millones de hectáreas, las cuales equivalen al 47.88% del territorio nacional. Las zonas en fase de erradicación cuentan con 1.1 millones de hectáreas y representan un 0.57%; y las áreas en fase de control en este momento alcanzan una superficie total de 101.6 millones de hectáreas y representan el 51.5% del país (SAGARPA, 2014).

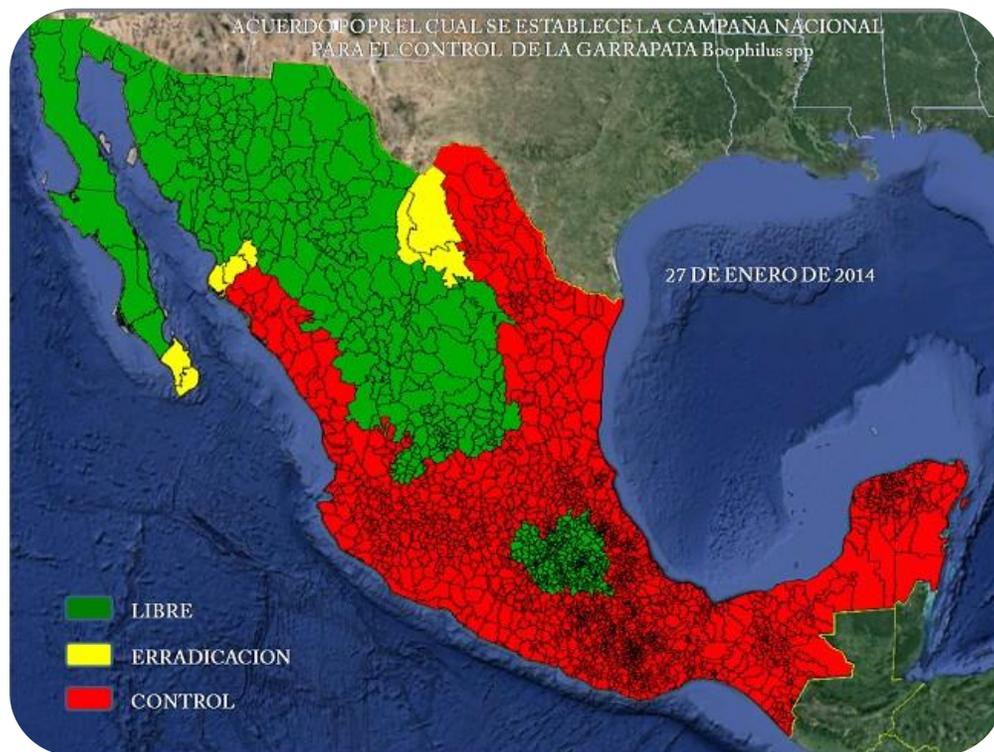


Figura 1: Clasificación del territorio nacional con relación a la presencia de *R. microplus* (SAGARPA, 2014).

## GENERALIDADES DE *R. microplus*

*R. microplus* es una garrapata originaria del sureste de Asia pero se ha distribuido a través de los trópicos como Australia, Este y Sur de África, y Centro de América; se introdujo a México junto con *R. annulatus* por el sur de los Estados Unidos (George, 2000; Barré *et al.*, 2008).

### Clasificación taxonómica

*R. microplus* (Canestrini, 1887) es del Phylum *Arthropoda*, Clase *Arachnida*, Orden *Acarina*, Suborden *Metastigmata* y Familia *Ixodidae* (Quiroz, 1984; Encinas *et al.*, 1999; Soulsby, 1988).

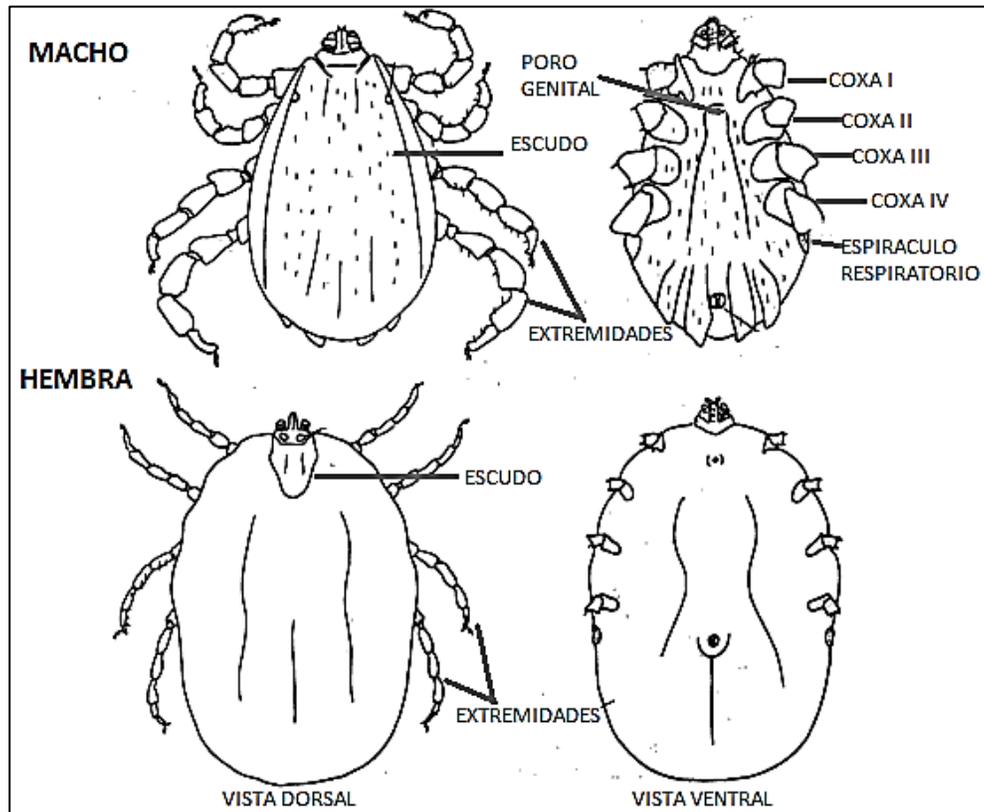
## Morfología

El cuerpo de las garrapatas está cubierto por un exoesqueleto formado por una capa cuticular quitinosa, está formado por una porción anterior denominada gnatosoma y una porción posterior denominada idiosoma (Figura 2). Las garrapatas pertenecientes a la familia *Ixodidae* (garrapatas duras) poseen escudo y el gnatosoma se encuentra en posición anterior con respecto al idiosoma (Quiroz, 1984; Anderson y Magnarelli, 2008). *R. microplus* es una garrapata dura, de color café oscuro, las hembras llegan a medir hasta 1.5 cm cuando están repletas y los machos hasta 0.5 cm. El gnatosoma es corto y su escudo es de color café sin ornamentaciones (Barker *et al.*, 2002). Los machos poseen un escudo que cubre casi todo el cuerpo, no así en las hembras en las que el escudo es pequeño y cubre aproximadamente un octavo del cuerpo, por lo que tienen la capacidad de expandir la cutícula para repletarse (Encinas *et al.*, 1999).

El gnatosoma o capítulo está formado por los órganos bucales y forma un canal de alimentación a través del cual el alimento pasa hacia el esófago. Las estructuras que lo conforman son: base del capítulo, palpos, quelíceros e hipostoma. Los quelíceros poseen una función quimiosensorial y los palpos están adaptados para el desgarrar del tejido. El hipostoma se introduce para formar el canal de alimentación, y posee una serie de prolongaciones para la fijación de la garrapata a su hospedero (Quiroz, 1984; Anderson y Magnarelli, 2008). En el caso de *R. microplus*, la base del capítulo es de forma hexagonal y los palpos no rebasan en tamaño al hipostoma (Kang *et al.*, 1985).

El idiosoma está formado por una parte anterior o propodosoma y una posterior o histerosoma. En el propodosoma se encuentran las patas y el poro genital, mientras que en el histerosoma se encuentran los espiráculos respiratorios y el ano.

La fase larvaria es hexápoda, mientras que las ninfas y adultas son octápoda. Las patas están divididas en seis segmentos: coxa, trocánter, fémur, gena, tibia y tarso. En el tarso del primer par de patas se encuentra el órgano de Haller el cual sirve para detectar temperatura, corrientes de aire, olores y químicos (Quiroz, 1984; Anderson y Magnarelli, 2008).



**Figura 2: Morfología externa de *R. microplus*. Vistas dorsal y ventral de macho y hembra adultos (Adaptado de Quiroz, 1984).**

Los espiráculos respiratorios tienen una forma muy característica en cada género, en el caso de *R. microplus* son circulares con una mácula central y están situados posterolateralmente a la cuarta coxa (Kang *et al.*, 1985).

## **Ciclo biológico**

*R. microplus* es una garrapata de un solo hospedero (Figura 3). Su hospedero definitivo es principalmente el bovino, aunque puede encontrarse también en venados. Las garrapatas tienen cuatro estadios evolutivos en su ciclo vital: huevo, larva, ninfa y adulto.

El ciclo biológico puede durar entre 4 y 10 meses; y comprende dos fases: la fase de vida libre o fase no parásita, y la fase parásita. La fase de vida libre inicia cuando la hembra repleta se desprende del hospedero y busca un lugar para ovipositar. El periodo de preoviposición es de 2 a 39 días y el periodo de oviposición es de 4 a 44 días. Cada hembra de *R. microplus* pone entre 3500 y 4400 huevos. Después, los huevos se incuban de 14 a 146 días hasta la eclosión de las larvas (Soulsby, 1988).

En la fase de vida libre se presentan dos etapas: la etapa pasiva y la etapa de búsqueda. Durante la etapa pasiva las larvas recién nacidas adquieren la madurez para buscar al hospedero alimentándose de su vitelo. Dentro de la etapa de búsqueda, las larvas suben a las puntas de los pastos para encontrar a su hospedero, al que detectan por medio de la emisión de dióxido de carbono, la vibración y el calor corporal (Anderson y Magnarelli, 2008).

La fase parásita comienza una vez que las larvas han hallado a su hospedero, se adhieren a su pelaje, insertan en la piel sus piezas bucales y comienzan a alimentarse. Mientras se alimenta, la larva realiza la muda a ninfa y posteriormente a adulto. El macho adulto busca a la hembra para la cópula. Posteriormente la hembra fecundada se ingurgita (repleción de sangre) y finalmente se desprende del hospedero, para llevar a cabo la oviposición en el suelo (Quiroz, 1984).

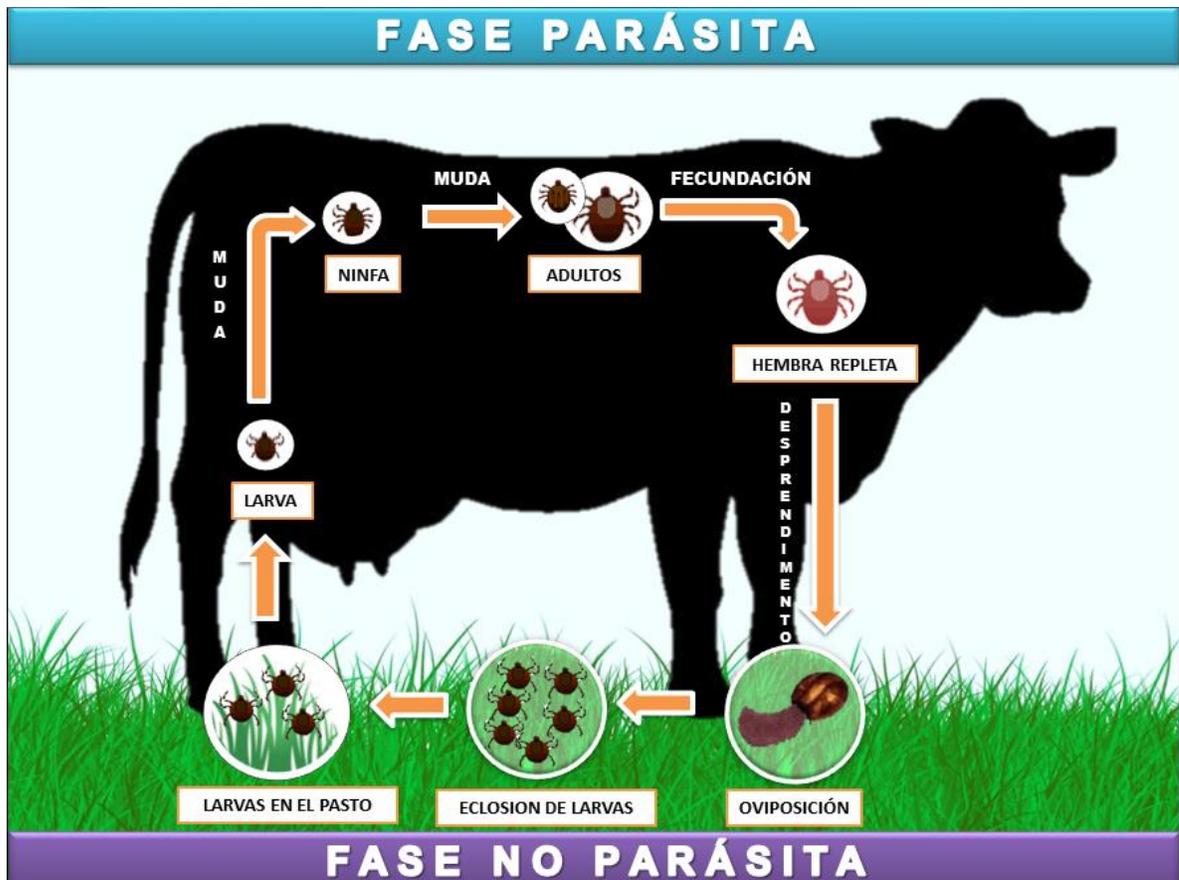


Figura 3: Ciclo biológico de *R. microplus*. Los estadios de la garrapata que ocurren sobre el hospedero son la fase parásita, y los que ocurren en el suelo pertenecen a la fase no parásita (Adaptado de Quiroz, 1984; Soulsby, 1988).

## PATOGENIA

Los daños que *R. microplus* genera a su hospedero se deben a las acciones patógenas traumática, expoliatriz, inoculatriz, tóxica y antigénica. La acción traumática es causada por la perforación de la piel del hospedero con las piezas bucales de la garrapata al momento de alimentarse. La acción expoliatriz consiste en la sustracción de sangre y líquidos tisulares, cuyo principal efecto es la anemia. En este sentido, cada hembra en estado adulto es capaz de consumir entre 0.5 mL y 1.2 mL de sangre, por lo que el total de la pérdida de volumen sanguíneo está directamente relacionado al grado de infestación de los animales. Además, la anemia puede agravarse

debido a hemoparasitos transmitidos que pueden tener acción lítica sobre los eritrocitos (Quiroz, 1984; Jonsson *et al.*, 2006).

La acción inoculatriz, corresponde a la introducción de agentes patógenos causantes de otras enfermedades en el hospedero. Las garrapatas son vectores de microorganismos tales como protozoarios, rickettsias, espiroquetas y virus. *R. microplus* es el principal transmisor de *Babesia bigemina* en Australia, Panamá y América, *Babesia argentina* en Australia y Argentina, y *Anaplasma marginale* en Australia y América (Soulsby, 1988; Uilenberg, 1995; De Castro, 1997).

Las acciones tóxica y antigénica son asociadas a las secreciones salivales de la garrapata que son inyectadas por la herida y que contribuyen a prevenir la coagulación de la sangre y la reacción inflamatoria, además de que inhiben el dolor causado por la presencia de la garrapata (Quiroz, 1984).

También, se ha sugerido que las infestaciones masivas por garrapatas tienen efecto supresor del apetito en ganado de leche, basado en que los animales afectados por garrapatas consumen menor cantidad de materia seca, por lo que se observa en ellos disminución de la producción láctea y disminución de la condición corporal. Así mismo, se ha observado que los animales que no ingieren los requerimientos mínimos diarios de acuerdo a su fin zootécnico, sufren infestaciones de un grado mayor que los animales bien nutridos (Jonsson *et al.*, 2006). En un estudio realizado en ganado Holstein-Fresian, se demostró que por cada hembra repleta, hubo una pérdida productiva de hasta 2.86 mL de leche por día y hasta 1.0 g de peso vivo en los animales infestados relacionado a un bajo consumo de materia seca (Jonsson *et al.*, 1998; Jonsson *et al.*, 2000).

## **CONTROL**

Existen dos tipos de control para la ixodidosis: el control químico y el control no químico. El control químico ha sido el más utilizado y se ha basado en el empleo de productos de diferentes familias químicas a lo largo de la historia. El control no químico conocido también como control biológico, se basa en el manejo de diversos métodos, como la cruce de animales para aumentar la resistencia natural del bovino determinada por la raza, el uso de inmunógenos con base en antígenos provenientes de células intestinales de las garrapatas, el uso de determinados tipos de forrajes en los potreros, el empleo de biopesticidas, el manejo de praderas de acuerdo al ciclo biológico de las garrapatas y también el control por medio de patógenos para estos ectoparásitos o el control mediante otros organismos que fungen como depredadores de fases no parásitas (Samish y Rehacek, 1999). Sin embargo, el control no químico no ha resultado del todo exitoso, debido a que los mecanismos de acción de estas medidas son muy lentas y no permiten observar un efecto con impacto inmediato; razón por la cual, se ha preferido el uso de ixodicidas químicos. En la actualidad se ha propuesto realizar un manejo integral, en el que se emplee ambos tipos de control, para evitar la aparición de resistencia a los productos químicos, así como disminuir el daño ambiental que genera el uso de estos.

### **Control químico**

Hasta ahora el uso de productos químicos con efectividad contra garrapatas llamados ixodicidas, ha sido el tipo de control más empleado en todo el mundo para combatirlas. Se han tratado de desarrollar ixodicidas que cumplan con una alta efectividad, sin causar daño a los animales, al humano y/o al ambiente. El avance de la investigación en la biología de las garrapatas, ha dado conocimiento de su estructura, fisiología y comportamiento, lo que puede ser aplicado para diseñar fármacos con

mecanismos de acción más específicos que puedan detener su reproducción, viabilidad y/o diseminación.

Los primeros intentos de aplicación de ixodicidas se realizaron en el año de 1893, utilizando como garrapaticidas aceite de semilla de algodón, aceite de pescado, petróleo crudo, keroseno, creosote, extracto de tabaco, jabón o sulfuro, que se administraban dos o tres veces por semana con ayuda de esponjas y cepillos. Posteriormente en 1895 se comenzó a sumergir al ganado en mezclas que contenían este tipo de sustancias (George, 2000; Botana *et al.*, 2002; George *et al.*, 2004).

El arsénico se introdujo como novedad reemplazando los remedios anteriores, y demostró ser altamente efectivo contra las garrapatas. El primer informe del uso de arsénico como acaricida, está reportado en garrapatas *R. microplus* en ganado Angus de Australia en 1896, a esta preparación se le conoció como “Queensland Dip” o “Australian Dip”. Sin embargo, otras referencias indican que el arsénico se utilizó por primera vez en la República de Sudáfrica en 1893. La resistencia a este compuesto apareció alrededor de cincuenta años después de su utilización como ixodicida. Las razones más importantes para reemplazar al arsénico por insecticidas orgánicos sintéticos fueron: la cercanía de la dosis terapéutica con la concentración tóxica, la acumulación de este compuesto en los tejidos de los animales y la aparición de resistencia (George *et al.*, 2004).

Después de la Segunda Guerra Mundial, se dio a conocer otro grupo de compuestos conocidos como organoclorados tales como el diclorodifeniltricloroetano (DDT), el hexaclorociclo-hexano (HCH), el hexaclorobenceno (BHC), el toxafeno y la dieldrina. Este grupo fue ampliamente utilizado en regiones resistentes al arsénico, y fueron los primeros en ser comercializados también. Su prohibición se debió a su

acumulación en el tejido adiposo de los animales y su persistencia en el ambiente (George *et al.*, 2004).

Posteriormente los compuestos organofosforados como el etión, coumafós, clorfenvinfós y clorpirifós reemplazaron a los organoclorados (Botana *et al.*, 2002). Los organofosforados se han utilizado ampliamente, demostrando tener una muy buena acción. Sin embargo, se ha observado que presentan una elevada toxicidad en vertebrados, además de guardar una relación con gases neurotóxicos como los gases sarín, soman y tabun (George *et al.*, 2004).

Los carbamatos como el carbaryl y promacyl, son compuestos derivados del ácido carbámico que se caracterizan por tener una muy baja toxicidad. El mecanismo de acción tanto de los organofosforados como de los carbamatos, es la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (AChE), motivo por el que generalmente se presenta resistencia cruzada con los organofosforados (George, 2000).

Los piretroides naturales son un grupo de ixodicidas muy costosos e inestables en presencia de la luz solar, sin embargo, sirvieron como predecesores de los piretroides sintéticos que son altamente efectivos como acaricidas, incluyendo compuestos como permetrina, deltametrina, decametrina, flumetrina, cyhalotrina y cyflutrina. Su prolongado efecto residual es una desventaja en su empleo, debido a esta característica se aumenta la presión de selección de cepas resistentes a estos ixodicidas (George *et al.*, 2004).

En 1970 se sintetizaron las formamidinas y cicloamidinas como: clordimeform, clomethiuron, clenpyrin y amitraz (George *et al.*, 2004; Botana *et al.*, 2002). El clordimeform se utilizó en Australia como aditivo en los baños de inmersión para tratar a los animales con cepas resistentes a

organofosforados. Sin embargo, en 1976 se retiró del mercado debido a que se comprobó su efecto carcinogénico. El amitraz es el más empleado en el mundo, debido a que es un compuesto altamente efectivo; a pesar de ser un compuesto inestable en baños de inmersión, pero si se agrega hidróxido de calcio para lograr un pH de 12 el principio activo permanece estable (George *et al.*, 2004).

Las lactonas macrocíclicas son otro grupo de acaricidas, existen dos tipos; las avermectinas (ivermectina, eprinomectina y doramectina) y las milbemicinas (moxidectina) obtenidas de *Streptomyces avermitilis* y *S. higroscopicus aureolacrimosus* respectivamente. Su principal ventaja es que la dosis tóxica para las garrapatas es baja en comparación con otros productos y su aplicación puede ser por vía subcutánea, oral o epicutánea pero su alto costo limita su uso (George, 2000; George *et al.*, 2004).

El fipronil es una fenilpirazolona que aplicada por vía epicutánea tiene una eficacia del 99% en animales alojados en unidades de producción intensivas, además provee de protección contra la reinfestación por larvas hasta por ocho semanas pos-tratamiento. Sin embargo, en condiciones de producción extensiva, su vida se ve reducida, debido a las condiciones ambientales como la luz solar, que reduce su acción dos o tres semanas después de su aplicación (George *et al.*, 2004).

Hacia finales del siglo XX aparecieron otros compuestos derivados de benzoil fenil urea que actúan inhibiendo la formación de quitina, tal es el caso del lufenurón, flufenoxuron, diflubenzuron y fluazurón. Su principal efecto en garrapatas es la reducción casi total de la fertilidad y fecundidad de hembras repletas, además de producir mortalidad de fases inmaduras debido a que les impide mudar al siguiente estadio. El fluazurón puede persistir hasta por doce semanas, aunque su uso es restringido debido a

que se excreta en la leche, lo cual es indeseable para la cría y para el consumo humano (George *et al.*, 2004).

El metopreno es un análogo sintético de la hormona ecdisona producida por fases juveniles de la garrapata, la cual es promotora del cambio de estadio, el metopreno bloquea el desarrollo juvenil evitando que se llegue al estadio adulto. Debido a que la ecdisona es una hormona que no poseen los mamíferos, su margen de seguridad es muy amplio, lo cual es ventajoso para su uso (Botana *et al.*, 2002).

## **APLICACIÓN DE IXODICIDAS**

El éxito de un ixodicida depende de la toxicidad del principio activo, la calidad y estabilidad del producto, su correcta dosificación o de la superficie alcanzada en el cuerpo del animal. Es por ello que el método de aplicación de un ixodicida dependerá de las características del producto. En este sentido, los métodos más sencillos son la aplicación epicutánea y la parenteral. Los baños de inmersión han caído en desuso debido al alto costo de las instalaciones que se requieren y han sido sustituidos por el baño de aspersión que ofrece las mismas ventajas y con un equipamiento más portátil.

## **RESISTENCIA A LOS IXODICIDAS**

La resistencia a un fármaco con acción sobre garrapatas, se define como la capacidad de una fracción poblacional de estos parásitos para sobrevivir a ciertas concentraciones de productos ixodicidas, que resultan letales o afectan la reproducción del resto de la población considerada como normal (susceptible), la cual una vez establecida es hereditaria (NOM-019-ZOO-1994).

Existen tres fases en el desarrollo de la resistencia a los ixodicidas (Alonso-Díaz *et al.*, 2006; Cardozo, 2007):

- 1) *Fase de establecimiento*: Esta ocurre cuando aparece el alelo resistente en una población, generalmente es un proceso dado por mutaciones naturales, independiente a la presión de selección.
- 2) *Fase de desarrollo o diseminación*: Es el aumento del número de individuos resistentes después del uso de ixodicidas químicos. En este pueden ocurrir dos métodos de selección: la selección rápida ocurre cuando el gen de resistencia es dominante o parcialmente dominante y permite la selección de heterocigotos. La selección lenta se da cuando los alelos son recesivos. En esta fase aún no son detectables las fallas de los ixodicidas llevándose a cabo la dispersión hacia otras regiones en forma desapercibida.
- 3) *Fase emergente*: El alelo resistente es lo suficientemente común en la población. En ésta la eficacia de los ixodicidas ha disminuido considerablemente debido a la alta presión de selección.

Los factores principales asociados a la evolución de la resistencia, son los genéticos, que incluyen la frecuencia de los alelos resistentes, el número de alelos, la dominancia y la expresividad de estos; los factores biológicos que son los propios de la especie, como número de generaciones, número de descendientes por generación, sobrevivencia y refugio; y operacionales del químico, lo cuales incluyen la persistencia de residuos, tipo de aplicación, formulación y umbral de aplicación y selección.

## **Mecanismos de resistencia**

En las últimas décadas se realizaron numerosos estudios dirigidos a conocer los diversos procesos bioquímicos y genéticos desarrollados por las garrapatas para evitar o disminuir el efecto de los productos químicos. De acuerdo al tipo de respuesta al producto químico, la resistencia ha sido agrupada en 4 categorías (Alonso-Díaz *et al.*, 2006):

- a) Resistencia de comportamiento: El parásito modifica su conducta para evitar el químico.
- b) Resistencia de la penetración: Es la modificación de algunos compuestos presentes en el exoesqueleto para impedir o retardar la penetración del producto.
- c) Resistencia metabólica: Es la detoxificación del producto químico por procesos enzimáticos que radica en la modificación en las vías metabólicas del parásito.
- d) Insensibilidad del sitio de acción: En esta se ve la modificación del sitio de acción del ixodicida para disminuir el efecto del producto químico.

## **Mecanismos de resistencia en las familias de ixodicidas**

Se han descrito distintos tipos de resistencia en presencia de los compuestos de las diferentes familias de ixodicidas.

*Organofosforados:* En insectos, las mutaciones del gen codificante de AChE se han reportado en presencia de organofosforados (Temeyer *et al.*, 2006). También se ha reportado otro mecanismo de resistencia a estos mismos compuestos, ligado a un aumento en la actividad de la citocromo monoxigenasa P450 (Baffi *et al.*, 2007).

*Piretroides*: La mutación en el gen del canal de sodio inhibe el efecto tóxico de los piretroides debido a la modificación estereoquímica de la estructura del canal (Jamroz *et al.*, 2000). En *R. microplus* se ha documentado la sustitución de una fenilalanina por una isoleucina en el gen del canal de sodio de cepas mexicanas (He *et al.*, 1999). También se ha visto que existe una esterasa metabólica específica con actividad de hidrolizar la permetrina (Jamroz *et al.*, 2000).

*Fenilpirazolonas*: En la actualidad, no se conocen los mecanismos verdaderos de resistencia a éstos compuestos. Sin embargo, se cree que la resistencia a fipronil se debe en parte a la actividad de una esterasa elevada (CzEst9), que fue preseleccionada por el uso generalizado de permetrina en la década de 1980 en México (Miller *et al.*, 2013).

*Amidinas*: El amitraz ha sido un compuesto muy utilizado contra garrapatas, sin embargo, existe evidencia de las mutaciones de un gen putativo del receptor octopamina en *R. microplus* resistente a este compuesto (Chen *et al.*, 2007).

### **Resistencia a ixodidas en el mundo**

Se ha reportado el fenómeno de resistencia desde los años 40's y 50's en Australia, Sudamérica y África, años en que aparecieron poblaciones de garrapatas resistentes a diversos compuestos organoclorados. A finales de los 50's y principios de los 60's se presentó en Australia y Sudáfrica resistencia a compuestos inhibidores de las colinesterasas como carbamatos y organofosforados. Para finales de los años 70's ya se habían reportado en Australia cepas de garrapatas

resistentes a amidinas y para inicios de los 80's se tenía conocimiento de la resistencia a los piretroides en Australia (Soberanes-Céspedes *et al.*, 2002).

### **Situación de la resistencia a ixodícidas en México**

Se ha documentado la resistencia de *R. microplus* hacia ixodícidas organoclorados y organofosforados en nuestro país desde 1981, cuando se caracterizó la cepa "Tuxpan". Durante la misma década, también se aisló la cepa "Tempoal" resistente a éstos mismos compuestos. Garrapatas de ambos tipos de cepas se distribuyen actualmente en las Huastecas Mexicanas y en el estado de Yucatán (Alonso-Díaz *et al.*, 2006).

La resistencia a piretroides se observó por primera vez en 1993. Las cepas "Coatzacoalcos" y "Aldama" son medianamente resistentes a permetrinas, sin embargo, las cepas "La Mora" y "San Jorge" provenientes del golfo de México, además de presentar resistencia a piretroides, también la presentaron hacia compuestos organofosforados (Alonso-Díaz *et al.*, 2006).

Debido a la resistencia a los compuestos antes mencionados, se comenzó a utilizar el amitraz. Sin embargo, la alta presión de selección ejercida, provocó en 2001 la aparición de cepas triple resistentes como lo es la cepa "San Alfonso", resistente a organofosforados, piretroides y amidinas (Alonso-Díaz *et al.*, 2006).

Recientemente, se ha detectado la resistencia de *R. microplus* a la ivermectina (Pérez-Cogollo *et al.* 2010), y también la resistencia al fipronil en cinco cepas de Tamaulipas, México (Miller *et al.*, 2013).

## **Manejo de la resistencia a ixodicidas**

Se han sugerido dos formas para controlar la resistencia en una población de garrapatas: saturación y moderación. La saturación consiste en la utilización del mismo producto hasta que el cambio es forzoso por la dispersión de la resistencia. La concentración y frecuencia de los tratamientos se incrementan progresivamente. La moderación es un método basado en el reemplazo inmediato del compuesto al que existe la resistencia. Para lograr el reemplazo de estos compuestos se han evaluado nuevos productos con el fin de encontrar alternativas farmacéuticas para el tratamiento de la ixodidosis (Alonso-Díaz *et al.*, 2006).

## **CARBAMATOS**

Los carbamatos son definidos como ésteres del ácido carbámico; estructuralmente presentan una región principal constituida por el metilcarbamato de un fenol, con un sustituyente de carácter básico (Botana *et al.*, 2002). Son compuestos moleculares sencillos derivados inicialmente de la fisostigmina, sin embargo, en la actualidad estos compuestos son de origen sintético (Gupta, 2006).

A partir de los años 70's, los carbamatos se han empleado de diversas maneras, como herbicidas en la agricultura, ectoparasiticidas en veterinaria, plaguicidas en cuidados forestales e incluso en medicina humana para el tratamiento de algunas enfermedades degenerativas como Alzheimer, miastenia gravis y glaucoma, como antimicrobianos, anestésicos locales, anticonvulsivos, antiulcerosos, anticarcinogénicos, etc. (Odilón, 1993; Botana *et al.*, 2002; Ordaz-Pichardo *et al.*, 2005; Gupta, 2006).

Dentro de los carbamatos utilizados en la actualidad se encuentran el aldicarb, aminocarb, carbaril, carbofuran, carbosulfan, metiocarb entre otros

(Gupta, 2006). En medicina veterinaria los carbamatos empleados para el control de artrópodos son el propoxur y el carbaril (Botana *et al.*, 2002).

### **Mecanismo de acción**

Algunos carbamatos como los N-metil carbamatos tienen una alta afinidad por las esterasas tales como la quimiotripsina, la AChE, la pseudocolinesterasa, carboxilesterasa y otras esterasas no específicas (Córdoba, 2006). La AChE actúa en las sinapsis colinérgicas terminando el impulso nervioso producido por el neurotransmisor acetilcolina. Estos compuestos reaccionan con la AChE de forma análoga a la acetilcolina (Sogorb y Vilanova, 2002). La acción inhibitoria en la función de la AChE de los artrópodos, prolonga la excitación nerviosa causada por el neurotransmisor acetilcolina provocando parálisis neuromuscular y la muerte por tetanización (Tan *et al.*, 2011).

Por otra parte, los carbamatos benzimidazoles han mostrado tener interacción con los centros de organización de los microtúbulos, especialmente con uno de los dímeros que los forman, la  $\beta$ -tubulina, de algunos protozoarios como *Trichomona vaginalis* y *Giardia lamblia*, además sobre helmintos y hongos, provocando efectos en la morfología y sobre el índice mitótico en dichos parásitos (Carvalho y Gadelha, 2007; Chávez *et al.*, 1992; Katiyar *et al.*, 1994); Se ha demostrado que el mecanismo de acción del flubendazol sobre *Toxocara canis* y *Ascaris suum* es el de impedir la polimerización de los microtúbulos en el interior de las células de dichos parásitos, provocando severos daños en su hipodermis e intestinos y evita la formación de gametos (Hanser *et al.*, 2002).

Por lo anterior, es indispensable que cuando se sinteticen nuevos carbamatos se evalúe eficacia sobre diferentes organismos, su mecanismo de acción y su toxicidad.

## **CARBAMATOS DE NUEVA SÍNTESIS**

En la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán se han producido una serie de nuevos carbamatos. El diseño y síntesis de estos productos se llevó a cabo por parte del grupo de investigadores del Laboratorio de Química Medicinal de la FESC (Ángeles *et al.*, 2000).

A algunos de estos carbamatos se les ha estudiado su actividad antibiótica sobre *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Vibrio cholerae*, *Enterobacter aerogenes* y *Helicobacter pylori* demostrando tener una eficacia de más del 50% (Bernal, 2000; Reyes-González, 2007).

En cuanto a su actividad antiparasitaria, se ha demostrado que estos carbamatos tienen una actividad de entre el 50-80% sobre *Hymenolepis nana* en ratones (Bernabe-Pérez, 2007), y sobre cepas de *Giardia intestinalis* susceptibles y resistentes al albendazol (Jiménez-Cardoso *et al.*, 2004); así como su actividad inhibitoria hasta en un 97% sobre el crecimiento *in vitro* de *Entamoeba histolytica* (Ordaz Pichardo *et al.*, 2005).

Por otro lado se evaluó la actividad antimicótica de estos carbamatos, en *Trichophyton mentagrophytes* y *Aspergillus fumigatus*; inhibiendo su crecimiento en más del 60% (Reyes-González, 2007).

Así mismo, se han realizado pruebas con estos compuestos que han permitido demostrar su potencial ixodicida y su posible uso en animales. Dichos ensayos se han realizado por el grupo de investigadores del laboratorio de Inmunología y Biología Molecular de Parásitos de la FESC.

Inicialmente se realizaron las pruebas *in vitro* de estos compuestos con cepas susceptibles y resistentes de *R. microplus*, de estos ensayos se obtuvo que los carbamatos identificados como LQM 919 y LQM 996, inhiben la oviposición en más del 60% e inhiben la eclosión de los huevos producidos por las garrapatas tratadas con los carbamatos hasta en un 100%; además los huevos ovipositados por las garrapatas tratadas se observaron disgregados, oscuros, secos y no fueron viables (Prado-Ochoa *et al.*, 2013; Pérez-González *et al.*, 2013). Por otro lado se evaluó el efecto del etil-4-clorofenil-carbamato (LQM 996) y del etil-4-bromofenil-carbamato (LQM 919) sobre la actividad de AChE, estructura de los huevos y órganos reproductores de dos cepas de *R. microplus*; cuyos resultados mostraron que los efectos de estos carbamatos son independientes a la actividad de la AChE y que las alteraciones morfológicas de los órganos reproductores fueron debidas a la acción de estos carbamatos sobre la vitelogénesis y viabilidad de las células del ovario (Prado-Ochoa *et al.*, 2014b).

Posteriormente se realizaron las pruebas toxicológicas. Se determinó la toxicidad oral aguda y dérmica aguda del etil-4-clorofenil-carbamato (LQM 996) y del etil-4-bromofenil-carbamato (LQM 919) en ratas. La dosis letal 50 (DL50) oral fue de 300-2000 mg/kg y la dérmica de >5000mg/kg para ambos carbamatos, aunque se presentaron algunos signos de toxicidad en la exposición oral, en la exposición dérmica no se observaron signos de toxicidad en ninguna de las dosis empleadas. Con lo anterior se demostró que los carbamatos evaluados son de baja toxicidad oral y dérmica (Prado-Ochoa *et al.*, 2014a). También se evaluó la toxicidad subcrónica en ratas con los carbamatos LQM 919 y LQM 996. En este estudio se observaron alteraciones en algunos de los parámetros evaluados como el hematocrito, porcentaje de reticulocitos, algunas enzimas hepáticas y creatinina en las ratas expuestas a los carbamatos y se demostró la reversibilidad de estas

alteraciones al suspender la exposición a los productos. Con este estudio fue posible determinar que la dosis sin efectos adversos observables (NOAEL) es de 12.5 mg/kg/día (Prado-Ochoa *et al.*, 2014c).

Finalmente, se evaluó por medio de la prueba de micronúcleos en sangre periférica de rata el daño genético *in vivo* producido por los carbamatos evaluados, además se evaluó el efecto de los carbamatos *in vitro* sobre la cinética de proliferación celular en cultivos de linfocitos humanos. Los resultados de este estudio mostraron el bajo potencial genotóxico de los carbamatos estudiados en algunas dosis empleadas, así como su efecto sobre el ciclo celular (Prado-Ochoa, 2013).

---

## JUSTIFICACIÓN

---

Debido a los problemas generados por la resistencia de las garrapatas a las familias comerciales de ixodicidas químicos, la falta de control integral y la poca o nula aplicación de otros tipos de control como el biológico, es permanente la necesidad de la creación de productos de nueva síntesis para el control químico de las garrapatas. El trabajo conjunto de Químicos, Médicos Veterinarios y otros profesionales en la FES-Cuautitlán, ha permitido diseñar, sintetizar y evaluar nuevos compuestos para tal fin. En el Laboratorio de Química Medicinal de la FESC, se diseñaron y sintetizaron una serie de nuevos carbamatos, los cuales posteriormente fueron evaluados en el Laboratorio de Inmunología y Biología Molecular de Parásitos de la UIM-FESC. Los resultados mostraron que los carbamatos identificados como LQM 919 y LQM 996 tuvieron una buena eficacia en pruebas *in vitro* sobre cepas susceptibles y resistentes de garrapatas *R. microplus* además de obtener las concentraciones que son efectivas (LQM 919= 0.703 mg/mL y LQM 996= 0.589 mg/mL) (Prado-Ochoa *et al.*, 2013; Pérez-González *et al.*, 2013). Posteriormente, se realizaron estudios de toxicidad aguda oral, crónica oral y aguda dérmica, además de evaluar la genotoxicidad y la citotoxicidad de estos compuestos; con lo que se pudo clasificar a los carbamatos antes mencionados como de baja toxicidad según parámetros de la OCDE (Prado-Ochoa, 2013; Prado-Ochoa *et al.*, 2014a; Prado-Ochoa *et al.*, 2014b; Prado-Ochoa *et al.*, 2014c). Sin embargo, no existen trabajos que hayan evaluado el efecto de estos carbamatos sobre garrapatas que se encuentren parasitando a bovinos. Por lo tanto en este proyecto se pretende evaluar la eficacia de estos carbamatos *in vivo* para determinar si pueden ser una nueva alternativa farmacéutica para el control de la ixodidosis en el ganado bovino.

---

# OBJETIVOS

---

## ***Objetivo general***

Evaluar *in vivo*, el efecto de los carbamatos de nueva síntesis Etil-4 cloro-fenilcarbamato y Etil-4 bromo-fenilcarbamato (identificados como LQM 919 y LQM 996 respectivamente) sobre las fases parásitas de la garrapata *Rhipicephalus microplus* presentes en bovinos.

## ***Objetivos particulares***

- Evaluar el efecto de los carbamatos identificados como LQM 919 y LQM 996 sobre las diferentes fases parásitas de *R. microplus* en bovinos.
- Determinar si la exposición de diferentes estadios de garrapatas a los carbamatos de nueva síntesis repercute en la oviposición de las hembras que se logren repletar.
- Determinar si la eclosión de las larvas de huevos ovipositados por hembras tratadas se ve afectada por la exposición a los carbamatos LQM 919 y LQM 996.

---

# HIPÓTESIS

---

La exposición *in vivo* de garrapatas *R. microplus* a los carbamatos LQM 919 y LQM 996, generará el desprendimiento de fases parásitas, además de la disminución en la cantidad y viabilidad de los huevos producidos.

---

# MATERIAL Y MÉTODOS

---

## Ubicación

Este trabajo se desarrolló en el laboratorio de Inmunología y Biología Molecular de Parásitos de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria (Laboratorio 1) y en las instalaciones del módulo de producción pecuaria de posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.

## Material biológico

**Cepa de garrapatas *R. microplus*:** Se utilizó la cepa “San Alfonso”, que es una cepa resistente a organofosforados, piretroides y amidinas. Esta cepa fue donada por el Centro Nacional de Parasitología (SAGARPA); las fases parásitas se mantuvieron a través de infestaciones controladas en bovinos y las fases no parásitas se mantuvieron *in vitro* en el laboratorio.

**Animales:** Se utilizaron toretes raza Holstein-Fresian, clínicamente sanos y con un peso de entre 100-150 kg.

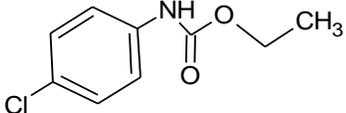
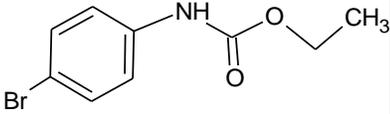
Los bovinos fueron alojados en infestaderos cuyo diseño limita parcialmente el movimiento para evitar que por conducta natural el animal se desprenda las garrapatas del cuerpo. La alimentación de los animales consistió en alfalfa achicalada y agua *ad libitum*. Las porciones de mantenimiento fueron calculadas de acuerdo al peso y edad de los animales.

## Compuestos evaluados

Se evaluaron dos carbamatos que fueron diseñados y sintetizados en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por el equipo de trabajo del Dr. Enrique Ángeles Anguiano. Estos se sintetizaron utilizando derivados

halogenados de aminas aromáticas con cloroformiato de etilo, empleando bicarbonato de sodio y acetona como medio de reacción, posteriormente se purificaron mediante cromatografía en columna y se recrystalizaron. Su estructura fue elucidada mediante técnicas espectroscópicas (Muñoz-Cuevas, 2012)

La estructura química, el peso molecular y la nomenclatura de éstos compuestos se presentan en el Cuadro 1. Para facilidad del texto, estos compuestos serán referidos por su clave de identificación.

NOMBRE QUÍMICO	ESTRUCTURA	PESO MOLECULAR (g/mol)	CLAVE
Etil (4-clorofenil) carbamato		199.63	LQM 996
Etil (4-bromofenil) carbamato		244	LQM 919

**Cuadro 1: Nombre, estructura y peso molecular de los carbamatos de nueva síntesis utilizados en el proyecto**

### Técnica de cámaras

Esta técnica está descrita en la norma NOM-006-ZOO-1993 de SAGARPA ("Requisitos de efectividad biológica para los ixodicidas de uso en bovinos y método de prueba"). La prueba proporciona información útil acerca de la efectividad que alcanzan productos ixodicidas cuando se aplican en áreas seleccionadas de la piel del bovino, en las cuales se encuentran presentes garrapatas en distintos estadios de desarrollo, incluyendo aquellas en fase de muda. Por otro lado, la oportunidad de realizar seguimientos "*in vitro*" de los especímenes colectados durante el periodo posterior al tratamiento, complementa y enriquece los resultados de estas evaluaciones.

Los bovinos se alojan de forma individual en infestaderos. En cada bovino se seleccionan de 4 a 6 áreas del dorso en las cuales se rasura el perímetro de un círculo, y posteriormente se pegan cámaras de tela de algodón (Figura 4). Después de 24 horas, se colocan dentro de éstas cámaras



**Figura 4: Bovino con la técnica de cámaras preparado para infestar.**

larvas de la especie de garrapata a estudiar, y se cierran. Se realizan infestaciones en diferentes momentos con el fin de tener garrapatas de distintos estadios evolutivos. Los tratamientos se aplican por aspersión manual a las concentraciones previamente determinadas. Una vez que las garrapatas alcanzan la repleción, se colectan de las cámaras para dar el seguimiento de la oviposición y la eclosión de larvas *in vitro*.

## **DISEÑO EXPERIMENTAL**

En la Figura 5 se muestra un esquema del diseño experimental. Los dos carbamatos fueron evaluados mediante la técnica de cámaras modificada. Se realizó un ensayo y una repetición de la técnica *in vivo*. Para cada ensayo, se utilizaron 4 bovinos de la raza Holstein-Fresian, por lo que para cada uno de los productos se utilizaron 8 bovinos diferentes.

El día 0 se colocaron dentro de las cámaras aproximadamente 1000 larvas de *R. microplus* de la cepa San Alfonso. El tratamiento que recibieron los bovinos de cada ensayo se resumen en el Cuadro 2. En cada cámara se aplicaron 200 mL de la solución preparada. Las soluciones para los animales tratados contenían el producto a evaluar según el caso (LQM 919= 0.703 mg/mL y LQM 996= 0.589 mg/mL), se utilizó como vehículo

Dimetilsulfóxido (4%) y agua destilada (c.b.p. 200 mL). Las cámaras de los bovinos testigo (bovino 4 de cada ensayo) solo fueron asperjadas con 200 mL del vehículo (Figura 6).



**Figura 6: Aplicación del tratamiento en las cámaras**

Entre los días 21 a 26 P.I. se recolectaron de las cámaras, las garrapatas que lograron alcanzar la repleción. Posteriormente, éstas se pesaron en balanza analítica en grupos de 10 y se colocaron en cajas Petri. Se colocaron en total 3 cajas Petri con garrapatas de cada una de las cámaras. Éstas se incubaron durante 15 días en estufa entomológica a  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$  con una humedad relativa del 80-90%. Posteriormente, se realizó el conteo de la cantidad de hembras que ovipositaron en cada caja. A continuación, se separó la masa de huevos y se pesó en balanza analítica. La masa de huevos recolectada de cada caja se colocó en frascos de cristal y se incubó en estufa entomológica a  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ , con una humedad relativa del 80-90% hasta la eclosión de las larvas (SAGARPA, 2014).

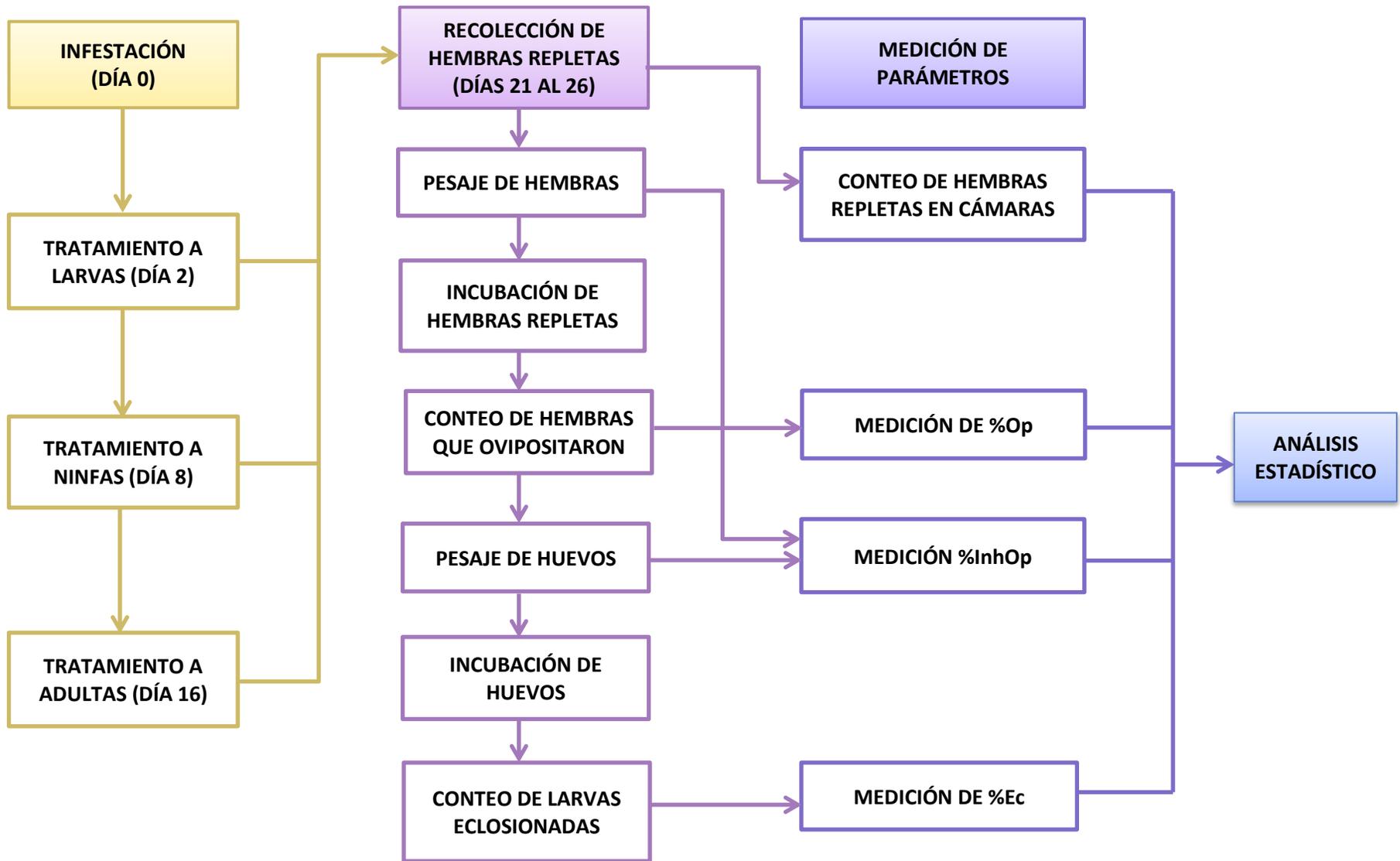


Figura 5: Diseño experimental. %Op: Porcentaje de oviposición; %InhOp: Porcentaje de Inhibición de la Oviposición; %Ec: Porcentaje de Eclosión

<b>ENSAYO</b>	<b>BOVINO</b>	<b>NO. DE CÁMARAS POR BOVINO</b>	<b>CARBAMATO USADO</b>	<b>DÍA DE TRATAMIENTO</b>
<b>1</b>	1	4	LQM 919	2 PI
	2	4		8 PI
	3	4		16 PI
	4	3	ÚNICAMENTE VEHÍCULO	2, 8, 16 PI
<b>2</b>	1	4	LQM 919	2 PI
	2	4		8 PI
	3	4		16 PI
	4	3	ÚNICAMENTE VEHÍCULO	2, 8, 16 PI
<b>3</b>	1	4	LQM 996	2 PI
	2	4		8 PI
	3	4		16 PI
	4	3	ÚNICAMENTE VEHÍCULO	2, 8, 16 PI
<b>4</b>	1	4	LQM 996	2 PI
	2	4		8 PI
	3	4		16 PI
	4	3	ÚNICAMENTE VEHÍCULO	2, 8, 16 PI

**Cuadro 2:** Esquema de los tratamientos y momentos de aplicación de los mismos, que recibieron los bovinos en el presente trabajo.

## Parámetros evaluados

- *Conteo total de hembras repletas*: Es el conteo total de las hembras que alcanzaron la repleción dentro de las cámaras durante los días de caída de las garrapatas (FAO, 2011).
- *Porcentaje de oviposición (%Op)*: Se calculó tomando los datos del número de hembras que ovipositaron de cada grupo tratado y su testigo empleando la fórmula (FAO, 2011):

$$\frac{\text{HEMBRAS QUE OVIPOSITARON} * 100}{\text{HEMBRAS TOTALES}} = \%Op$$

- *Porcentaje de inhibición de la oviposición (%InhOp)*: Para calcular este parámetro primero se calculó el índice de oviposición (IO) tomando el peso de los huevos y las hembras, utilizando la Fórmula 1 y posteriormente se calculó el porcentaje de inhibición de la oviposición tomando los datos de IO del grupo tratado y el IO del grupo testigo, con la Fórmula 2 (FAO, 2011).

FÓRMULA 1:

$$\frac{\text{PESO DE LOS HUEVOS (g)}}{\text{PESO DE LAS HEMBRAS (g)}} = IO$$

FÓRMULA 2:

$$\frac{\text{IO GRUPO TESTIGO} - \text{IO GRUPO TRATADO}}{\text{IO GRUPO TESTIGO}} * 100 = \%InhOp$$

- *Porcentaje de eclosión (%Ec)*: Se calculó tomando los datos del número de cascarones y huevos no eclosionados colocados en el campo de 100 mm<sup>2</sup> empleando la fórmula (FAO, 2011):

$$\frac{\text{NO. DE CASCARONES} * 100}{\text{NO. DE CASCARONES} + \text{NO. HUEVOS}} = \% \text{ Ec}$$

- *Reducción total de larvas producidas*: Es la reducción final del número de larvas producidas por las garrapatas tratadas en los diferentes estadios. Se calculó sumando el porcentaje de reducción de hembras que alcanzaron la repleción, el porcentaje de reducción de hembras que ovipositaron, el porcentaje de inhibición de la oviposición y la reducción del porcentaje de eclosión. Finalmente, se promedió la reducción total de larvas producidas por las garrapatas tratadas en los diferentes estadios (larvas, ninfas y adultas).

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los datos fueron analizados con el programa estadístico Graph Pad Prism ®. La comparación del parámetro de conteo de hembras repletas, se realizó por prueba t-student para muestras no pareadas, el porcentaje de inhibición de la oviposición se realizó por prueba de análisis de varianza de una vía (ANOVA), y en el caso de los parámetros de porcentaje de oviposición y porcentaje de eclosión, se realizó el análisis Xi-cuadrada. Para todos los análisis se utilizó un nivel de confianza del 95%.

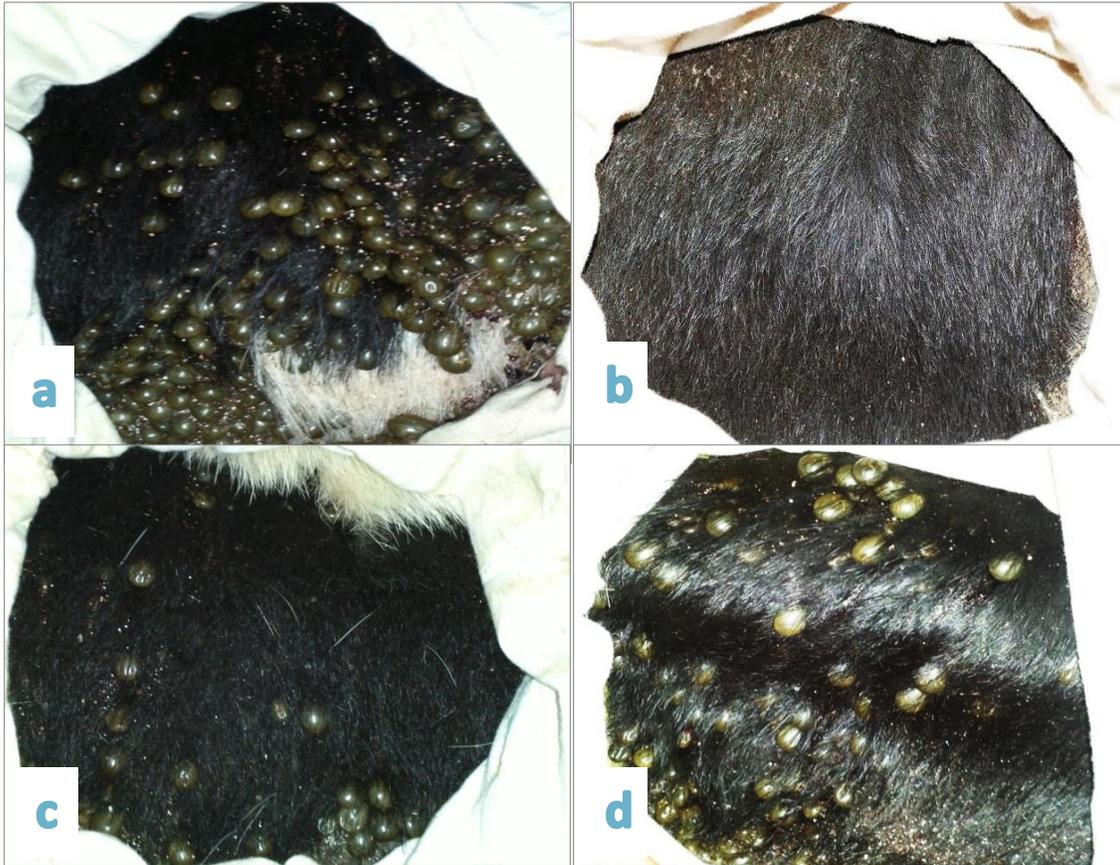
# RESULTADOS

## Conteo total de hembras repletas en cámaras

En la Gráfica 1 y Cuadro 3 se muestran los resultados del total de hembras repletas de *R. microplus* recolectadas de las cámaras tratadas con los productos LQM 996 y LQM 919. Los resultados de este conteo mostraron una menor cantidad de hembras ( $p < 0.05$ ) que se repletaron en las cámaras tratadas indistintamente con los productos, en comparación con las garrapatas del grupo testigo. En las cámaras tratadas en fase de larvas indistintamente con los productos hubo una disminución ( $p < 0.01$ ) de la cantidad de hembras repletas con respecto a su control. También se apreció una disminución de hembras repletas, en las cámaras tratadas en fase de ninfas ( $p < 0.01$ ) y en las cámaras tratadas en fase de adultas ( $p < 0.05$ ) con respecto a su control. En la Figura 7 se pueden observar los efectos antes mencionados.

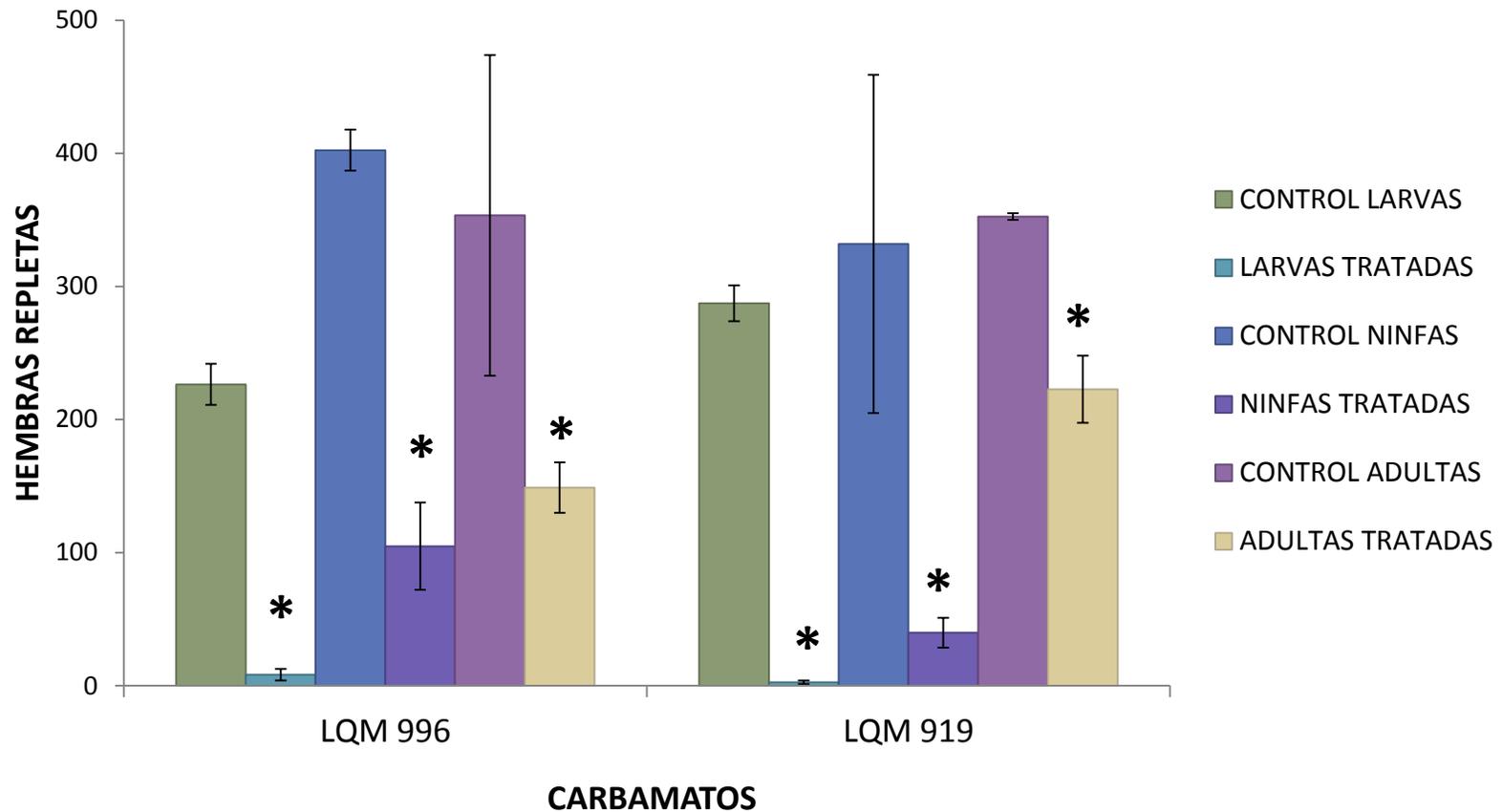
ESTADIO	LQM 919		LQM 996	
	TESTIGO	TRATAMIENTO	TESTIGO	TRATAMIENTO
LARVAS	287.50±13.50	2.62±1.32*	226.50±15.50	8.37±4.31*
NINFAS	332.0±127.0	39.88±11.15*	402.50±15.50	104.90±32.81*
ADULTAS	352.50±2.50	222.80±25.23*	353.50±120.50	148.90±18.92*

**Cuadro 3: Media ± EE del total de garrapatas que alcanzaron la repleción en cámaras, agrupadas de acuerdo al estadio en el que recibieron el tratamiento con los carbamatos y su respectivo testigo. \* Indica diferencia ( $p < 0.05$ ) con respecto a su grupo testigo.**



**Figura 7: Hembras repletas en cámaras, tratadas con la solución control o con el carbamato LQM 996 o LQM 919. a Cámara testigo, b Cámara tratada en estadio de larvas, c Cámara tratada en estadio de ninfas, d Cámara tratada en estadio de adultas.**

## TOTAL DE GARRAPATAS QUE ALCANZARON LA REPLECIÓN



**GRÁFICA 1:** Total de hembras repletas recolectadas en cámaras, agrupadas de acuerdo al estadio en el que recibieron el tratamiento *in vivo* con los carbamatos y su respectivo testigo. Cada barra representa la media  $\pm$  EE de un ensayo y su repetición.

\*Diferencia significativa contra su respectivo grupo testigo ( $p < 0.05$ ).

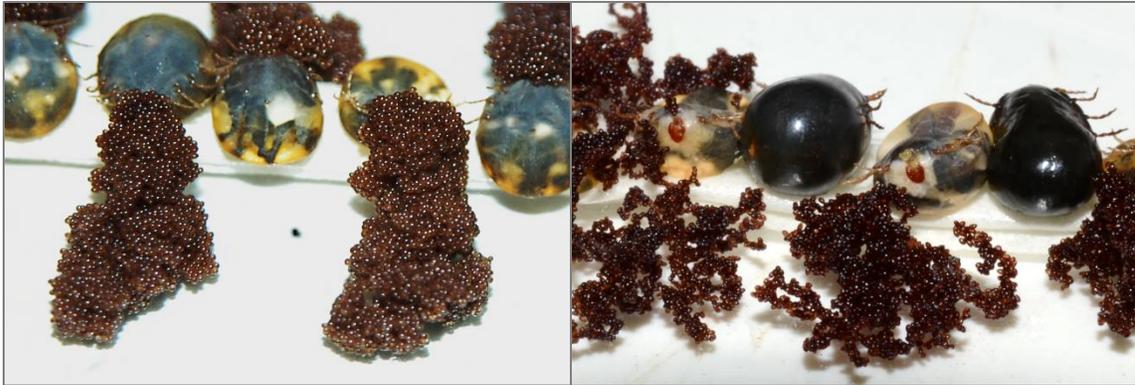
## Porcentaje de oviposición

En la Gráfica 2 y Cuadro 4 se compara el porcentaje de oviposición (hembras que ovipositaron) de las garrapatas que fueron tratadas *in vivo* con los productos LQM 996 y LQM 919 y que alcanzaron la repleción (estadios de ninfas y adultas). El bajo número de hembras repletas obtenidas de las garrapatas tratadas en estadio de larvas, no permitió la evaluación de este parámetro.

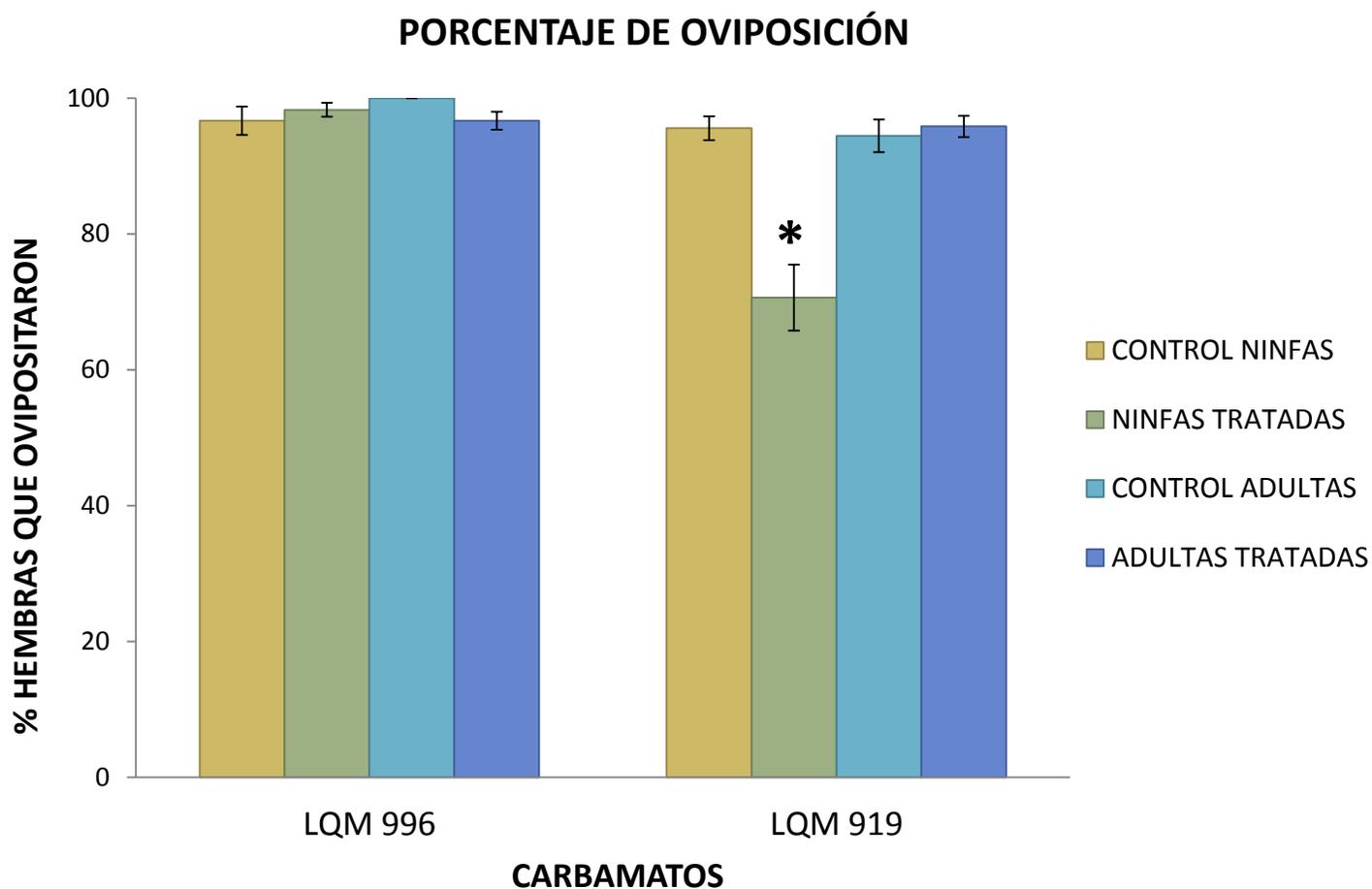
Únicamente se observó una diferencia significativa ( $p < 0.01$ ) con respecto al control en el estadio de ninfas con el tratamiento con LQM 919; sin embargo, los huevos de las garrapatas tratadas con los carbamatos *in vivo* tanto de las fases ninfas, como de las fases adultas mostraron una apariencia opaca, reseca y más oscura, además de ser poco adherentes, en comparación de los huevos ovipositados por garrapatas de grupos testigos (Figura 8).

ESTADIO	LQM 919		LQM 996	
	TESTIGO	TRATAMIENTO	TESTIGO	TRATAMIENTO
NINFAS	100±1.76	75±4.87*	100±2.11	100±1.24
ADULTAS	100±2.52	100±1.58	100±0.00	100±1.30

**Cuadro 4: Media ± EE del parámetro de porcentaje de oviposición. Los datos se encuentran agrupados de acuerdo al estadio en el que las garrapatas recibieron el tratamiento *in vivo* con los carbamatos y su respectivo testigo. \* Indica diferencia ( $p < 0.05$ ) con respecto a su grupo testigo.**



**Figura 8: Huevos ovipositados por las hembras que recibieron el tratamiento *in vivo*. a Huevos ovipositados por hembras control, b Huevos ovipositados por hembras tratadas con los carbamatos LQM 919 y LQM 996**



**GRÁFICA 2:** Porcentajes de oviposición producidos por las hembras que lograron la repleción, agrupadas de acuerdo al estadio en el que recibieron el tratamiento *in vivo* con los carbamatos y su respectivo testigo. Cada barra representa la media  $\pm$  EE de un ensayo y su repetición.

\*Diferencia significativa contra su respectivo grupo testigo ( $p < 0.05$ ).

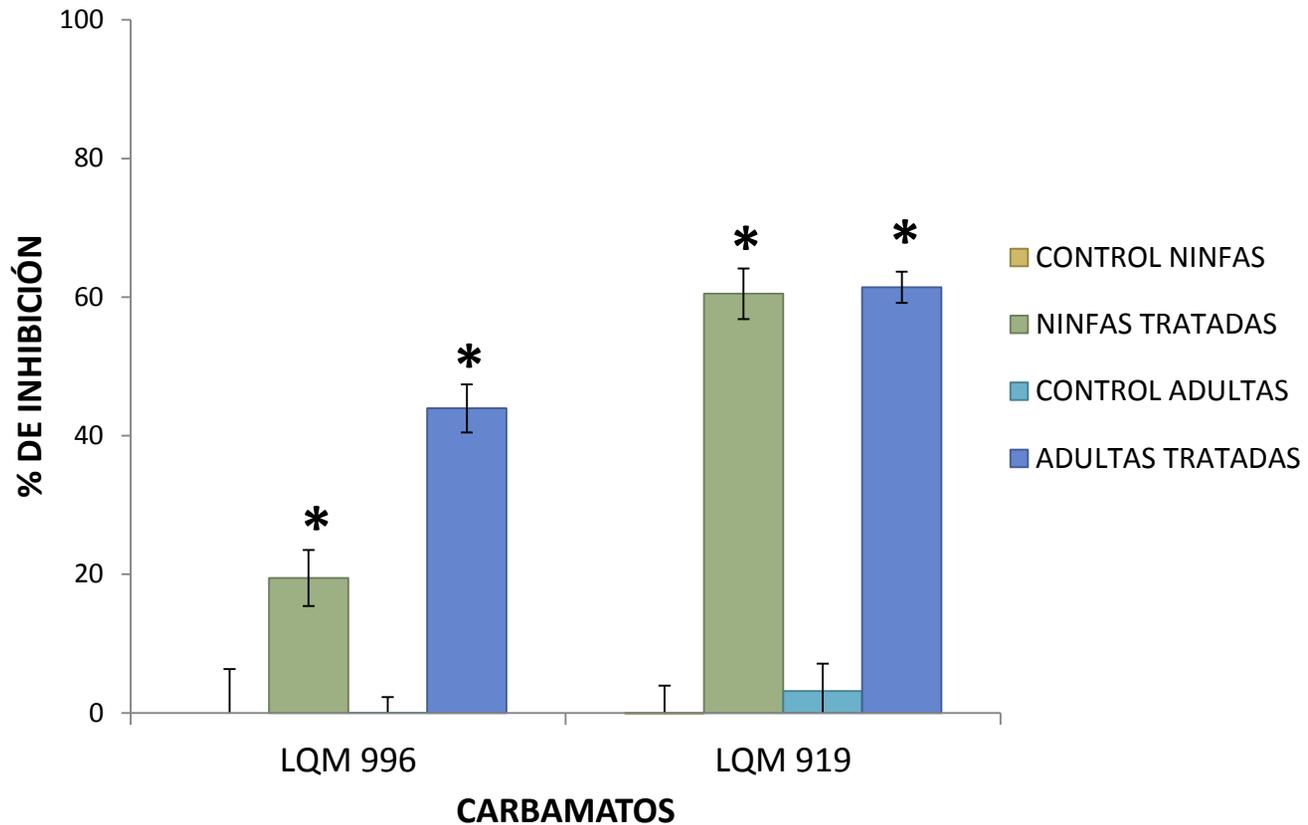
## Porcentaje de inhibición de la oviposición

En la Gráfica 3 y Cuadro 5 se muestran los resultados del porcentaje de inhibición de la oviposición; este parámetro refleja la relación existente entre el peso de las hembras repletas y el peso de la masa de huevos ovipositados por las mismas. Los resultados de este parámetro mostraron que hubo un aumento ( $p < 0.01$ ), del porcentaje de inhibición de la oviposición posterior al tratamiento con los productos LQM 996 y LQM 919 en los estadios de ninfas y adultas con respecto a su control. El bajo número de hembras repletas obtenidas de las garrapatas tratadas en estadio de larvas, no permitió la evaluación de este parámetro.

ESTADIO	LQM 919		LQM 996	
	TESTIGO	TRATAMIENTO	TESTIGO	TRATAMIENTO
NINFAS	-0.0013±3.93	60.48±3.64*	-1.73e-008±6.31	19.48±4.04*
ADULTAS	3.13±3.98	61.41±2.23*	7.74e-005±2.29	43.94±3.46*

**Cuadro 5: Media ± EE del porcentaje de inhibición de la oviposición. Los datos se encuentran agrupados de acuerdo al estadio en el que las garrapatas recibieron el tratamiento *in vivo* con los carbamatos y su respectivo testigo. \* Indica diferencia ( $p < 0.05$ ) con respecto a su grupo testigo.**

### PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE LA OVIPOSICIÓN



**GRÁFICA 3:** Porcentaje de inhibición de la oviposición de las garrapatas agrupadas de acuerdo al estadio en el que recibieron el tratamiento *in vivo* con los carbamatos y su respectivo testigo. Cada barra representa la media  $\pm$  EE de un ensayo y su repetición.

\*Diferencia significativa contra su respectivo grupo testigo ( $p < 0.05$ ).

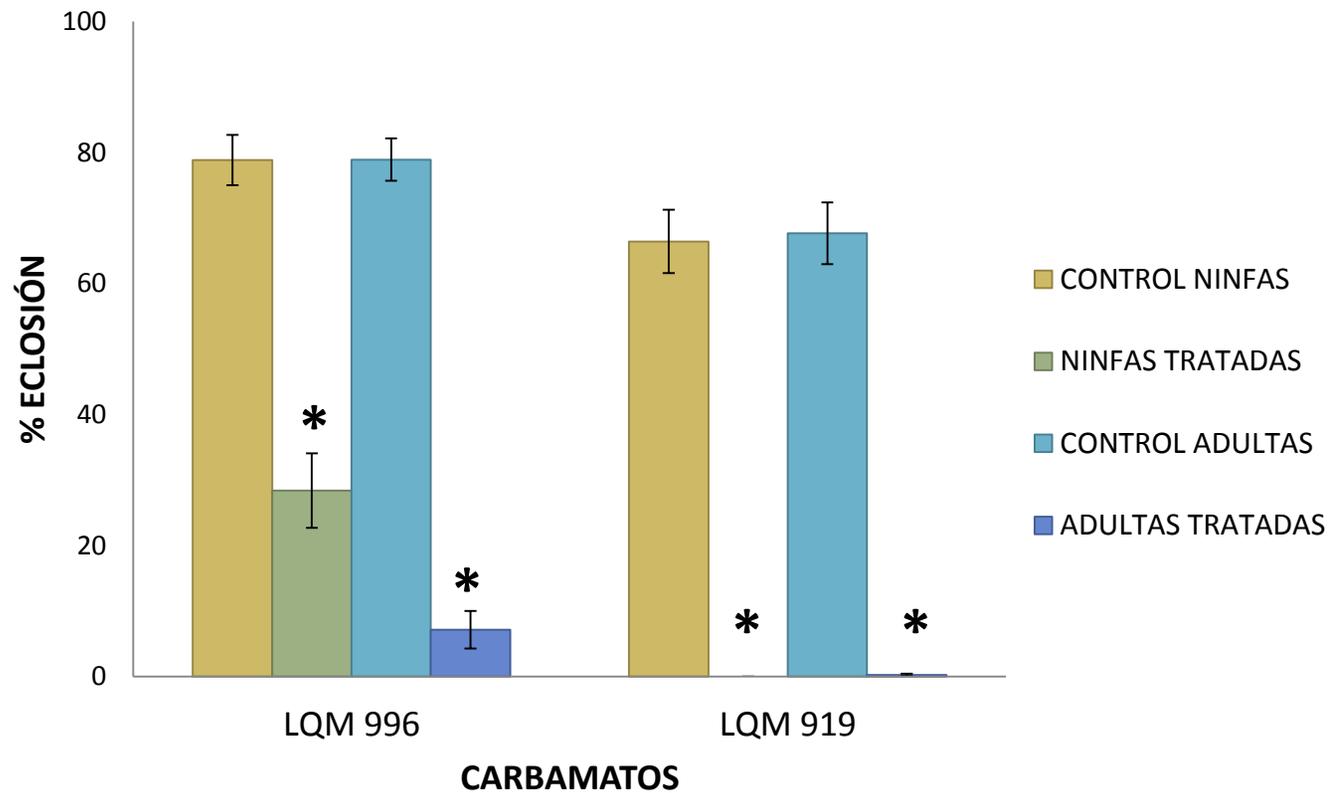
## Porcentaje de eclosión

Los porcentajes de eclosión de los huevos ovipositados por hembras que alcanzaron la repleción y fueron tratadas *in vivo* en los estadios de ninfas y adultas con LQM 996 y LQM 919 se presentan en la Gráfica 4 y Cuadro 6. Se observó que el porcentaje de eclosión disminuyó ( $p < 0.01$ ), en presencia del tratamiento en el caso de ambos productos y en ambos estadios en comparación con su control. El bajo número de hembras repletas obtenidas de las garrapatas tratadas en estadio de larvas, no permitió la evaluación de este parámetro.

ESTADIO	LQM 919		LQM 996	
	TESTIGO	TRATAMIENTO	TESTIGO	TRATAMIENTO
NINFAS	66.43±4.83	0.00±0.00*	78.87±3.83	28.39±5.67*
ADULTAS	67.68±4.70	0.27±0.17*	78.94±3.23	7.16±2.86*

**Cuadro 6: Media  $\pm$  EE del porcentaje de eclosión de larvas de los huevos producidos por las garrapatas tratadas. Los datos se encuentran agrupados de acuerdo al estadio en el que las garrapatas recibieron el tratamiento *in vivo* con los carbamatos y su respectivo testigo. \* Indica diferencia ( $p < 0.05$ ) con respecto a su grupo testigo.**

## PORCENTAJE DE ECLOSIÓN DE LARVAS



**GRÁFICA 4:** Porcentajes de eclosión de los huevos ovipositados por las garrapatas tratadas, agrupadas de acuerdo al estadio en el que recibieron el tratamiento *in vivo*, y su respectivo testigo. Cada barra representa la media  $\pm$  EE de un ensayo y su repetición.

\*Diferencia significativa contra su respectivo grupo testigo ( $p < 0.05$ ).

### **Reducción total de larvas producidas**

La eficacia de cada uno de los productos se presenta en el Cuadro 7. En las garrapatas tratadas en el estadio de larvas se puede apreciar que con el carbamato LQM 919 se redujo la cantidad de larvas producidas un 99.97% y con el carbamato LQM 996 un 98.30%.

PARÁMETROS MEDIDOS	LQM 919			LQM 996		
	LARVAS	NINFAS	ADULTAS	LARVAS	NINFAS	ADULTAS
Reducción de hembras repletas	99.09	87.99	36.80	96.31	73.94	57.88
Disminución de oviposición	100.00	75.00	0.00	100.00	0.00	0.00
Inhibición de la oviposición	100.00	60.48	75.62	100.00	19.48	43.94
Reducción en la eclosión de larvas	100.00	100.00	99.73	100.00	71.61	92.84
Reducción total de larvas disponibles para la siguiente generación	100.00	100.00	99.93	100.00	5.96	98.30
<b>TOTAL CARBAMATO</b>	<b>99.97%</b>			<b>98.30%</b>		

Cuadro 7: Eficacia obtenida en cada parámetro y reducción total de larvas producidas por cada uno de los carbamatos evaluados. Datos expresados en porcentaje.

---

## DISCUSIÓN

---

La ixodidosis es un problema mundial que afecta severamente al ganado bovino en zonas tropicales y subtropicales. El manejo que se le ha dado al control de esta parasitosis ha sido poco adecuado y ha ocasionado la aparición de garrapatas resistentes a la mayoría de las familias de químicos empleados para combatirlos. Los carbamatos de nueva síntesis evaluados en este trabajo demostraron ser eficaces sobre una cepa de garrapatas triple resistente a ixodicidas usados en México (amidinas, piretroides y organofosforados.)

El uso indiscriminado de ixodicidas en México ha estimulado la aparición de cepas de *R. microplus* resistentes a algunos Ixodicidas usados. En 2001 se aisló en la región de los Ríos en Tabasco, la cepa “San Alfonso”, que presentó multirresistencia a organofosforados, piretroides y amidinas (Fragoso y Soberanes, 2001). Previo a este trabajo se realizaron en nuestro laboratorio pruebas para corroborar la resistencia de la cepa “San Alfonso” usada en esta proyecto y se encontró que no solo es resistente a organofosforados, piretroides y amidinas, sino también al propoxur (datos no publicados). En el presente estudio, la eficacia calculada (reducción de larvas disponibles para la siguiente generación) fue para el carbamato LQM 919 del 99.97% y para LQM 996 del 98.30%. Lo anterior muestra que los carbamatos evaluados son altamente eficaces sobre las garrapatas *R. microplus* resistentes a ixodicidas comerciales.

Una característica de un buen ixodicida es que sea efectivo a bajas concentraciones. En este contexto, se ha demostrado *in vitro* por la técnica de inmersión de hembras adultas que organofosforados (Coumafos 0.2 mg/mL, clorpirifos 0.3 mg/mL, clorfenvinfos 0.3 mg/mL, etion 0.56 mg/mL), piretroides (flumetrina 0.04 mg/mL y deltametrina 0.02 mg/mL) y amidinas

(amitraz 0.15-0.5 mg/mL) a bajas dosis son efectivas sobre cepas de *R. microplus* susceptibles a ixodicidas (Foil *et al.*, 2004). Por otro lado, los laboratorios farmacéuticos recomiendan usar estos productos sobre bovinos a concentraciones similares (Asuntol®, coumafos 0.2 mg/mL; Bayticol® Dip 3%, Flumetrina 0.03 mg/mL; Bovitraz 12.5%®, amitraz 0.25 mg/mL). En el presente estudio, las concentraciones empleadas de los carbamatos LQM919 (0.703 mg/mL) y LQM996 (0.589 mg/mL) son ligeramente mayores a las recomendadas para el uso *in vivo* de otros ixodicidas. Si bien, con estos datos no se puede afirmar que los carbamatos evaluados son mejores o peores que otros ixodicidas, si se puede concluir que la concentración efectiva de ambos carbamatos se encuentra dentro del rango recomendado para los ixodicidas comerciales, con la gran ventaja de ser efectivos sobre cepas multiresistentes.

Se ha demostrado que algunos carbamatos como el propoxur o el carbaryl actúan inhibiendo la AChE en el sistema nervioso de los artrópodos, lo que les provoca parálisis y muerte (Sogorb y Vilanova, 2002; Tan *et al.*, 2011). En un estudio previo realizado por Prado-Ochoa *et al.*, (2014b) demostraron que los carbamatos LQM919 y LQM996 son inhibidores débiles de la AChE y que su principal mecanismo de acción es inhibiendo la vitelogenesis y la viabilidad de las células ováricas, lo que produce una disminución en la producción de huevos, cambios en su morfología e inhibe la eclosión. En el presente estudio las hembras que lograron repletarse produjeron huevos con alteraciones morfológicas similares y de los cuales no eclosionaron larvas. Por lo anterior, podemos concluir que cuando se tratan las fases de ninfas y adultos con los carbamatos LQM919 y LQM996 sobre los bovinos, se inhibe la vitelogenesis.

Prado-Ochoa *et al.*, 2013 y Pérez-González *et al.*, 2013 demostraron por la técnica de paquete de larvas que los carbamatos LQM919 y LQM996

no tienen efecto sobre la mortalidad de larvas de cepas *R. microplus* susceptibles o resistentes a ixodicidas comerciales usados en México. Además, Prado-Ochoa *et al.*, (2014b) demostró *in vitro* que estos carbamatos son inhibidores débiles de la AChE. Sin embargo, en este trabajo se observó que cuando estos carbamatos se aplicaron por aspersión *in vivo* sobre las larvas de *R. microplus* se inhibió su desarrollo y murieron. Un efecto similar ocurrió con aproximadamente el 80% de las ninfas que se asperjaron con los carbamatos evaluados y el 50% de las adultas asperjadas. Por lo anterior, los carbamatos evaluados deben tener un mecanismo de acción adicional al ya reportado, puesto que cuando las garrapatas se encuentran alimentándose sobre los bovinos, estos carbamatos inducen la muerte.

Se ha demostrado que en mamíferos, los carbamatos LQM919 y LQM996 alteran el ciclo celular de células en rápida reproducción (Prado-Ochoa, 2013) y el desarrollo de ovocitos en hembras de garrapatas repletas (Prado-Ochoa *et al.*, 2014b). En ambos casos, afectan a células con alta actividad metabólica. En los estadios de garrapatas que se encuentran alimentándose, las células con mayor actividad son las del tracto digestivo (glándulas salivales e intestino), por lo que probablemente estas sean las células blanco de los carbamatos en garrapatas que están en alimentación. Sin embargo, se requieren estudios posteriores para determinar cuál es mecanismo de acción de estos carbamatos en los estadios que están parasitando.

La técnica de cámaras desarrollada en este proyecto está basada en la metodología propuesta en la norma oficial mexicana NOM-006-ZOO-1995 (SAGARPA 2014). La prueba proporciona información útil acerca de la efectividad que alcanzan productos ixodicidas cuando son aplicados en bovinos o sobre las áreas en las cuales se encuentran presentes las garrapatas. La técnica menciona que se deben realizar 10 infestaciones

cada tercer día para cumplir un periodo de 27 días entre la primera y la última infestación con aproximadamente entre 500-650 larvas por cámara, con la finalidad de tener garrapatas de diferentes estadios en la misma cámara para cuando se realice el tratamiento. Después de realizar varias veces el intento, nosotros encontramos que no es posible poner tantas garrapatas en el área indicada (20 cm de diámetro= 314.16 cm<sup>2</sup>), además al tener diferentes estadios en la misma cámara, no es posible diferenciar el efecto sobre cada una de las diferentes fases. Por lo anterior, nosotros modificamos y estandarizamos la técnica. Dichas modificaciones consistieron en: cada cámara se infestó con 1000 larvas de *R. microplus* para evitar la saturación de garrapatas en el área delimitada para la infestación y que esto evitara su desarrollo por competencia, por otro lado, las cuatro cámaras de cada bovino se trataron al mismo tiempo para que claramente se observaran los efectos de los carbamatos evaluados sobre las fases tratadas. Nuestras observaciones muestran claramente que no es posible realizar las pruebas como se encuentran en la norma oficial mexicana NOM-006-ZOO-1995, por lo que sugerimos se realicen las adecuaciones pertinentes.

Considerando las observaciones realizadas con anterioridad por nuestro grupo de trabajo (Prado Ochoa, 2013; Pérez-González *et al.*, 2013, Prado-Ochoa *et al.*, 2013; Prado-Ochoa, 2014; Prado-Ochoa *et al.*, 2014a; Prado-Ochoa *et al.*, 2014b; Prado-Ochoa *et al.*, 2014c), los resultados obtenidos en este estudio superaron nuestras expectativas, puesto que no esperábamos que los productos ocasionaran la muerte en alguna fase del ciclo de las garrapatas. Nuestros resultados muestran que los efectos de producidos por los carbamatos aplicados *in vivo*, suman la muerte producida a un alto número de garrapatas, con la inhibición de la oviposición y la disminución de la eclosión de larvas en las garrapatas restantes. Pese a lo anterior, antes de ser utilizados estos carbamatos para el control de

garrapatas, es necesario realizar pruebas de establo con todas las fases parásitas presentes de forma simultánea, y de campo; además de continuar con los estudios para esclarecer el mecanismo de acción, estabilidad química, formulación e impacto ambiental. Sin embargo, existe una gran posibilidad de que estos compuestos sean en un mediano plazo una nueva opción en el control de garrapatas.

---

## CONCLUSIONES

---

- ❖ Los productos LQM 919 y LQM 996 inhiben el desarrollo de las garrapatas tratadas, casi en su totalidad en fase de larvas, mientras que la cantidad de garrapatas tratadas en fase de ninfas y adultas que alcanzan la repleción se ve disminuida.
- ❖ Los huevos ovipositados por las garrapatas tratadas mostraron serias alteraciones morfológicas, por lo que hubo una elevada inhibición de la oviposición, así como una disminución de la eclosión de larvas.
- ❖ La eficacia del producto LQM 919 es de 99.9%, mientras que el producto LQM 996 mostró una eficacia del 98.3%.
- ❖ Los efectos observados *in vivo* concordaron y superaron los efectos observados *in vitro*.

---

## REFERENCIAS

---

1. Alcántara ACA, Morales, MGA. Evaluación del daño al DNA, producido por un grupo de derivados del ácido carbámico con acción antiparasitaria, mediante el ensayo cometa (tesis de licenciatura). México (México): UNAM, 2005.
2. Alonso-Díaz MA, Rodríguez-Vivas RI, Fragoso-Sánchez H, Rosario-Cruz R. Resistencia de la garrapata *Boophilus microplus* a los ixodicidas. Arch Med Vet 2006;38:105-113.
3. Anderson JF, Magnarelli LA. Biology of ticks. Infect Dis Clin N Am 2008;22:195-215.
4. Angeles E, Martínez P, Keller J, Martínez R, Rubio M, Ramírez G, Castillo R, López-Castañares R, Jiménez E.. Ethyl and methylphenylcarbamates as antihelmintic agents: theoretical study for predicting their biological activity by PM3. J Mol Struct: THEOCHEM 2000;504:141-170.
5. Baffi MA, Pereira CD, Souza GR, Ceron CR, Bonetti AM. Esterase profile in the postembryonic development of *Rhipicephalus microplus*. Pes Agrop Bras 2007;42:1183-1188.
6. Barker SC, Murrell A. Phylogeny, evolution and historical zoogeography of ticks: a review of recent progress. Exp Appl Acarol 2002;28:55-68.
7. Barré N, Li A, Miller R, Gäia H, Delathière JM, Davey R, George J. In vitro and in vivo evaluation of deltamethrin and amitraz mixtures for the control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) in New Caledonia. Vet Parasitol 2008;155:110-119.
8. Bernabe-Pérez, AG. Evaluación antiparasitaria de nueve principios de síntesis derivados del ácido carbámico utilizando como modelo el cestodo *Hymenolepis nana var. fraterna* en ratones de la cepa CD1 con infestación inducida (tesis de licenciatura). México (México): UNAM, 2007.

9. Bernal S. Evaluación de algunos productos derivados del ácido carbámico como agentes antimicrobianos (tesis de licenciatura). México (México): UNAM, 2000.
10. Botana L. Farmacología y terapéutica veterinaria. España: McGraw-Hill. 2002.
11. Cardozo N. Producción animal/ Bovinos de carne/ Sanidad animal/ Resistencia de la garrapata (*B. microplus*) a los acaricidas 2007. (Sitio argentino de producción animal) Recuperado en Junio de 2014 de <http://www.produccion-animal.com.ar/>
12. Carvalho KP, Gadelha APR. Effects of three benzimidazoles on growth, general morphology and ultrastructure of *Tritrichomonas foetus*. FEMS Microbiol Let 2007;275:292-300.
13. Chávez B, Cedillo-Rivera R, Martínez-Palomo A. *Giardia lamblia*: ultrastructural study of the in vitro effect of benzimidazoles. J Eukaryotic Microbiol 1992;39:510-515.
14. Córdoba D. Toxicología (5a ed.). Bogotá, Colombia: Ed. Manual Moderno. 2006.
15. Davey BR, George JE, Miller RJ. Control of an organophosphate-resistant strain of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) infested on cattle after a series of dips in coumaphos applied at different treatment intervals. J Med Entomol 2004;41:524-528.
16. Davey BR, George JE, Miller RJ. Efficacy of various concentrations of coumaphos to control adult, nymphal, and larval stages of an organophosphate-resistant strain of *Boophilus microplus* on infested cattle. Am J Vet Res 2003;64:684–689.
17. Davey BR, George JE. Efficacy of macrocyclic lactone endectocides against *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) infested cattle using different Pour-On application treatment regimes. J Med Entomol 2002;39:763-769.
18. Davey BR, George JE. Therapeutic and persistent efficacy of a single application of doramectin applied either as a pour-on or injection to cattle

- infested with *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). J Med Entomol 2004;41:402-407.
19. De Castro JJ. Sustainable tick and tick-borne disease control in livestock improvement in developing countries. Vet Parasitol 1997;71:77-97.
  20. Encinas A, Oleaga A, Pérez R. Garrapatas duras. En: Cordero C.M. Parasitología Veterinaria. Madrid: Mc Graw-Hill Interamericana, 1999:420-429.
  21. FAO 2011. Module 1 Ticks: Acaricide resistance: diagnosis, management and prevention. Recuperado en Junio de 2011 de <http://ftp.fao.org/ago014e05.pdf>
  22. Foil LD, Coleman P, Eisler M, Fragoso-Sanchez H, Garcia-Vazquez Z, Guerrero FD, Jonsson NN, Langstaff IG, Li AY, Machila N, Miller RJ, Morton J, Pruett JH, Torr S. Factors that influence the prevalence of acaricide resistance and tick-borne diseases. Vet Parasitol 2004;125:163-181.
  23. Fragoso SH, Soberanes CN. Control de la resistencia a los ixodídeos a la luz de los conocimientos actuales. Memorias del XXV Congreso Nacional de Buiatría; 2001; Veracruz (Veracruz) México. Asociación Mexicana de Médicos especialistas en Bovinos, AC 2001:40-48.
  24. George J, Pound JM, Davey RB. Chemical control of ticks on cattle and the resistance of these parasites to acaricides. Parasitol 2004;129:S353-S366.
  25. George J. Present and future technologies for tick control. Annals New York Academy of Sciences 2000;916:583-588.
  26. Gupta RC. Toxicology of organophosphate & carbamate compounds. USA: Elsevier, 2006.
  27. Hanser E, Mehlhorn H, Hoeben D, Vlamincck K. In vitro studies on the effects of flubendazole against *Toxocara canis* and *Ascaris suum*. Parasitol Res 2002;89:63-74.
  28. He H, Chen AC, Davey RB, Ivie GW, George JE. Identification of a point mutation in the para-type sodium channel gene from a pyrethroidresistant cattle tick. Biochem Biophys Res Commun 1999;261:558-561.

29. Jamroz RC, Guerrero FD, Pruett JH, Oehler D, Miller RJ. Molecular and biochemical survey of acaricide resistance mechanisms in larvae from Mexican strains of the southern cattle tick, *Boophilus microplus*. J Insect Physiol 2000;46:685-695.
30. Jiménez-Cardoso E, Flores-Luna A, Pérez-Urizar J. In vitro activity of two phenyl-carbamate derivatives, singly and in combination with albendazole against albendazole-resistant *Giardia intestinalis*. Acta Tropica 2004;92:237-244.
31. Jonsson NN, Mayer DG, Matschoss AL, Green PE, Ansell J. Production effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation of high yielding dairy cows. Vet Parasitol 1998;78:65-77.
32. Jonsson NN, Mayer DG, Matschoss AL, Pepper P, Green PE, Ansell J. Resistance of Holstein –Fresian cows to infestation by the cattle tick (*Boophilus microplus*). Vet Parasitol 2000;89:297-305.
33. Jonsson NN. The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses (Review). Vet Parasitol 2006;137:1-10
34. Kang YB, Jang DH. Scanning electron microscopic observations on the surface structure of the tick *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) female specimens. Korean J Parasitol 1985;23:313-323.
35. Katiyar S, Gordon V, McLaughlin G, Edlind T. Antiprotozoal activities of benzimidazoles and correlations with beta-tubulin sequence. Antimicrobial and chem 1994;38: 2086-2090.
36. Miller RJ, Almazan C, Ortiz-Estrada M, Davey RB, George JE, De Leon AP. First report of fipronil resistance in *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* of Mexico. Vet Parasitol 2013;191:97-101.
37. Muñoz-Cuevas C. Síntesis de derivados del ácido carbámico de la serie LQM-900, los cuales han mostrado actividad ixodocida (tesis de licenciatura). México (México): UNAM 2012.
38. NOM-019-ZOO-1994, Campaña Nacional contra la *Garrapata Boophilus* spp. Recuperado en Agosto de 2014 de [www.normateca.sagarpa.gob.mx](http://www.normateca.sagarpa.gob.mx)

39. Odilón A. Síntesis de carbamatos a partir de aminas aromáticas (tesis de licenciatura). México (México): UNAM, 1993.
40. Ordaz-Pichardo C, Shibayama M, Villa-Treviño S, Arriaga-Alba M, Angeles E, de la Garza M. Antiamoebic and toxicity studies of a carbamic acid derivative and its therapeutic effect in a hamster model of hepatic amoebiasis. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2005;49:1160-1168.
41. Pérez-Cogollo LC, Rodríguez-Vivas RI, Ramirez-Cruz GT, Miller RJ. First report of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* resistant to ivermectin in Mexico. *Vet Parasitol* 2010;168:165-169.
42. Pérez-González IE, Prado-Ochoa MG, Muñoz-Guzmán MA, Vázquez-Valadez VH, Velázquez-Sánchez AM, Avila-Suárez BL, Cuenca-Verde C, Angeles E, Alba-Hurtado F. Effect of new ethyl and methyl carbamates on *Rhipicephalus microplus* larvae and adult ticks resistant to conventional ixodicides. *Vet Parasitol* 2013;199:235-241.
43. Prado-Ochoa MG, Gutiérrez-Amézquita RA, Abrego-Reyes VH, Velázquez-Sánchez AM, Muñoz-Guzmán MA, Ramírez-Noguera P, Angeles E, Alba-Hurtado F. Assessment of Acute Oral and Dermal Toxicity of 2 Ethyl-Carbamates with Activity against *Rhipicephalus microplus* in Rats. *BioMed Res Int* 2014;2014a:1-10.
44. Prado-Ochoa MG, Muñoz-Guzmán MA, Abrego-Reyes VH, Velázquez-Sánchez AM, Lara-Rocha M, Cuenca-Verde C, Angeles E, Alba-Hurtado F. Effect of new ethyl and methyl carbamates on biological parameters and reproduction of the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. *Vet Parasitol* 2013;194:49-57.
45. Prado-Ochoa MG, Ramírez-Noguera P, Díaz-Torres R, Garrido-Fariña RI, Vázquez-Valadez VH, Velázquez-Sánchez AM, Muñoz-Guzmán MA, Angeles E, Alba-Hurtado F. The action of two ethyl carbamates on acetylcholinesterase and reproductive organs of *Rhipicephalus microplus*. *Vet Parasitol* 2014b;199:215–224.
46. Prado-Ochoa MG, Vázquez-Valadez VH, Velázquez-Sánchez AM, Muñoz-Guzmán MA, Ramírez-Noguera P, Angeles E, Alba-Hurtado F. Subchronic

- Toxicity Study in Rats of Two New Ethyl-Carbamates with Ixodical Activity. *BioMed Res Int* 2014c:1-12.
47. Prado-Ochoa MG. Mecanismo de acción y toxicidad de nuevos carbamatos con efecto sobre garrapatas *Rhipicephalus microplus* (*Boophilus microplus*) (tesis doctoral). México (México): UNAM 2013.
  48. Quiroz H. Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos. México: Limusa, 1984.
  49. Reyes-González R. Evaluación de la actividad antibiótica del compuesto LQM 996 en *Meriones unguiculatus* infectado con *Helicobacter pylori* (tesis de licenciatura). México (México): UNAM, 2007.
  50. Rodríguez-Vivas RI, Rodríguez-Arevalo F, Alonso-Díaz MA, Fragoso-Sánchez H, Santamaría V.M., Rosario-Cruz R. Prevalence and potential risk factors for amitraz resistance in *Boophilus microplus* ticks in cattle farms in the state of Yucatan, Mexico. *Prev Vet Med* 2006;75:280-286.
  51. SAGARPA 2014. Recuperado en junio de 2014, de [www.conasa.org.mx/conasaplanestrategarrap.pdf](http://www.conasa.org.mx/conasaplanestrategarrap.pdf)
  52. Samish M, Rehacek J. Pathogens and predators of ticks and their potential in biological control. *Annu Rev Entomol* 1999;44:159-82.
  53. Soberanes-Céspedes N, Santamaría-Vargas M, Sánchez-Fragoso H, García-Vázquez Z. Primer caso de resistencia al amitraz en la garrapata del ganado *Boophilus microplus* en México. *Técnica Pecuaria México* 2002;40:81-92.
  54. Sogorb MA, Vilanova E. Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. *Toxicol Lett* 2002;128:215-228.
  55. Soulsby E. Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos. México: Interamericana, 1988.
  56. Tan F, Wang L, Wang J, Wu X, Zhu H, Jiang L, Tao S, Zhao K, Yang Y, Tang X. Enhanced pesticide sensitivity of novel housefly acetylcholinesterases: a new tool for the detection of residual pesticide contamination. *Bioprocess Biosyst Eng* 2011;34:305-314.

57. Temeyer KB, Pruett JH, Untalan PM, Chen AC. Baculovirus expression of BmAChE3, a cDNA encoding an acetylcholinesterase of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). J Med Entomol 2006;43:707-712.
58. Uilenberg G. International collaborative research: significance of tick-borne hemoparasitic diseases to world animal health. Vet Parasitol 1995;57:19-41.