



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

Uso de la técnica de inmersión de larvas para evaluar concentraciones letales de tres etil-carbamatos en una cepa de *Rhipicephalus microplus* resistente a acaricidas convencionales

TESIS

Que para obtener el título de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA:

Andrei Hernández Eguía

Asesor: Dr. Fernando Alba Hurtado

Co-Asesor: Dr. Marco Antonio Muñoz Guzmán

Cuautitlán Izcalli, Estado de México

2018



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.

DEDICATORIAS

A mi madre: Mi ejemplo de amor y valores que me guían diariamente.

A mi padre: El pilar de apoyo y consejos que me motivan a mejorar como persona.

A mi hermano: Ejemplo de fortaleza y gran influencia de mi forma de ser y pensar.

“Un poco de ciencia aleja de Dios, pero mucha ciencia devuelve a Él”.

Louis Pasteur

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme vida y brindarme la oportunidad y la fuerza para llegar a esta etapa de mi vida.

A mi alma mater la UNAM y a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por permitir mi desarrollo académico.

Al proyecto PAPIIT IN222316 y PAPIIT IN218018 por el financiamiento para la realización de este trabajo.

A la Unidad de Investigación Multidisciplinaria y el Laboratorio de Inmunología y Biología Molecular de Parásitos.

A mi asesor Dr. Fernando Alba hurtado y Co-Aesor: Dr. Marco Antonio Muñoz Guzmán por sus aportaciones, tiempo y dedicación para la realización de este trabajo.

A la Dra. María Guadalupe Prado Ochoa le agradezco mucho todas sus contribuciones, consejos y asesoramiento.

A la M en C Sandra Lizeth Iturbe Requena por acompañarme de principio a fin en este trabajo. Por guiarme con todas sus enseñanzas, correcciones y amistad.

A los miembros de mí jurado por sus correcciones y aportaciones que fueron de gran importancia para este trabajo.

Al profesorado de la carrera por la orientación y los conocimientos brindados.

A mis padres y a mi hermano por estar presentes a largo de todo mi camino, y al resto de mi familia por su apoyo y cariño.

A la M en MVZ Karina Villa Sandoval y MVZ Mireya Álvarez Oliver por las facilidades que me brindaron para atender los asuntos de este trabajo mientras me desarrollaba profesionalmente en el Centro de Diagnóstico Veterinario Especializado (CEDIVETE).

A mis amigos y personas importantes en mi vida: Tania Chacón, Damaris Villagrán, Lorena Rodríguez, Cecilia Casales, Abigail Paniagua, Gabriela Cano, Sonia Salas, Noemi Archundia, Abril Ramírez, Giselle Castañeda, Simón Retana, Michael Diosdado, Rafael Tovar, Aldair Bravo, Mariano Rojas, David Izquierdo, y todos aquellos que no mencione pero que han estado conmigo.

ÍNDICE

ÍNDICE	4
ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS	6
ABREVIATURAS	8
RESUMEN	9
INTRODUCCIÓN.....	10
Generalidades de <i>Rhipicephalus microplus</i>	10
Situación epidemiológica de <i>R. microplus</i> en México.....	13
Patogenia de <i>R. microplus</i>	14
Control de <i>R. microplus</i>	15
Control no químico	15
Control químico.....	17
Aplicación de acaricidas.....	19
Fenómeno de resistencia.....	19
Bioensayos para diagnóstico de la resistencia.....	21
Carbamatos.....	22
JUSTIFICACIÓN.....	25
HIPÓTESIS	27
OBJETIVOS	28
Objetivos particulares	28
MATERIALES Y MÉTODOS	29
Ubicación	29
Material biológico.....	29
Carbamatos.....	29
Preparación de material biológico.....	30
Preparación de soluciones.....	31
Realización de la TIL	31

Análisis estadístico.....	33
RESULTADOS.....	35
Mortalidad de larvas.....	35
Concentraciones letales	35
DISCUSIÓN.....	45
CONCLUSIONES.....	50
REFERENCIAS	51

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro 1: Nombre químico, estructura y peso molecular de los etil-carbamatos LQM 919, LQM 938 y LQM 996.	30
Cuadro 2. Media (\pm EE) de los porcentajes de mortalidad corregidos (%MC) de larvas de <i>Rhipicephalus microplus</i> expuestas a diferentes concentraciones de los etil carbamatos LQM 919, LQM 996, LQM 938 y amitraz (testigo positivo).	37
Cuadro 3. Análisis Probit (Polo-Plus® Software) de la mortalidad en larvas de garrapata <i>R. microplus</i> cepa “San Alfonso” usando la técnica de inmersión de larvas con el etil-carbamato LQM 919.	39
Cuadro 4. Análisis Probit (Polo-Plus® Software) de la mortalidad en larvas de garrapata <i>R. microplus</i> cepa “San Alfonso” usando la técnica de inmersión de larvas con el etil-carbamato LQM 996.	40
Cuadro 5. Análisis Probit (Polo-Plus® Software) de la mortalidad en larvas de garrapata <i>R. microplus</i> cepa “San Alfonso” usando la técnica de inmersión de larvas con el etil-carbamato LQM 938.	41
Cuadro 6. Análisis Probit (Polo-Plus® Software) de la mortalidad en larvas de garrapata <i>R. microplus</i> cepa “San Alfonso” usando la técnica de inmersión de larvas con amitraz (testigo positivo).	42
Figura 1. Morfología de hembra repleta de <i>Rhipicephalus microplus</i> .	11
Figura 2. Ciclo biológico de <i>R. microplus</i> .	12
Figura 3. Clasificación del territorio nacional en relación a las áreas de distribución de la garrapata del género <i>Rhipicephalus</i> (SAGARPA, 2017).	14
Figura 4. Larvas de <i>R. microplus</i> preparadas para inmersión.	32
Figura 5. Paquetes de papel filtro con larvas de <i>R. microplus</i> para la	33

incubación.

Figura 6. Diseño experimental.	34
Figura 7. Media (\pm EE) de los porcentajes de mortalidad corregida (%MC) en larvas de garrapata <i>R. microplus</i> cepa "San Alfonso" obtenida usando la técnica de inmersión de larvas con los etil-carbamatos LQM 919, LQM 938 y LQM 996 y testigos de amitraz y agua destilada (mortalidad nula).	38
Figura 8. Media (\pm DS) de los porcentajes de mortalidad corregida (%MC) evaluando sólo el factor PRODUCTO.	43
Figura 9. Regresión lineal en escala logarítmica de la respuesta dosis-mortalidad en larvas tratadas con los etil-carbamatos LQM919, LQM938, LQM 996 y el amitraz.	44

ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados
%MC	Porcentaje de mortalidad corregida
AChE	Acetilcolinesterasa
ANOVA	Analysis of variance. Análisis de varianza
CL	Concentración letal
cm	Centímetros
EE	Error Estándar
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FESC	Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán
g	Gramos
GABA	Ácido-gammaaminobutírico
IC	Intervalo de confianza
LQM	Laboratorio de Química Medicinal
mg	Miligramos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
NOM	Norma Oficial Mexicana
<i>R. microplus</i>	<i>Rhipicephalus microplus</i>
SAGARPA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
sp	Sin especie
TIA	Técnica de Inmersión de Adultas
TIL	Técnica de inmersión de larvas
TPL	Técnica de Paquete de Larvas
UIM	Unidad de Investigación Multidisciplinaria
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México

RESUMEN

Rhipicephalus microplus es la garrapata más importante en México. El control químico es la manera más eficaz para combatir esta parasitosis, sin embargo, el uso indiscriminado de acaricidas ha favorecido la aparición de cepas resistentes a varios tipos de acaricidas, lo cual justifica la necesidad de desarrollar nuevos compuestos para su control. El objetivo de este estudio fue evaluar la acción acaricida del etil-4-bromofenil carbamato (LQM 919), etil (5-nitrotiazol-2-yl) carbamato (LQM 938) y el etil-4-clorofenil carbamato (LQM 996) usando la técnica de inmersión de larvas sobre una cepa de garrapatas triple resistente de *R. microplus* (cepa San Alfonso). De 100 a 200 larvas fueron sometidas a inmersión por 5 minutos a diferentes concentraciones de los carbamatos (2%, 1%, 0.5%, 0.25%, 0.125%, 0.063%, 0.031% y 0.016%) usando amitraz como testigo positivo y sólo el diluyente (etanol absoluto) como testigo negativo. Se determinó la mortalidad de larvas a las 24 horas pos-inmersión y se calculó un porcentaje de mortalidad corregida con la mortalidad observada en el grupo testigo negativo (%MC). Por medio de análisis Probit se obtuvieron las concentraciones letales (CL) de cada compuesto. Los resultados mostraron 100% de eficacia larvicida a concentraciones del 2%, 1% y 0.5% de los tres carbamatos sobre *R. microplus* resistente a acaricidas convencionales, los carbamatos LQM 938 y LQM 996 mostraron en general una mayor eficacia que el amitraz ($p < 0.01$). Las CL_{99} obtenidas en este estudio para los carbamatos LQM 919, LQM 938 y LQM 996 fueron: 0.6%, 0.431% y 0.21% respectivamente y las CL_{50} obtenidas para los mismos carbamatos fueron: 0.063%, 0.044% y 0.042% respectivamente. Los tres carbamatos mostraron un efecto concentración-dependiente sobre la mortalidad de larvas. En conclusión, la TIL mostró ser una técnica sensible para la evaluación de la eficacia larvicida de los carbamatos, los resultados de mortalidad y las CL 's obtenidas permiten suponer que los tres carbamatos son candidatos para su evaluación en pruebas de campo.

INTRODUCCIÓN

Rhipicephalus (Boophilus) microplus es considerada la garrapata más importante del ganado bovino en varios países del mundo, distribuyéndose principalmente en regiones tropicales y subtropicales (Wall y Shearer, 2010). Las infestaciones por *R. microplus* provocan en los bovinos disminución de ganancia de peso diaria, disminución de consumo de alimento, índice de crecimiento, fertilidad, producción de carne y leche, provocan a su vez, mayor permanencia en la engorda y daño a las pieles (Rebhun *et al.*, 1999; Taylor *et al.*, 2007). La presencia de garrapatas en el ganado dificulta su comercialización y la importación de animales de razas mejoradas genéticamente (Ibarra *et al.*, 2012). *R. microplus* causa daño indirecto a los bovinos por ser uno de los principales vectores de *Babesia bigemina* y *Anaplasma marginale* (Urquhart *et al.*, 2001). Las pérdidas económicas en México por daños directos e indirectos asociados a *R. microplus* se estiman en aproximadamente 48 millones de dólares anuales (Ibarra *et al.*, 2012).

Generalidades de *Rhipicephalus microplus*

La garrapata *R. microplus* pertenece al Phylum *Artropoda*, Subphylum *Chelicerata*, Clase *Arachnida*, Subclase *Acari*, Orden *Acarina*, Sub-orden *Ixodida* (*Metastigmata*), Familia *Ixodidae*, llamadas informalmente garrapatas duras (Taylor *et al.*, 2007; Pulido-Villamarín, *et al.*, 2016). Es una especie originaria del continente asiático (Low *et al.*, 2015) que lleva a cabo su alimentación en un solo hospedador, posee alta especificidad de especie, parasitando principalmente a bovinos y ocasionalmente venados (Quiroz, 2009).

Las garrapatas *R. microplus* (Figura 1A) son de color café a azul grisáceo, con blanco al frente y a los costados (Taylor *et al.*, 2007). Las larvas miden de 0.5-1mm, las ninfas de 1-2.5mm, y los adultos entre 2-3mm de largo o hasta 12mm una vez repletas de sangre (CTA, 1989; Taylor *et al.*, 2007). Poseen base del capítulo hexagonal, sin ornamentaciones y partes bucales cortas (figura 1B),

carecen de ojos, festones, y el surco anal está ausente o poco definido (Wall y Shearer, 2010).

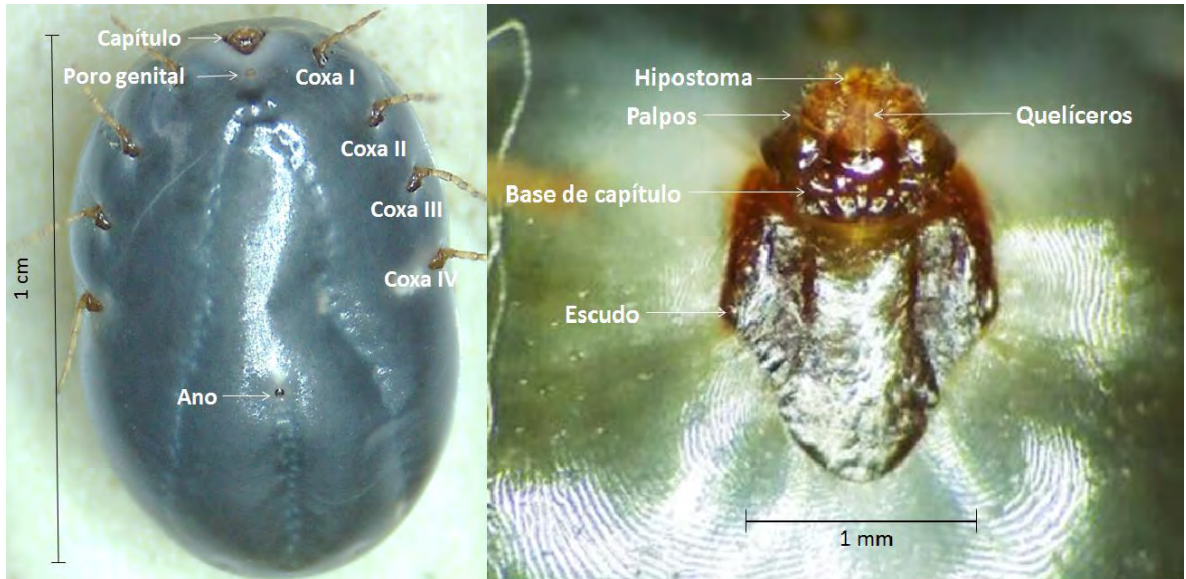


Figura 1. Morfología de hembra repleta de *Rhipicephalus microplus*. A, vista ventral; B, acercamiento al capitulo y escudo (modificado de CTA, 1989).

Es un parásito monoxeno, es decir, que necesita un solo hospedero para completar su ciclo biológico. Tiene cuatro etapas de vida: huevo, larva, ninfa y adulto (Figura 2). Este ciclo presenta dos fases, una fase de vida libre en el ambiente y una fase parásita sobre el hospedero (Georgi, 1972; Taylor *et al.*, 2007).

En la fase parásita las larvas, ninfas y adultos llevan a cabo tres alimentaciones separadas de sangre, durante estas etapas pueden fijarse en distintos lugares del hospedero antes de completar la repleción (Williams, 2010). Después de alimentarse de sangre, tienen lugar sobre el hospedador dos mudas

de la fase de larva a ninfa y de ninfa a adulto (Polanco-Echeverry y Ríos-Osorio, 2016). La fase parásita tiene una duración promedio de 21 días (Quiroz, 2009).

Los machos usualmente permanecen en los hospederos por más tiempo que las hembras, alimentándose repetidamente y fecundando a varias hembras (Mullen y Durden, 2009). Si los machos no están presentes, las hembras permanecen sujetas al hospedero por periodos más largos que en condiciones normales (Soulsby, 1988).

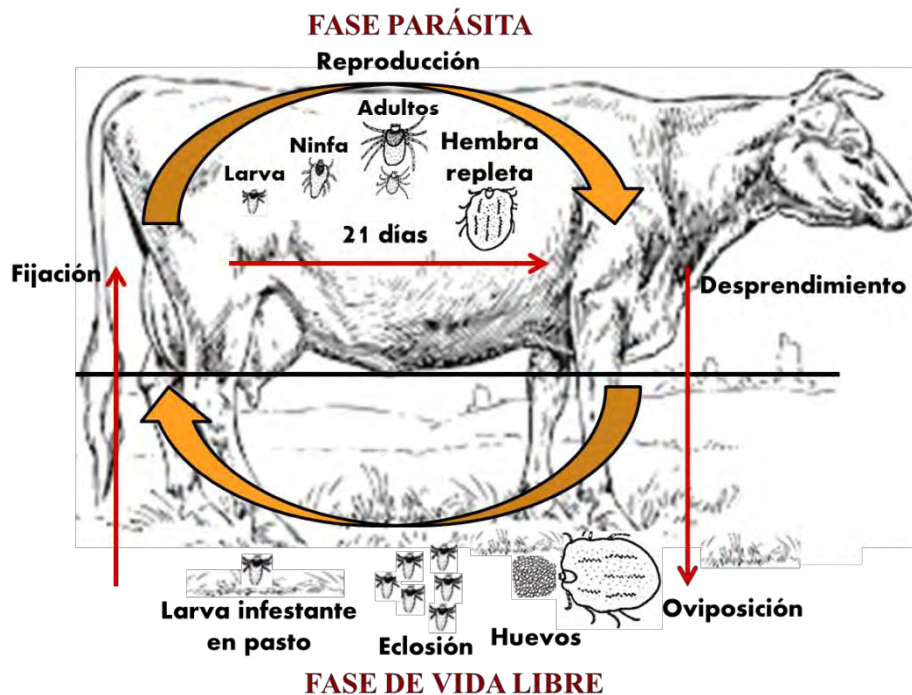


Figura 2. Ciclo biológico de *R. microplus* (modificado de Ibarra, 2012).

La fase de vida libre tiene duración variable y es condicionada por la temperatura y la humedad. Comienza cuando la hembra, fecundada y repleta de sangre, se deja caer al suelo y busca activamente refugio entre las hierbas, las hojas secas, debajo de las piedras, o en las grietas del suelo, en busca de un sitio húmedo, cálido y protegido del calor extremo para llevar a cabo la oviposición (Asociación Veterinaria Británica Londres, 1967; Polanco-Echeverry y Ríos-Osorio, 2016), éste periodo dura de 2 a 39 días (Quiroz, 2009). Cada hembra oviposita

una sola vez aproximadamente 4,500 huevos dispuestos en grandes masas, (Soulsby, 1988; Quiroz, 2009). Una vez terminada la oviposición la hembra muere (Polanco-Echeverry y Ríos-Osorio, 2016).

La eclosión de las larvas comienza de 14 y hasta 146 días después de la ovipuesta y es influenciada directamente por la temperatura (Quiroz, 2009). Las larvas permanecen corto tiempo en el lugar de eclosión, posteriormente trepan las hojas del pasto y esperan a un hospedero susceptible (larvas en fase de búsqueda). Las larvas son estimuladas fuertemente por el bióxido de carbono, las vibraciones, corrientes de aire, calor y humedad, y son capaces de sobrevivir hasta 240 días o más sin alimentarse (Asociación Veterinaria Británica Londres, 1967; Quiroz, 2009).

Situación epidemiológica de *R. microplus* en México

La distribución actual en el territorio nacional de las garrapatas del género *Rhipicephalus* (*Boophilus*) (Figura 3) es de: 65.9% en fase de control, 3.4% en fase de erradicación y solo el 30.6% es libre de este ectoparásito. Las áreas libres comprenden los estados de Sonora, Tlaxcala, Aguascalientes, Baja California y Chihuahua (excepto los municipios de Morelos, Guadalupe y Calvo) y el Norte de Baja California Sur (SAGARPA, 2017). El área de erradicación en el país se concentra en la parte norte de los estados de Coahuila, Nuevo León y Tamaulipas, estados colindantes con el estado de Texas, para permitir la exportación de ganado bovino hacia los Estados Unidos (González-Sáenz Pardo y Hernández-Ortiz, 2012).

Las infestaciones por ésta garrapata son más comunes en los meses de sequía, y disminuyen en condiciones de invierno y con el incremento de la precipitación pluvial (Bustillos *et al.*, 2015), su dispersión se ve favorecida por el movimiento del ganado de zonas infestadas a zonas libres, el transporte de forrajes, las corrientes de agua y viento capaces de trasladar a las larvas a sitios lejanos (Quiroz, 2009).



Figura 3. Clasificación del territorio nacional en relación a las áreas de distribución de la garrapata del género *Rhipicephalus spp.* (SAGARPA, 2017).

Patogenia de *R. microplus*

Las acciones patógenas y sus repercusiones son:

Acción traumática: fijación al hospedero que provoca destrucción tisular, irritación, inflamación e hipersensibilidad (Taylor *et al.*, 2007). Las lesiones curan mal, suelen infectarse secundariamente (Rebhun *et al.*, 1999) y facilitan el establecimiento de focos de miasis (Helman, 1977). Además, el acicalamiento aumentado para la remoción de éstos parásitos reemplaza otras actividades como la alimentación (Orihuela y Vázquez-Prats; 2009).

Acción expoliatriz: los estadios activos se alimentan exclusivamente de fluidos tisulares y sanguíneos de los hospederos para completar su desarrollo (Polanco-Echeverry y Ríos-Osorio, 2016). Las hembras extraen alrededor de 1 a 3 mL de sangre del hospedador (Braga *et al.*, 2017).

Acción inoculatríz: en México es el principal vector de los protozoarios hemáticos *Babesia bigemina* y *Babesia bovis* y de la Rickettsia *Anaplasma marginale*, agentes etiológicos de la Babesiosis y Anaplasmosis respectivamente (Ibarra *et al.*, 2009; Blanco-Martínez *et al.*, 2015).

Acción tóxica: las garrapatas evaden o suprimen los sistemas de homeostasis del hospedero (Mullen y Durden, 2009), secretan sustancias salivales para facilitar la penetración de la piel del hospedero (Williams, 2010), y otras que evitan la coagulación de la sangre para facilitar su ingestión (Quiroz, 2009), llegando a disminuir la agregación plaquetaria hasta en un 65% (Reck *et al.*, 2009).

Control de *R. microplus*

Los métodos de control de las ixodidosis pueden dirigirse a la fase sobre el hospedero o a la fase de vida libre en el ambiente, éstos se dividen en control químico y no químico, y buscan principalmente prevenir el desarrollo de las hembras repletas o limitar la oviposición y viabilidad de los huevos (Taylor *et al.*, 2007).

Control no químico

Se basa en medidas y estrategias disponibles, independientes de productos químicos y que buscan reducir las poblaciones de garrapatas y alargar la vida útil de los acaricidas (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2014). Las principales estrategias son:

-Control inmunológico.- Actualmente están disponibles vacunas que contienen el antígeno Bm86, glicoproteína recombinante obtenida a partir de células intestinales de garrapatas *R. microplus*, y clonada en la levadura *Pichia pastoris* (Rodríguez *et al.*, 1994), provoca que las células intestinales del artrópodo sean atacadas por mecanismos mediados por anticuerpos del hospedador (Kemp *et al.*, 1989), reduciendo el peso y la ovoposición de las hembras repletas (Rodríguez *et al.*, 1995). Su eficacia en *R. annulatus* alcanza el 99% (Fragoso *et al.*, 1998), sin embargo, en *R. microplus* el efecto es variable, con resultados de entre 10 a 89%

de eficacia (Cunha *et al.*, 2012). Por lo anterior nuevos antígenos vacúnales como el Bm95 y Subolesin siguen en desarrollo para mejorar la inmunización contra éste parásito (García-García *et al.*, 2000; Almazán, *et al.*, 2010).

-Utilización de razas resistentes.- Las razas de ganado europeo *Bos Taurus* son más susceptibles a las infestaciones por garrapatas, en tanto que las razas cebuinas *Bos indicus* y sus cruzas con ganado europeo desarrollan un mayor grado de inmunidad (Quiroz, 2009). Las razas menos susceptibles expresan genes de resistencia, que aumentan las respuestas inflamatorias y de hipersensibilidad del hospedero (Piper *et al.*, 2008).

-Medios físicos.- Comprenden la eliminación de una gran parte de la población de algún estadio de la garrapata mediante un método físico, siendo necesario la complementación con otra medida de control. El laboreo de la tierra y la quema de campos al final de la estación de sequía (donde hay mayor presencia de larvas en los pastos), contribuyen al control de las infestaciones por garrapatas (Helman, 1977; Quiroz, 2009). La remoción a mano de garrapatas se da principalmente en ganado lechero, se extraen garrapatas de 5 a 10 mm de un solo lado del animal dura aproximadamente dos minutos, pero su aplicación se ve limitada por el tamaño del hato, el personal disponible en el sistema de producción y la dificultad para ver y extraer las fases juveniles (Asociación Veterinaria Británica Londres, 1967; WingChing-Jones, 2015).

-Control biológico.- Es un potencial método de control de garrapatas, donde se hace uso de distintas especies de hongos entomopatógenos, como *Cordyceps bassiana* y *Metarhizium anisoplia*, que han demostrado tener actividad acaricida, disminuyendo la oviposición y eclosión de los huevos (López *et al.*, 2009; Fernandes *et al.*, 2011; García-Corredor *et al.*, 2016), sin embargo la principal desventaja es su dependencia a los factores ambientales como la temperatura, precipitación pluvial, textura del suelo y pH, que afectan la viabilidad y eficacia de los hongos (Ojeda-Chi *et al.*, 2010).

-Extractos de plantas.- El uso de sustancias extraídas de distintas especies de plantas como *Annona muricata*, *Syzygium aromaticum* (clavo de olor), *Morus*

nigra, entre otras, han demostrado *in vitro* poder intervenir el ciclo biológico de *R. microplus*. Los principales efectos observados de los tratamientos con estas sustancias han sido disminución marcada de la viabilidad de los huevos ovipositados por hembras tratadas y alta mortalidad en larvas (Broglia-Micheletti *et al.*, 2009; De Monteiro *et al.*, 2012; Dantas *et al.*, 2017).

-Nanopartículas.- Actualmente se investiga la actividad acaricida de nanopartículas de plata y cloruro de plata, con las que se ha observado que pueden producir alta mortalidad, principalmente en larvas y alterar significativamente sus índices reproductivos (Durán *et al.*, 2017).

Control químico

Busca interrumpir el ciclo de vida de las garrapatas a través de la aplicación de acaricidas, los intervalos de sus aplicaciones están determinados por la región ecológica, especies a combatir y eficacia residual del antiparasitario (Sumano *et al.*, 2015). Las familias químicas empleadas para el control de ectoparásitos son: organofosforados, piretroides sintéticos, lactonas macrocíclicas, fenilpirazolonas, amidinas, carbamatos, los inhibidores del desarrollo de insectos y las isoxazolinas.

-Organofosforados.- Ésteres del ácido fosfórico que inhiben por fosforilación la enzima acetilcolinesterasa (AChE) de manera irreversible por horas o hasta días, ocasionando la acumulación del neurotransmisor acetilcolina en sus sitios efectores. Provocan a nivel de placa neuromuscular una despolarización persistente del músculo esquelético, ocasionando en el parásito parálisis e incapacidad para fijarse al hospedero y finalmente la muerte (Sumano *et al.*, 2015; Reviere y Papich, 2009).

-Piretroides sintéticos.- Compuestos sintetizados a partir del ácido crisantémico, actúan a nivel axonal, mantienen los canales de sodio abiertos y alteran el potencial de membrana, desarrollando parálisis flácida (Sumano *et al.*, 2015).

-Fenilpirazolonas.- El fipronil es el único insecticida de esta clase y es usado ampliamente en el control de insectos de importancia en la salud pública y en la

industria agrícola, actúa en el sistema nervioso central bloqueando los canales de cloro regulados por el ácido gamma-aminobutírico (GABA) y los canales de cloro regulados por glutamato en ectoparásitos, provocan movimientos no controlados e incapacidad para fijarse al hospedero (Sumano *et al.*, 2015; Reviere y Papich, 2009).

-Amidinas.- El amitraz es el único compuesto representante de este grupo, es una triazapentadina, agonista alfa adrenérgico e inhibidor de la monoaminoxidasa, actúa en los sitios receptores de octopamina induciendo la producción de AMP cíclico, lo que ocasiona hiperexcitabilidad neuronal, el desprendimiento del parásito y su muerte (Taylor, 2001; Sumano *et al.*, 2015).

-Lactonas macrocíclicas.- Se clasifican en avermectinas y milbemicinas, intervienen en los canales iónicos de las células nerviosas y musculares, principalmente los canales de cloro regulados por glutamato. El flujo de cloro provoca descenso en la resistencia de la membrana celular, causando hiperpolarización de las células pos-sinápticas provocando la muerte del parásito (Sumano *et al.*, 2015; Reviere y Papich, 2009).

-Inhibidores del desarrollo.- Grupo de compuestos sin actividad ectoparasiticida directo, interfieren en el crecimiento y desarrollo de las fases inmaduras del parásito. En base a su modo de acción se clasifican en: inhibidores de la síntesis de quitina (benzoilfenil úreas), inhibidores de quitina (derivados de triazina y pirimidina) y análogos de hormona juvenil (Taylor, 2001).

-Isoxazolinas.- Es una nueva familia de compuestos químicos con actividad insecticida y acaricida, que actúan como potentes inhibidores de los canales de cloro del ácido γ -aminobutírico (GABA) y glutamato de los artrópodos. Entre ellos se pueden mencionar el fluralaner, el afoxolaner y el sarolaner (Gassel *et al.*, 2014; McTier *et al.*, 2016).

Aplicación de acaricidas

Las vías de administración de acaricidas difieren de acuerdo a las características del producto. En los baños de inmersión o aspersion generalmente son usados organofosforados, carbamatos, piretroides y amidinas, de forma inyectable las lactonas macrocíclicas y por derrame dorsal, *spot on* o *pour on* organofosforados, piretroides, fipronil, fluazuron y sus mezclas (Rosa y Ribicich, 2012).

La inmersión completa requiere disponer de una fuente cercana de agua, instalaciones adecuadas, dilución correcta, buen manejo del bañadero y personal responsable (Rosa y Ribicich, 2012). La aspersion es de eficacia comparable con la inmersión completa, con las ventajas de operar de manera más rápida, instalaciones más económicas y disminución de pérdidas debido a la degradación de insecticidas (Asociación Veterinaria Británica Londres, 1967).

El uso de acaricidas contra *R. microplus* cada 21 días como correspondería con la fase parásita no es recomendado. Los tratamientos administrados deben aplicarse a intervalos de 12 días al comienzo de temporada de infestaciones, debido a la menor susceptibilidad del estadio de ninfa a los acaricidas. (Taylor *et al.*, 2007). Las mayores infestaciones de *R. microplus* en México se dan generalmente en los meses de mayo y junio, donde las condiciones climáticas son más favorables (Alonso-Díaz *et al.*, 2007).

Fenómeno de resistencia

El uso indiscriminado de los productos disponibles en el mercado ha ejercido una fuerte presión para el desarrollo de cepas resistentes a una o varias familias de acaricidas, lo cual es un problema cada vez más frecuente (Wall *et al.*, 2010; Rodríguez-Vivas *et al.*, 2012).

El fenómeno de resistencia es el aumento significativo de individuos de la misma especie, con capacidad adquirida para tolerar dosis de uno o varios fármacos que resultaban letales para una población normal o susceptible. Este es

un proceso evolutivo generado por selección genética (Ibarra *et al.*, 2012), y afectado por factores ambientales, biológicos y de manejo (Pérez-Cogollo, *et al.*, 2010). El desarrollo de la resistencia se divide en tres fases (Alonso-Díaz *et al.*, 2006):

-Fase de establecimiento: Aparición por mutaciones naturales del alelo resistente en una población, independiente a la presión de selección.

-Fase de desarrollo: Aumento de la tasa de sobrevivencia de individuos resistentes sobre los individuos susceptibles después del uso de productos químicos. La velocidad de este proceso depende si el gen de resistencia es dominante, parcialmente dominante o recesivo.

-Fase de emergencia: Fase de corta duración, con elevada tasa de presión de selección, donde el alelo resistente es lo suficientemente común en una población, manifestando menos susceptibilidad a un acaricida.

Los mecanismos de resistencia en las garrapatas pueden dividirse en dos grupos, insensibilidad del sitio de acción y resistencia metabólica (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2012).

-Insensibilidad del sitio de acción: Es la disminución del efecto tóxico por modificación de la molécula blanco del acaricida. Este mecanismo se ha documentado ampliamente en la resistencia en los canales de sodio de los piretroides sintéticos (Domínguez-García *et al.*, 2010).

-Resistencia metabólica: Es la detoxificación metabólica que se da por procesos enzimáticos que radica en la modificación de las vías metabólicas del artrópodo. Las formas más importantes de resistencia metabólica involucran oxidasas multifuncionales, glutatión -S- transferasa y esterasas (Alonso-Díaz *et al.*, 2006).

El mal manejo de productos químicos se relaciona con: la sub o sobredosificación, la frecuencia de las aplicaciones, la correcta aplicación de los acaricidas, la selección y rotación de moléculas acaricidas y la falta de bases epidemiológicas para el control de los ectoparásitos (Polanco-Echeverry y Ríos-Osorio, 2016). En México son comunes las aplicaciones regulares anuales (4-5

veces al año) del mismo compuesto por varios años, sin rotación de la familia química, favoreciendo la aparición de poblaciones de garrapatas resistentes (Pérez-Cogollo, *et al.*, 2010). El fenómeno de resistencia múltiple ha sido confirmado en varias partes el mundo y demanda la necesidad de generar nuevas estrategias para el control racional de garrapatas (Cuore, *et al.*, 2017, Klafke *et al.*, 2006).

La cepa “San Alfonso”, originaria de los ríos de Tabasco, presenta triple resistencia a los organofosforados, las amidinas y los piretroides. En varios estados de México se han registrado muestras de garrapatas con resistencia a estas tres familias de fármacos en el sudeste y zonas costeras del Pacífico y Golfo de México (Alonso-Díaz *et al.*, 2006). Garrapatas con múltiple resistencia a organofosforados, amidinas, piretroides e ivermectina se han reportado en el estado de Veracruz (Fernández-Salas *et al.*, 2012).

El diagnóstico de resistencia puede ser llevado a cabo con pruebas bioquímicas, moleculares o con bioensayos (Alonso-Díaz *et al.*, 2006).

Bioensayos para diagnóstico de la resistencia

Los métodos más usados actualmente para la detección del fenómeno de resistencia son los bioensayos. Estos consisten en la exposición de garrapatas a acaricidas para cuantificar su efecto toxicológico, comparando la eficacia de un producto en una cepa sensible con una cepa resistente. Estos bioensayos permiten adoptar estrategias de control de poblaciones de garrapatas, prevenir y monitorear la diseminación de garrapatas resistentes (Domínguez-García *et al.*, 2010). Entre estos tipos de bioensayos se pueden citar:

-Técnica de inmersión de adultas (TIA).- Desarrollada primeramente por Drummond *et al* (1967) es usada para determinar la capacidad de ovoposición de las garrapatas tratadas con la concentración comercial recomendada de un producto dado, obteniendo la concentración inhibitoria de la oviposición (CIO) y la concentración inhibitoria de la eclosión (CIE).

-Técnica de paquete de larvas (TPL).- Fue desarrollada en ensayos con *R. microplus*, por el Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization (CSIRO) en Australia. La FAO la establece como la principal prueba de diagnóstico de resistencia en garrapatas. En ella larvas de garrapatas son expuestas a los acaricidas en una superficie de papel filtro previamente impregnada (Alonso-Díaz *et al*, 2006).

-Técnica de inmersión de larvas (TIL).- Esta técnica fue descrita primeramente por Shaw (1966), provee resultados de la misma confianza que los obtenidos usando la técnica de paquete de larvas, pero al no estar promovida por la FAO no ha sido utilizada comúnmente en el diagnóstico de resistencia a los acaricidas (Alonso-Díaz, *et al.*, 2006). Sin embargo, en varios estudios, esta técnica ha mostrado mayor sensibilidad, por lo que es eficiente para diferenciar susceptibilidad o resistencia en las larvas (Castro-Janer *et al.*, 2009). La técnica de inmersión de larvas ha tenido varias modificaciones con el fin de hacer más práctico el ensayo y poder abarcar mayor cantidad de compuestos. La base constante de la técnica consiste en sumergir las larvas, de 7 a 14 días de edad, en suspensiones de un acaricida, durante un período de 5 o 10 minutos, posteriormente son retiradas y colocadas en un sobre de papel filtro e incubadas a 27 ± 2 °C con humedad ambiental del 80-90%, realizándose la lectura de mortalidad a las 24, 48 o 72 horas.

La TIL ha mostrado tener mayor sensibilidad que la TPL para detectar susceptibilidad y resistencia a acaricidas, como en el Fipronil (Castro-Janer, *et al.*, 2010) y el Amitraz (Mendes *et al.*, 2013), donde las concentraciones letales obtenidas usando esta técnica fueron inferiores a las registradas en pruebas con la TPL.

Carbamatos

Son compuestos derivados del ácido metilcarbámico. Además de su aplicación acaricida, han sido utilizadas como herbicidas, fungicidas e insecticidas (Ferrer, 2003). El mecanismo de acción de los carbamatos utilizados para el

control de ácaros es similar al de los organofosforados, imitan la estructura de la acetilcolina uniéndose de manera reversible al sitio de acción de la AChE (Fukuto, 1990). Inhiben la AChE por carbamitación y su regeneración tarda 30 minutos aproximadamente, generalmente son menos tóxicos que los organofosforados (Sumano *et al.*, 2015). Son administrados principalmente por vía tópica y se eliminan principalmente a través de la orina. Entre los carbamatos usados para el control de artrópodos se encuentran el carbaril (1-naftil-N-metilcarbamato) y el propoxur (2-isopropoxi-fenil-N-metilcarbamato). El uso del carbaril para el control de garrapatas ha sido limitado debido a su inestabilidad en baños e ineficacia frente a cepas resistentes a compuestos organofosforados (Botana-López *et al.*, 2002). El propoxur, insoluble al agua, es usado en collares para control de pulgas en perros (Adams, 2001).

En el Laboratorio de Química Medicinal (LQM) de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la UNAM se diseñaron y sintetizaron una serie de nuevos carbamatos con posible actividad acaricida (Ángeles *et al.*, 2000). En estudios realizados por el equipo de investigación del Laboratorio de inmunología y biología molecular de parásitos (Laboratorio 1 de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria), se demostró que el etil-4-bromofenil carbamato (LQM 919), el etil (5-nitrotiazol-2-yl) carbamato (LQM 938) y el Etil-4-clorofenil carbamato (LQM 996) pueden interferir en el ciclo biológico de *R. microplus* tanto en cepas susceptibles como resistentes a los acaricidas convencionales (Prado-Ochoa *et al.*, 2013; Pérez-González *et al.*, 2014).

Pérez-González *et al* (2014) utilizando la prueba de inmersión de adultas, determinó *in vitro* una concentración inhibitoria de la eclosión 99% (CIE₉₉) de 0.668 mg/mL para el LQM 919 y de 0.589 mg/mL para el LQM 996 en garrapatas de la cepa “San Alfonso”, caracterizada por ser resistente a las familias químicas de amidinas, piretroides y organofosforados. En trabajos anteriores se ha demostró que estos carbamatos son débiles inhibidores y con poca afinidad de la AChE de las garrapatas y que su principal acción es disminución de la oviposición y de la viabilidad de los huevos ovipositados por las hembras tratadas,

modificando su color y textura, observándose opacos, secos y con poca adherencia entre ellos (Prado-Ochoa *et al.*, 2014). Sin embargo, aunque la mortalidad de larvas producida por los carbamatos LQM 919 Y LQM 996 fue nula en el bioensayo *in vitro* (TPL) a concentraciones porcentuales máximas de 1% (Prado-Ochoa *et al.*, 2013), Iturbe-Requena (2014), utilizando la técnica de cámaras, administró por aspersion *in vivo* sobre el bovino las CIE₉₉ reportadas por Perez-Gonzalez (2014), en ellas observó una reducción de la repleción de hembras que fueron tratadas en estadio de larva en un 99.09% con el LQM 919 y 96.31% con el LQM 996 con respecto a los tratamientos testigos donde solo se utilizó el vehículo (Iturbe-Requena, 2014). Los anterior sugirió que la acción toxica de los carbamatos sobre las larvas se manifiesta sólo cuando éstas son completamente cubiertas con la solución de carbamato o bien cuando la larva se encuentra alimentándose sobre el bovino.

Por su parte el LQM 938 mostró una alta eficacia acaricida en la TPL, provocando mortalidad en el estadio de larvas. De este carbamato se obtuvieron las CL's de: CL₅₀= 0.226 y CL₉₉= 0.305 sobre larvas de cepa susceptible "Media Joya" (Prado-Ochoa, 2009) y CL₅₀= 0.167 y CL₉₉= 2.644 en cepa "San Alfonso" (Pérez-González *et al.*, 2014).

JUSTIFICACIÓN

R. microplus provoca importantes pérdidas económicas al país y el desarrollo de cepas resistentes a uno o varios acaricidas dificulta su erradicación. El control integrado de garrapatas es ideal para combatir esta problemática, pero su difícil aplicación a nivel de campo, la resistencia múltiple y la insuficiente eficacia de usar sólo métodos de control no químico, crea la necesidad del desarrollo de nuevos compuestos químicos para el control de garrapatas.

Tres nuevos carbamatos diseñados y sintetizados en el LQM en la FESC de la UNAM: el etil-4-bromofenil carbamato (LQM 919), el etil (5-nitrotiazol-2-yl) carbamato (LQM 938) y el etil-4-clorofenil carbamato (LQM 996) (Ángeles *et al.*, 2000), han mostrado, en estudios realizados por el equipo de investigación del Laboratorio de Inmunología y Biología Molecular de Parásitos (Laboratorio 1 de la UIM-FESC), poder interferir el ciclo biológico de *R. microplus* tanto en cepas susceptibles como resistentes a los acaricidas convencionales (Prado-Ochoa *et al.*, 2013; Pérez-González *et al.*, 2014). Sin embargo, los resultados de las evaluaciones *in vitro* e *in vivo* de los efectos de los carbamatos LQM 919 y LQM 996 sobre larvas de *R. microplus* son contradictorios. Por un lado se observó poca o nula actividad larvicida *in vitro* usando la TPL (Prado-Ochoa *et al.*, 2013) y por otro lado se observó una alta eficacia (99%) sobre larvas cuando la evaluación se hizo *in vivo* con la técnica de cámaras, utilizando las CIE₉₉ obtenidas sobre cepa “San Alfonso” (Iturbe-Requena, 2014). Por su parte, el LQM 938 tuvo una alta eficacia en la TPL tanto en cepa susceptible como triple resistente (Prado-Ochoa *et al.*, 2013; Pérez-González *et al.*, 2014), sin embargo, no fue evaluado *in vivo*.

La TIL aunque no es una técnica recomendada por la FAO, es un bioensayo que tiene como principal ventaja la exposición directa de toda la cutícula de las larvas al producto por inmersión, a diferencia de la TPL en donde las larvas sólo son expuestas a una superficie de papel impregnada con los productos. Esto podría simular mejor las condiciones de exposición de las larvas a los acaricidas en el campo y puede reflejar mejor los efectos de los productos en

condiciones reales. Por lo anterior en este estudio se utilizó la TIL para evaluar mejor los posibles efectos de los carbamatos LQM 919, LQM 938 y LQM 996 sobre larvas de *R. microplus*.

HIPÓTESIS

El efecto larvicida de los etil-carbamatos LQM 919, LQM 938 y LQM 996 es concentración-dependiente por lo que es posible calcular sus CL_{10} , CL_{50} , CL_{90} y CL_{99} .

OBJETIVOS

Determinar mediante la TIL, la eficacia y las concentraciones letales de tres nuevos etil-carbamatos en garrapatas *Rhipicephalus microplus* cepa "San Alfonso".

Objetivos particulares

- Estandarizar la técnica de inmersión de larvas en el laboratorio.
- Evaluar el efecto larvicida *in vitro* del etil-4-bromofenil carbamato (LQM 919), el etil (5-nitrotiazol-2-yl) carbamato (LQM 938) y el etil-4-clorofenil carbamato (LQM 996) usando la técnica de inmersión de larvas.
- Determinar las CL 10, 50, 90 y 99 de los carbamatos LQM 919, LQM 938 y LQM 996 sobre larvas de *R. microplus*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación

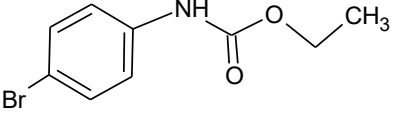
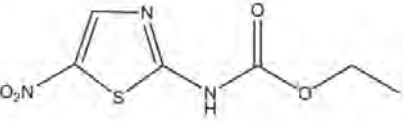
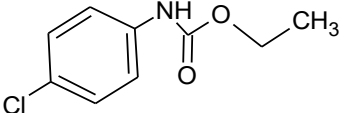
El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Inmunología y Biología Molecular de Parásitos (Laboratorio 1) de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la FESC, UNAM.

Material biológico

Se utilizaron larvas de garrapatas de la especie *R. microplus* de la cepa “San Alfonso” resistente a tres familias de acaricidas: amidinas, piretroides y organofosforados, cepa donada por el Centro Nacional de Parasitología perteneciente a la SAGARPA. El ciclo biológico de la garrapata se mantuvo a través de infestaciones controladas en bovinos dentro de las instalaciones del módulo de producción pecuaria de posgrado de la FESC, a partir de hembras repletas se obtuvieron larvas y fueron mantenidas *in vitro* en el laboratorio para la realización de los bioensayos.

Carbamatos

Los compuestos evaluados fueron los etil-carbamatos LQM 919, LQM 938 y LQM996 (las fórmulas químicas se presentan en el cuadro 1), los cuales fueron diseñados y sintetizados en el Laboratorio de Química Medicinal en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, proyecto a cargo del Dr. Enrique Ángeles Anguiano (Ángeles *et al.*, 2000).

Nombre Químico	Estructura	Peso Molecular (g/mol)	Clave
Etil-4-bromofenil carbamato		244	LQM 919
Etil (5-nitrotiazol-2-yl) carbamato		217	LQM 938
Etil-4-clorofenil carbamato		199.63	LQM 996

Cuadro 1: Nombre químico, estructura y peso molecular de los etil-carbamatos LQM 919, LQM 938 y LQM 996.

Preparación de material biológico

Se pesaron 20 mg de huevos de garrapata *R. microplus* cepa "San Alfonso" se introdujeron en tubos cónicos de microcentrifuga de 2.0 mL (viales) y los tubos fueron cerrados con tela de algodón para permitir la oxigenación. Los viales fueron incubados en estufa entomológica a 28 ± 2 C° de temperatura y 80-90% de humedad relativa. Aproximadamente de 100 a 200 larvas eclosionaron de cada tubo y se mantuvieron en incubación hasta cumplir 7 a 14 días de edad para realizar la prueba.

Preparación de soluciones

Se preparó una solución madre de 9 mL al 2% de los etil carbamatos LQM 919, LQM 996, LQM 938 y amitraz (Testigo positivo), usando etanol absoluto como diluyente. Se realizaron diluciones dobles seriadas para obtener 4.5 mL de las concentraciones: 2%, 1%, 0.5%, 0.25%, 0.125%, 0.063%, 0.031% y 0.016% por cada fármaco.

Realización de la TIL

La prueba fue realizada con algunas modificaciones a la técnica descrita por Castro-Janer *et al.* (2009) que no alteraron la condición de las larvas ni de los químicos utilizados. Se eligió el etanol absoluto como solvente y el tiempo de inmersión (5 minutos) con base en el estudio de Gonçalves *et al.*, (2007). En este estudio, previo a la inmersión se colocaron los viales con la tapa de tela hacia abajo para aprovechar el geotropismo negativo de las larvas y así separar los cascarones de los huevos ya eclosionados y eliminarlos fácilmente (Figura5). Se desecharon las tapas de algodón y se llenaron con las diluciones respectivas y cerradas rápidamente con las larvas de cada tubo fueron sumergidas por triplicado en 1.5 mL de cada concentración evaluada (2%, 1%, 0.5%, 0.25%, 0.125%, 0.063%, 0.031% y 0.016%) y agitadas vigorosamente por 10 segundos en agitador vortex y puestas en agitación leve durante cinco minutos en agitador orbital.

Las inmersiones comenzaron con los testigos negativos de agua destilada y etanol absoluto (100%) y posteriormente se continuó con los carbamatos evaluados de menor a mayor concentración. Finalmente se realizaron las inmersiones con el testigo positivo amitraz (Bovitraz® 12.5%, Bayer) a las mismas concentraciones que los carbamatos evaluados. Pasado el tiempo de inmersión se decantó la solución de los viales y las larvas fueron colocadas en paquetes de papel filtro en donde se dejaron reposar por una hora para permitir la evaporación de los químicos (Figura 6). Los paquetes se incubaron en estufa entomológica a

28±2 C° de temperatura y 80-90% de humedad relativa durante 24 horas. Finalmente, los paquetes fueron abiertos y se evaluó la mortalidad de las larvas, contando el número de larvas vivas y muertas de cada paquete. Se consideraron larvas muertas aquellas que no lograban desplazarse.

Los datos de mortalidad de larvas observada en cada dilución de los carbamatos y del testigo positivo fueron corregidos tomando como base la mortalidad observada en el testigo de etanol y utilizando la fórmula Abbott para calcular mortalidad corregida (Abbott, 1925).

$$\%MC = 100 (\%MTX - \%MT0) / (100 - \%MT0)$$

Dónde:

%MC= Porcentaje de mortalidad corregida

%MTX= Porcentaje de mortalidad de tratamiento

%MT0= Porcentaje de mortalidad de tratamiento testigo



Figura 4. Larvas de *R. microplus* preparadas para inmersión. Después del cultivo de 20 mg de huevos en tubos cónicos de microcentrífuga tapados con tela de algodón se voltearon. Se observa el geotropismo negativo de las larvas disponiéndose en la parte superior de los viales.



Figura 5. Paquetes de papel filtro con larvas de *R. microplus* para la incubación. Los paquetes se mantuvieron abiertos una hora después de colocar a las larvas tratadas en su interior. El objeto es permitir la evaporación del etanol.

Análisis estadístico

Los %MC's observados en los diferentes tratamientos fueron procesados mediante un ANOVA factorial (PRODUCTO X CONCENTRACIÓN) utilizando el programa Statistical versión 7 para Windows. Las diferencias entre medias fueron establecidas por Diferencia Mínima Significativa de Fisher tomando un nivel de confianza del 95%. Se calcularon las concentraciones letales (CL_{10} , CL_{50} , CL_{90} y CL_{99}) de cada carbamato con sus respectivos límites de confianza, realizando un análisis Probit usando el software Polo-Plus®.

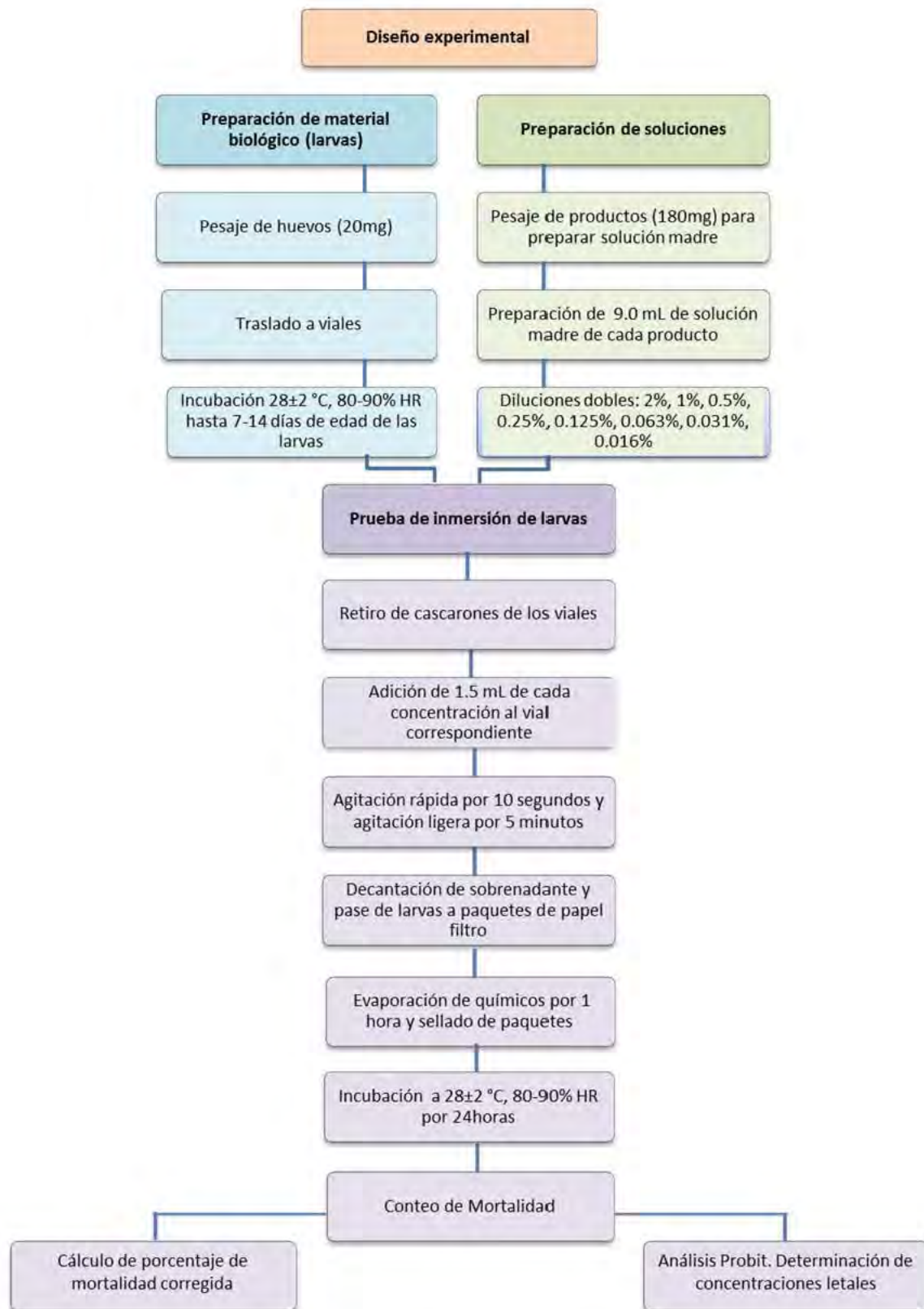


Figura 6. Diseño experimental. Disposición de material biológico, preparación de soluciones, y realización de la prueba de inmersión de larvas.

RESULTADOS

Mortalidad de larvas

La mortalidad promedio observada en los testigos negativos de etanol absoluto y agua fue de 14.6 ± 2 y 0% respectivamente ($n = 9$ repeticiones). El promedio de mortalidad observada con el etanol absoluto fue tomada para el cálculo de %MC de los productos (ver fórmula en materiales y métodos). Los resultados %MC (media \pm EE) de larvas tratadas con diferentes concentraciones de los carbamatos evaluados se muestran en el cuadro 2 y en la figura 7. Los tres carbamatos y el amitraz produjeron un %MC de 100% a concentraciones de 2%, 1% y 0.5% y fueron superiores al testigo negativo ($p < 0.05$). En las concentraciones de 0.25% y 0.125% todos los productos mostraron %MC mayores al 70%, sin embargo, en la concentración del 0.063% la actividad del amitraz y del LQM 919 disminuyó por debajo del 50% y fue menor ($p < 0.05$) a la actividad del LQM 938 y LQM 996. En la concentración de 0.031% no se observó diferencia en la actividad del amitraz con respecto al testigo negativo ($p > 0.05$), sin embargo los tres carbamatos evaluados tuvieron %MC superiores al amitraz y al testigo negativo ($p < 0.05$). En la concentración del 0.016% únicamente en LQM 938 mostró un %MC superior a los otros tres productos y al testigo negativo ($p < 0.05$). Tomando en cuenta únicamente el efecto del factor PRODUCTO, el ANOVA mostró mayores %MC's ($p < 0.01$) del LQM 938 y LQM 996 con respecto al del amitraz (figura 8).

Concentraciones letales

Los resultados del análisis Probit para la obtención de las CL_{10} , CL_{50} , CL_{90} y CL_{99} de los carbamatos estudiados se muestran en los cuadros 3, 4 y 5 mientras que los datos del testigo positivo (amitraz) se muestran en el cuadro 6. La CL_{99} del LQM 919 fue más alta que la de los otros productos (0.600 %, IC=0.344-1.649), mientras que del LQM 996 fue numéricamente menor (0.210 %, IC=0.130-0.586) a

la observada para el amitraz (0.342 %, IC=0.255-0.540) y el carbamato LQM 938 (0.431 %, IC=0.244-1.203). La figura 9 muestra la regresión lineal en escala logarítmica de los carbamatos LQM919, LQM 996, LQM 938 y amitraz. Se observó un efecto concentración-dependiente en las cuatro moléculas evaluadas ($p < 0.05$).

Porcentaje de mortalidad corregida

Producto	0.016%	0.031%	0.063%	0.125%	0.25%	0.5%	1%	2%
LQM 919	2.575±2.3 ^a	32.15±10.22 ^a	36.53±11.84 ^c	75.26±13.86 ^b	91.96±5.3 ^b	100±0 ^b	100±0 ^b	100±0 ^b
LQM 996	0±0 ^a	35.81±13.42 ^a	84.58±2.49 ^b	96.07±2.59 ^b	96.49±3.11 ^b	100±0 ^b	100±0 ^b	100±0 ^b
LQM 938	13.03±9.97 ^a	28.09±7.69 ^b	91.67±3.57 ^c	89.51±5.025 ^b	89.67±6.22 ^b	100±0 ^b	100±0 ^b	100±0 ^b
Amitraz (+)	0±0 ^a	0.32±0.32 ^a	46.45±8.53 ^b	82.75±8.01 ^b	92.89±3.6 ^b	100±0 ^b	100±0 ^b	100±0 ^b
Etanol (-)	----							
Agua (-)	0±0 ^a							

Cuadro 2. Media (±EE) de los porcentajes de mortalidad corregidos (%MC) de larvas de *Rhipicephalus microplus* expuestas a diferentes concentraciones de los etil carbamatos LQM 919, LQM 996, LQM 938 y amitraz (testigo positivo).

*Indica diferencia significativa $p < 0.05$ con respecto al testigo negativo (agua).

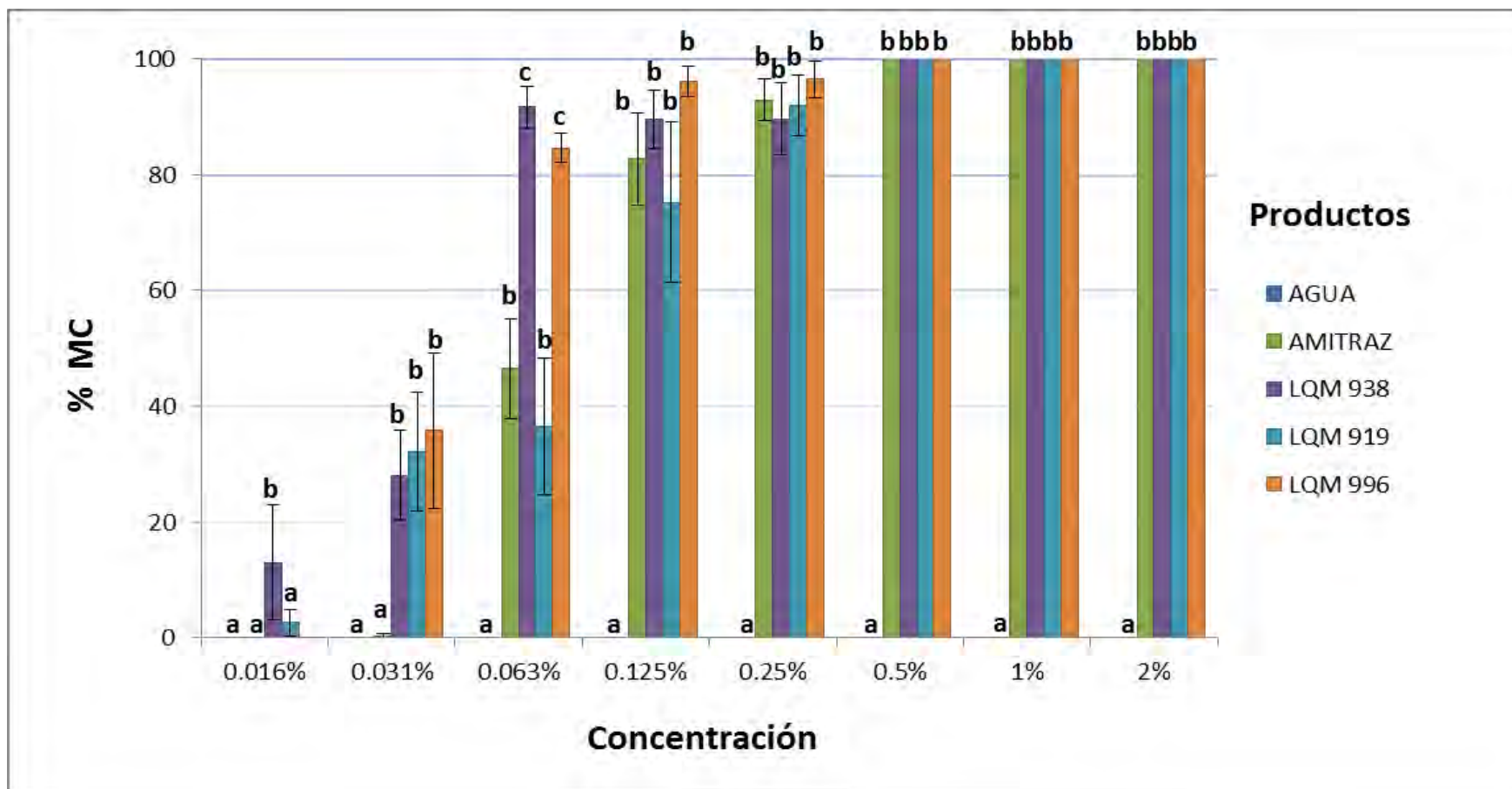


Figura 7. Media (\pm EE) de los porcentajes de mortalidad corregida (%MC) en larvas de garrapata *R. microplus* cepa “San Alfonso” obtenida usando la técnica de inmersión de larvas con los etil-carbamatos LQM 919, LQM 938 y LQM 996 y testigos de amitraz y agua destilada (mortalidad nula). Letras diferentes indican diferencia significativa entre medias ($p < 0.05$) de los diferentes grupos a la misma concentración.

LQM 919

Concentraciones letales (CL)	(%)	Intervalo de confianza (95%)
CL10	0.018	0.009 - 0.028
CL50	0.063	0.046 - 0.084
CL90	0.218	0.152 - 0.396
CL99	0.600	0.344 – 1.649

Cuadro 3. Análisis Probit (Polo-Plus® Software) de la mortalidad en larvas de garrapata *R. microplus* cepa “San Alfonso” usando la técnica de inmersión de larvas con el etil-carbamato LQM 919. Se muestran las concentraciones letales 10, 50, 90 y 99 con sus respectivos intervalos de confianza 95%.

LQM 996

Concentraciones letales (CL)	(%)	Intervalo de confianza (95%)
CL10	0.017	0.007 - 0.027
CL50	0.042	0.027 - 0.058
CL90	0.102	0.072 – 0.184
CL99	0.210	0.130 - 0.586

Cuadro 4. Análisis Probit (Polo-Plus® Software) de la mortalidad en larvas de garrapata *R. microplus* cepa “San Alfonso” usando la técnica de inmersión de larvas con el etil-carbamato LQM 996. Se muestran las concentraciones letales 10, 50, 90 y 99 con sus respectivos intervalos de confianza 95%.

LQM 938

Concentraciones letales (CL)	(%)	Intervalos de confianza (95%)
CL10	0.013	0.006 – 0.019
CL50	0.044	0.031 – 0.060
CL90	0.155	0.106 – 0.284
CL99	0.431	0.244 – 1.203

Cuadro 5. Análisis Probit (Polo-Plus® Software) de la mortalidad en larvas de garrapata *R. microplus* cepa “San Alfonso” usando la técnica de inmersión de larvas con el etil-carbamato LQM 938. Se muestran las concentraciones letales 10, 50, 90 y 99 con sus respectivos intervalos de confianza 95%.

Amitraz

Concentraciones letales (CL)	(%)	Intervalos de confianza (95%)
CL10	0.035	0.024 - 0.045
CL50	0.078	0.064 - 0.093
CL90	0.176	0.145 - 0.232
CL99	0.342	0.255 - 0.540

Cuadro 6. Análisis Probit (Polo-Plus® Software) de la mortalidad en larvas de garrapata *R. microplus* cepa “San Alfonso” usando la técnica de inmersión de larvas con amitraz (testigo positivo). Se muestran las concentraciones letales 10, 50, 90 y 99 con sus respectivos intervalos de confianza 95%.

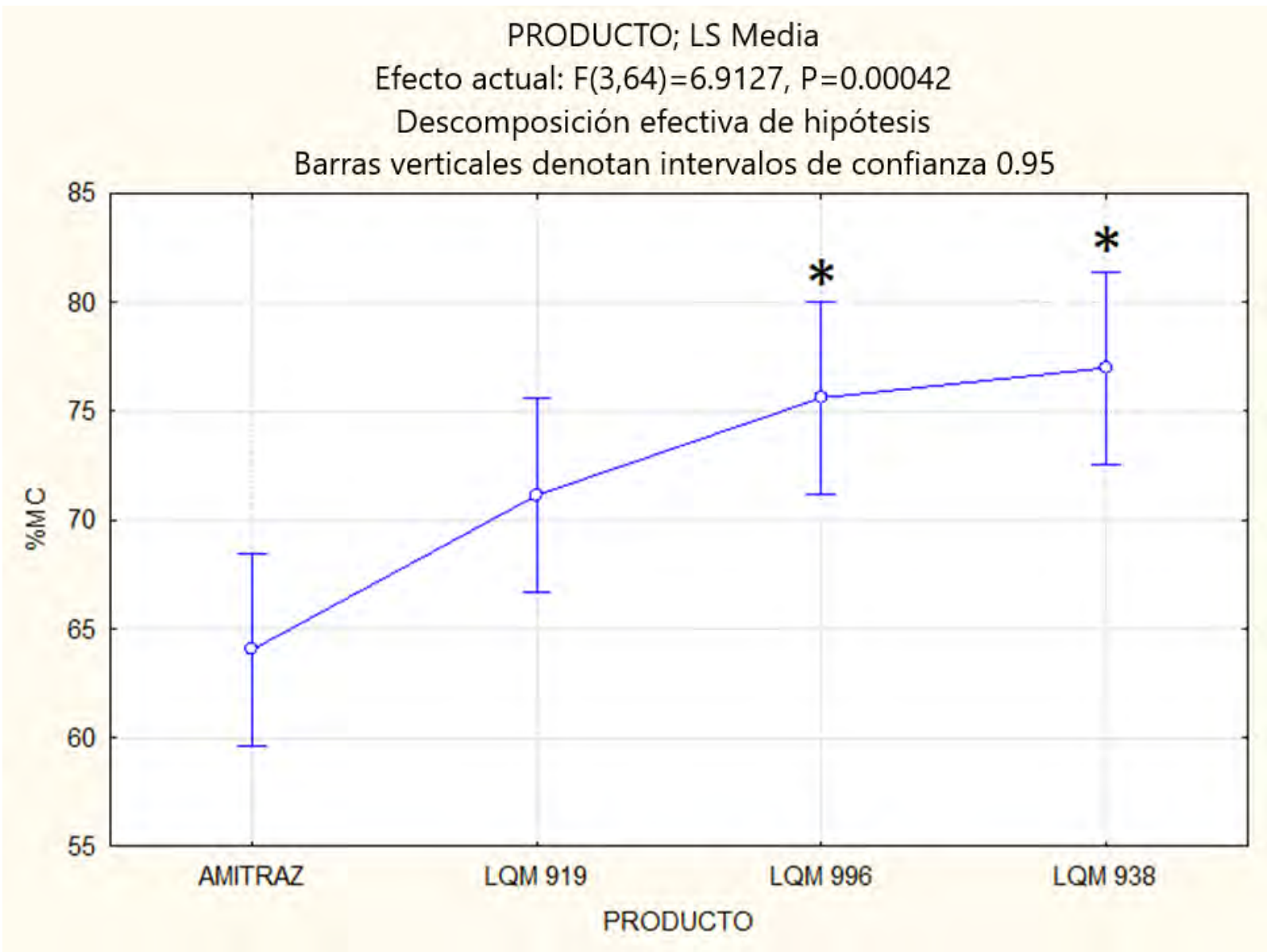


Figura 8. Media (\pm DS) de los porcentajes de mortalidad corregida (%MC) evaluando sólo el factor PRODUCTO.
 *Diferencia significativa con amitraz ($p < 0.01$).

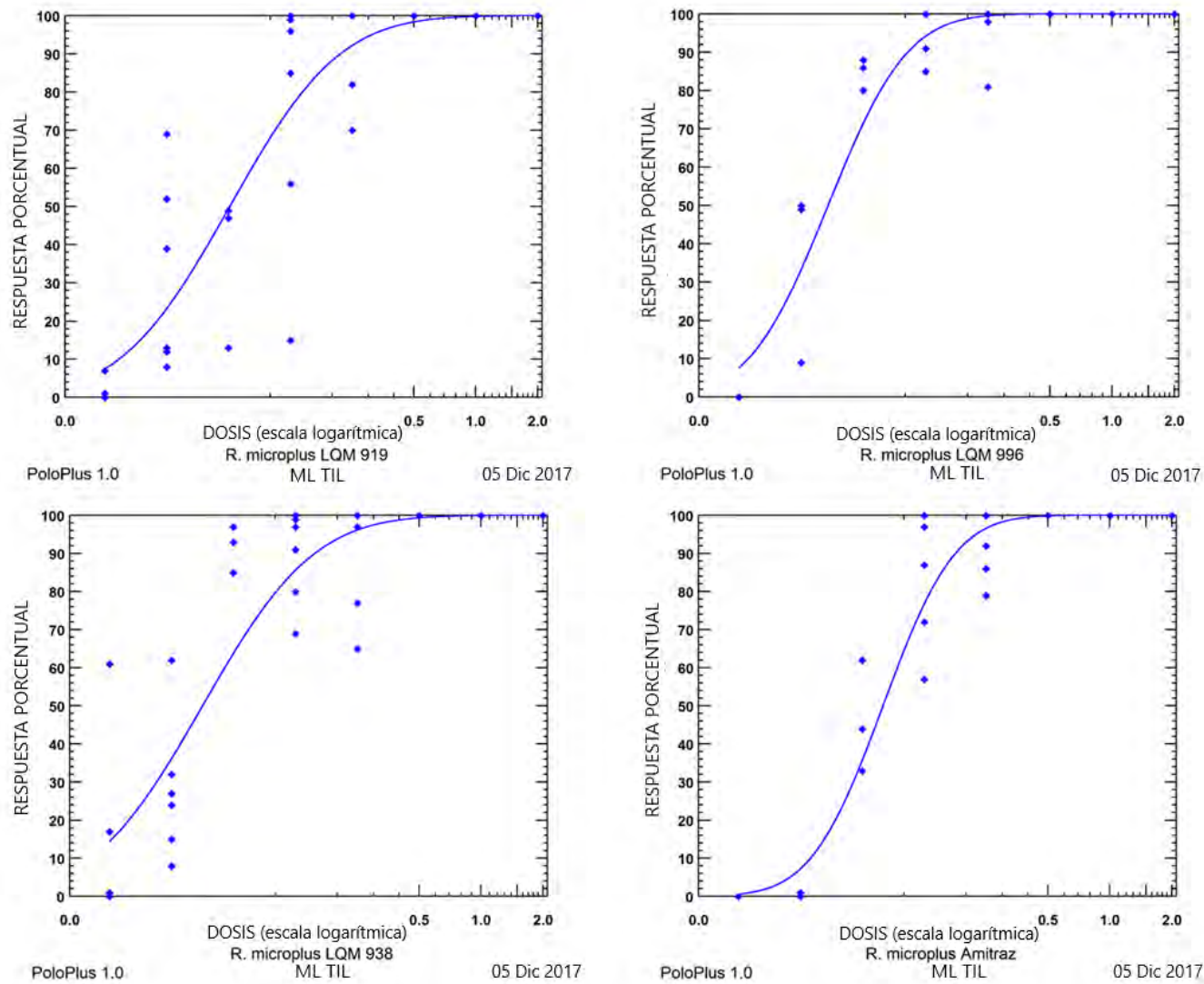


Figura 9.

Probit (Polo-Plus® Software). Regresión lineal en escala logarítmica de la respuesta dosis-mortalidad en larvas tratadas con los etil-carbamatos LQM919, LQM938, LQM 996 y el amitraz.

Análisis

DISCUSIÓN

Las infestaciones por *R. microplus* provocan pérdidas económicas importantes a la ganadería bovina. El fenómeno de resistencia a productos químicos es cada vez más frecuente debido a la presión de selección ocasionada por el uso indiscriminado de acaricidas. El desarrollo de nuevos compuestos químicos, a los cuales no existen mecanismos de resistencia por parte de los parásitos, ofrece una alternativa al problema de la resistencia. Por lo anterior se han destinado esfuerzos y recursos para el estudio de tres nuevos carbamatos: LQM 919, LQM 938 y LQM 996, que fueron desarrollados y patentados por la FES-Cuautitlán, UNAM y que han demostrado un efecto inhibitor del desarrollo y la reproducción de *R. microplus*. En el presente trabajo, utilizando una técnica de inmersión de larvas de *R. microplus* se observó en los tres nuevos carbamatos una alta eficacia larvívica, incluso dos de ellos produjeron significativamente mayor mortalidad de larvas que el amitraz y sus efectos fueron concentración-dependientes, lo que permitió un cálculo confiable de sus concentraciones letales.

La eficacia de un acaricida puede ser medida por sus efectos en diferentes fases evolutivas de la garrapata, por ejemplo, la técnica de TIA mide el efecto de estos sobre la fase adulta, mientras que la TPL y la TIL miden el efecto sobre fases larvianas. Las dos primeras técnicas mencionadas han sido estandarizadas y recomendadas por la FAO para la evaluación de la eficacia acaricida y para la determinación de la resistencia a los mismos (Alonso-Díaz *et al.*, 2006) mientras que la tercera no está avalada por la FAO pero ha sido utilizada para la evaluación de la eficacia acaricida de ivermectina, fipronil (Castro-Janer *et al.*, 2011) y amitraz (Mendes *et al.*, 2013). En el presente estudio utilizando TIL, los tres carbamatos evaluados produjeron mortalidad (%MC) del 100% de las larvas a concentraciones del 2%, 1% y 0.5% y mortalidades superiores al 70% a las concentraciones de 0.25% y 0.125%. Lo anterior fue diferente a lo observado por Prado-Ochoa (2009), que utilizando la TPL reportó que los carbamatos LQM 919 y LQM 996 a una concentración del 1% produjeron porcentajes de mortalidad de 0.47% y 0%

respectivamente sobre larvas de una cepa susceptible (Media Joya) de *R. microplus*. Por su parte Pérez-González (2010), utilizando también TPL reportó que el LQM 938 a una concentración del 1% produjo porcentajes más bajos de mortalidad (entre el 35 y 94%) en larvas de la cepa resistente “San Alfonso” (Pérez-González, 2010) que los reportados en el presente estudio (100%) para el mismo carbamato. Los resultados de este estudio permitieron demostrar que los tres carbamatos evaluados tuvieron alta eficacia larvicida utilizando la TIL.

La TIL ofrece resultados que pueden ser comparados con los obtenidos mediante la TPL para el diagnósticos de resistencia (Alonso-Díaz *et al.*, 2006), La TPL consiste en colocar a las larvas en contacto por 24 horas con un papel filtro impregnado con el producto a probar, mientras que la TIL consiste en sumergir por 10 minutos a las larvas en una solución del producto a probar (Shaw, 1966). Tanto en la TPL en cepa susceptible reportada anteriormente por Prado-Ochoa *et al.* (2013) como en la TIL usada en este estudio, el LQM 938 al 1% tuvo una alta eficacia larvicida (100%), sin embargo, los carbamatos LQM 919 y LQM 996 al 1% mostraron alta eficacia larvicida en la TIL (ambos 100%) pero nula eficacia en la TPL (0.47% y 0% respectivamente). Lo anterior puede ser debido a varios factores, por ejemplo: la superficie de contacto de la larva con el carbamato en la TIL es mayor, aunque por menos tiempo que en la TPL debido a que las inmersiones cubren una mayor área de superficie de las larvas con los productos. Por otro lado, el vehículo utilizado en la TIL fue etanol mientras que en la TPL se utilizó tricloroetileno y aceite de oliva lo cual podría establecer diferencias en la absorción del carbamato. Estos resultados sugieren que la TIL es más sensible para medir la eficacia acaricida de los nuevos carbamatos y que el tipo de vehículo podría influir en la solubilidad de los productos y por lo tanto en su eficacia.

Las concentraciones letales (CL) son obtenidas mediante regresión lineal y nos indican la concentración calculada de alguna sustancia donde se espera que produzca un porcentaje determinado (50%, 90% o 99%) de mortalidad (NOM-006-ZOO-1993). La más utilizada para la determinación de las dosis de prueba de los productos es la CL que produce el 99% de mortalidad (CL₉₉). En este trabajo todos

los productos evaluados mostraron tener efectos concentración-dependiente (figura 7) por lo que se ajustaron al modelo matemático del análisis Probit y pudieron ser calculadas sus diferentes CL's. Las CL₉₉ obtenidas de los etil-carbamatos fueron: LQM 919 =0.6%, LQM 938 =0.43% y LQM 996 = 0.21%. Estas concentraciones fueron relativamente más altas que las concentraciones recomendadas de algunos acaricidas como el cumafós (0.02%), la flumetrina (0.004%) y el amitraz (0.015%) para cepas susceptibles (Foil *et al.*, 2004). Con respecto a este último, este estudio mostró que desde la concentración de 0.031% el amitraz ya no tuvo eficacia larvicida en la TIL (%MC = 0.3%) contra la cepa San Alfonso que es resistente a este acaricida. En contraste, los carbamatos LQM 919, LQM 938 y LQM 996 mostraron mayor eficacia que el amitraz a esta misma concentración (%MC = 32%, 28% y 36% respectivamente) y en el caso de los carbamatos LQM 938 y LQM 996 el efecto general de todas las concentraciones (figura 8) mostró mayores eficacias ($p < 0.01$) de estos dos carbamatos con respecto al amitraz. Mendes *et al.* (2013), utilizando la TIL reportaron para el amitraz un rango de CL₉₉ de 0.002% a 27% en 16 cepas brasileñas de *R. microplus* con diferentes rangos de resistencia, lo que indica que este producto puede no comportarse homogéneamente a la concentración recomendada contra cepas resistentes de *R. microplus*. Los resultados anteriores indican que, aun cuando sus CL₉₉ son relativamente altas, los tres carbamatos evaluados muestran mejor eficacia que el acaricida comercial amitraz contra una cepa triple resistente de *R. microplus*.

En el desarrollo de un nuevo fármaco se deben realizar escalonadamente diferentes tipos de estudios *in vitro* como son: pruebas de eficacia, pruebas de xenotoxicidad y pruebas de mutagenicidad además de estudios *in vivo* como son: pruebas de toxicidad en roedores, pruebas de teratogenicidad en roedores, pruebas de eficacia en infestaciones controladas en cámaras aisladas sobre la piel de bovinos y finalmente pruebas de eficacia en campo sobre animales con infestaciones naturales. En este contexto, es importante conocer la relación entre las concentraciones del fármaco que son eficaces *in vitro* y las concentraciones que son eficaces *in vivo*. Iturbe-Requena (2014), realizó estudios de los

carbamatos LQM 919 y LQM 996 en pruebas de cámaras en bovinos utilizando la misma cepa “San Alfonso” de este trabajo. La autora expuso por aspersión a concentraciones del 0.07% (0.668 mg/mL) y 0.06% (0.589 mg/mL) de cada carbamato respectivamente a diferentes estadios de *R. microplus* (larvas, ninfas y adultas) establecidos sobre la piel de bovinos. Las cámaras donde se expusieron fases larvarias a los carbamatos LQM 919 y LQM 996, se revisaron continuamente las cámaras y como resultado se obtuvo una reducción de la repleción de hembras en un 99.09% y 96.3% respectivamente, por lo que se dedujo que la gran mayoría de las larvas expuestas habían muerto.

Los resultados de este estudio mostraron que los carbamatos LQM 919, LQM 938 y LQM 996 a una concentración similar (0.063%) a las utilizadas por Iturbe-Requena (2014), produjeron %MC de 36.5%, 91.7% y 84.6% respectivamente, es decir, produjeron mortalidades más bajas que las observadas en los estudios *in vivo*. Lo anterior puede deberse a distintos factores, por ejemplo, diferencias en el vehículo utilizado (mencionado anteriormente) para disolver los carbamatos, en la prueba de cámaras se utilizó Dimetilsulfóxido (4%) y agua, lo cual pudo haber causado una mayor solubilidad y penetración de estos productos que cuando fueron disueltos en etanol para el ensayo *in vitro*. Otro factor a considerar, es que en la técnica de cámaras no es evaluada la mortalidad de larvas a las 24 horas pos-tratamiento como en la TIL, sino la ausencia de fases adultas repletas a los 21 días pos-tratamiento, en este sentido el mayor efecto *in vivo* pudo ser debido a un efecto larvicida producido por un mayor tiempo pos-exposición, o bien, porque los carbamatos pudieron provocar algún efecto sobre las larvas que impidieran o dificultaran su fijación o alimentación. A este respecto se debe mencionar que las larvas expuestas a los carbamatos en la TIL que se mantuvieron vivas, se notaron aletargadas y con menor desplazamiento que las larvas de los paquetes del testigo negativo. Futuros estudios en donde se profundice sobre el mecanismo de acción de cada uno de los carbamatos pueden aclarar esta cuestión.

Los resultados de un trabajo experimental pueden ser afectados por distintas variables indeseadas, es por ello que en los experimentos siempre se debe hacer uso de los grupos testigo. En el presente trabajo el etanol absoluto, usado como solvente y testigo negativo, produjo una mortalidad promedio del 14.6% similar a lo reportado por Gonçalves *et al.*, (2007) y los testigos de agua presentaron nula mortalidad. La utilización de la mortalidad corregida por el promedio del etanol (%MC) disminuye los efectos del solvente y refleja los resultados de manera más confiable. Los resultados de este trabajo utilizando una técnica diferente a las técnicas convencionales aprobadas por la FAO, permiten estimar el efecto larvicida de los carbamatos evaluados y compararlos con sus efectos *in vivo*, sus concentraciones letales indican que estos carbamatos podrían ser evaluados en pruebas de campo con buenas perspectivas para su uso acaricida.

CONCLUSIONES

- Se estandarizó óptimamente la TIL en el laboratorio y fue posible determinar una alta eficacia larvica de los carbamatos LQM 919, LQM 938 y LQM 996 sobre larvas de garrapata *R. microplus* de una cepa resistente a acaricidas convencionales (cepa “San Alfonso”).
- Las concentraciones letales de los etil-carbamatos obtenidas con la TIL fueron, del LQM 919: $CL_{50}= 0.063\%$ y $CL_{99}= 0.600\%$, del LQM 938: $CL_{50}= 0.044\%$ y $CL_{99}= 0.431\%$ y del LQM 996: $CL_{50}= 0.042\%$ y $CL_{99}= 0.210\%$.
- Los carbamatos LQM 938 y LQM 996 mostraron significativamente una mayor eficacia que el acaricida comercial amitraz contra una cepa triple resistente de *R. microplus*.
- Los resultados de la TIL muestran que es una técnica más sensible que la TPL para la evaluación de la eficacia larvica de los tres carbamatos evaluados. Los resultados de mortalidad y las CL's obtenidas permiten suponer que los tres carbamatos son candidatos para su evaluación en pruebas de campo.

REFERENCIAS

1. Abbott WS. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Econ Entomol* 1925;18:265-267.
2. Adams RH. *Veterinary pharmacology and therapeutics*. Iowa, USA: Blackwell Publishing, 2001.
3. Almazán C, Lagunes R, Villar M, Canales M, Rosario-Cruz R, Jongejan F, de la Fuente J. Identification and characterization of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* candidate protective antigens for the control of cattle tick infestations. *Parasitol Res* 2010;106(2):471-479.
4. 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(2):105-113.
5. Alonso-Díaz MA, López-Silva BJ, De Magalhães-Labarthe ACL, Rodríguez-Vivas RI. Infestación natural de hembras de *Boophilus microplus* Canestrini, 1887 (*Acarí: Ixodidae*) en dos genotipos de bovinos en el trópico húmedo de Veracruz, México. *Vet Méx* 2007;38(4):503-509.
6. Angeles E, Martinez P, Keller J, Martínez R, Rubio M, Ramírez G, Castillo R, López-Castañares R, Jiménez E. Ethyl and methylphenylcarbmates as antihelmintic agents: theoretical study for predicting their biological activity by PM3. *J Mol Struct THEOCHEM* 2000;504:141-170.
7. Asociación Veterinaria Británica Londres. *Manual veterinario de enfermedades tropicales*. México (D.F.): Pax-México, 1967.
8. Blanco-Martínez R, Cardona-Álvarez J, Vargas-Viloria M. Prevalencia de parásitos hematrópicos endoglobulares en bovinos gyr puros en Córdoba (Colombia). *Rev Med Vet* 2015;31:67-74.

9. Botana-López LM, Landoni MF, Martín-Jiménez T. Farmacología y terapéutica veterinaria. Madrid, España: McGraw-Hill/Interamericana, 2002.
10. Braga AGS, Lima RA, Celestino CO, Facundo VA. Tick *Rhipicephalus microplus* Canestrini: Biological, morphological and biological activity. REGET 2017;21(1):88-96.
11. Broglio-Micheletti SMF; Neves-Valente EC; De Souza LA; Da Silva-Dias N; Girón-Pérez K, Prêdes-Trindade RC. Control de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) con extractos vegetales. Rev Colomb Entomol 2009;35(2):145-149.
12. Bustillos R, Carrillo J, Jacho G, Enríquez S, Rodríguez R. Comportamiento poblacional de la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en bovinos en dos áreas geográficas del Ecuador. Rev Tecnológica ESPOL-RTE 2015;28(4):68-77.
13. Castro-Janer E, Rifran L, Piaggio J, Gil A, Miller RJ, Schumaker TT. *In vitro* tests to establish LC50 and discriminating concentrations for fipronil against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) and their standardization. Vet Parasitol 2009;162:120-128.
14. Castro-Janer E, Martins JR, Mendes MC, Namindome A, Klafke GM, Schumaker TT. Diagnoses of fipronil resistance in Brazilian cattle ticks (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) using *in vitro* larval bioassays. Vet Parasitol 2010;173(3-4):300-306.
15. Castro-Janer E, Rifran L, González P, Niell C, Piaggio J, Gil A, Schumaker TT. Determination of the susceptibility of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) to ivermectin and fipronil by Larval Immersion Test (LIT) in Uruguay. Vet Parasitol 2011;178(1-2):148-155.
16. CTA (Technical centre for agricultural and rural co-operation). Manual of tropical veterinary parasitology. UK: CAB International, 1989.

17. Cunha RC, Pérez de León AA, Leite FPL, Pinto LDS, Júnior AGS, Andreotti R. Bovine immunoprotection against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* with recombinant Bm86-Campo Grande antigen. *Rev Bras Parasitol Vet* 2012;21(3):254-262.
18. Cuore U, Solari MA, Trelles A. Situación de la resistencia y primer diagnóstico de poblaciones de garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* resistente a cinco principios activos en forma simultánea en Uruguay. *Vet (Montevideo)* 2017;53(205):13-19.
19. Dantas ACS, Freire DP, Souza GR, Almeida JRGS, Rolim LA, Castro RN, Horta MC. Acaricidal activity of leaves of *Morus nigra* against the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2017;69(3):523-528.
20. De Monteiro CM, Maturano R, Daemon E, Catunda-Junior FEA, Calmon F, de Souza Senra T, Faza A, de Carvalho MG. Acaricidal activity of eugenol on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) larvae. *Parasitol Res* 2012;111:1295–1300.
21. Domínguez-García DI; Rosario-Cruz R, Almazán-García C, Saltijeral-Oaxaca, JA; De la Fuente J; *Boophilus microplus*: Aspectos biológicos y moleculares de la resistencia a los acaricidas y su impacto en la salud animal". *Trop Subtrop Agroecosyst* 2010;12(2):181-192.
22. Durán N, Durán M, Souza CE. a Mini Review. *J Braz Chem Soc* 2017;28(6):927-932.
23. Fernandes EKK, Angelo IC, Rangel DEN, Bahiensea TC, Moraes AML, Roberts DW, Bittencourt VREP. An intensive search for promising fungal biological control agents of ticks, particularly *Rhipicephalus microplus*. *Vet Parasitol* 2011;182:307–318.

24. Fernández-Salas A, Rodríguez-Vivas RI, Alonso-Díaz MA. First report of a *Rhipicephalus microplus* tick population multi-resistant to acaricides and ivermectin in the Mexican tropics. *Vet Parasitol* 2012;183:338–342.
25. Ferrer A. Intoxicación por plaguicidas. *Anales Sis San Navarra* 2003;26(suppl 1):155-171.
26. Foil LD, Coleman P, Eisler M, Fragoso-Sánchez H, García-Vázquez Z, Guerrero FD, Jonsson NN, Langstaff IG, Li AY, Machila N. Factors that influence the prevalence of acaricide resistance and tick-borne diseases. *Vet Parasitol* 2004;125:163-181.
27. Fragoso H, Hoshman RP, Ortiz M, Rodríguez M, Redondo M, Herrera L, de la Fuente J. Protection against *Boophilus annulatus* infestations in cattle vaccinated with the *B. microplus* Bm86-containing vaccine Gavac. *Vaccine* 1998; 16(20):1990-1992.
28. Fukuto TR. Mechanism of Action of Organophosphorus and Carbamate Insecticides. *Environ Health Perspect* Vol 1990;87:245-254.
29. García-Corredor DJ, Rodríguez-Vivas RI, Pulido-Medellín MO, Díaz-Anaya AM, Andrade-Becerra RJ. Evaluación *in vitro* de *Cordyceps bassiana* (*Ascomycota: Sordariomycetes*) en el Control Biológico de *Rhipicephalus microplus*. *Rev Inv Vet Perú* 2016;27(1):130-136.
30. García-García JC, Montero C, Redondo M, Vargas M, Canales M, Boue O, Rodríguez M, Joglar M, Machado H, González IL, Valdés M, Méndez L, de la Fuente J. Control of ticks resistant to immunization with Bm86 in cattle vaccinated with the recombinant antigen Bm95 isolated from the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Vaccine* 2000;18:2275-2287.
31. Gassel M, Wolf C, Noack S, Williams H, Ilg T. The novel isoxazoline ectoparasiticide fluralaner: Selective inhibition of arthropod γ -aminobutyric

acid- and L-glutamate-gated chloride channels and insecticidal/acaricidal activity. *Insect Biochem Mol Biol* 2014;45:111-124.

32. Georgi JR. *Parasitología Animal*. México (D.F.): Interamericana, 1972.
33. Gonçalves K, Toigo E, Ascoli B, Von Poser G, Ribeiro VL. Effects of solvents and surfactant agents on the female and larvae of cattle tick *Boophilus microplus*. *Parasitol Res* 2007;100(6):1267-1270.
34. González-Sáenz Pardo JR, Hernández-Ortiz R. *Boophilus microplus*: estado actual de la resistencia a los acaricidas en la frontera México Estados Unidos y su impacto en la relación comercial. *Rev Mex Cienc Pecu* 2012;3(Suppl 1):1-8.
35. Helman MB. *Ganadería tropical*. Buenos Aires, Argentina: El Ateneo, 1977.
36. Ibarra VF, Vera MY, Alcalá CY. *Parasitología Veterinaria. Volumen I: Protozoarios*. México (D.F.): Acastdel, 2009.
37. Ibarra VF, Figueroa CJA, Quintero MMT. *Parasitología Veterinaria. Volumen III: Artrópodos*. México, (D.F.): Acastdel, 2012.
38. Iturbe-Requena SL. "Evaluación de la eficacia *in vivo* de dos carbamatos de nueva síntesis sobre *Rhipicephalus microplus*". (Tesis de Maestría en Ciencias). Cuautitlán Izcalli (Estado de México) México: UNAM, 2014.
39. Kemp DH, Pearson RD, Gough JM, Willadsen P. Vaccination against *Boophilus microplus*: localization of antigens on tick gut cells and their interaction with the host immune system. *Exp Appl Acarol* 1989;7:43-58.
40. Klafke GM, Sabatini GA, de Albuquerque TA, Martins JR, Kemp DH, Miller RJ, Schumaker TTS. Larval immersion tests with ivermectin in populations of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Acari: Ixodidae)* from State of Sao Paulo, Brazil. *Vet Parasitol* 2006;142:386–390.

41. López E, López G, Orduz S. Control de la garrapata *Boophilus microplus* con *Metarhizium anisopliae*, estudios de laboratorio y campo. Rev Colomb Entomol 2009;35(1):42-46.
42. Low VL, Tay ST, Kho KL, Koh FX, Tan TK, Lim YAL, Ong BL, Panchadcharam C, Norma-Rashid Y, Sofian-Azirun M. Molecular characterisation of the tick *Rhipicephalus microplus* in Malaysia: new insights into the cryptic diversity and distinct genetic assemblages throughout the world. Parasit Vector 2015;8:341.
43. McTier TL, Chubb N, Curtis MP, Hedges L, Inskeep GA, Knauer CS, Menon S, Mills B, Pullins A, Zinser E, Woods DJ, Meeus P. Discovery of sarolaner: A novel, orally administered, broad-spectrum, isoxazoline ectoparasiticide for dogs. Vet Parasitol 2016;222:3-11.
44. Mendes EC, Mendes MC, Sato ME. Diagnosis of amitraz resistance in Brazilian populations of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) with larval immersion test. Exp Appl Acarol 2013;61(3):357-369.
45. Mullen GR, Durden LA. Medical and Veterinary entomology. Second edition. USA: Elsevier, 2009.
46. NOM-006-ZOO-1993, Requisitos de efectividad biológica para los ixodídeos de uso en bovinos y método de prueba. Recuperado en Febrero de 2018 de <http://www.sagarpa.gob.mx/normateca>.
47. Ojeda-Chi MM, Rodríguez-Vivas RI, Galindo-Velasco E, Lezama-Gutiérrez R. Laboratory and field evaluation of *Metarhizium anisopliae* (*Deuteromycotina: Hyphomycetes*) for the control of *Rhipicephalus microplus* (*Acari: Ixodidae*) in the Mexican tropics. Vet Parasitol 2010;170:348–354.
48. Orihuela A, Vázquez-Prats V. Los parásitos y sus huéspedes, un enfoque etológico. México (D.F.): Limusa, 2009.

49. Pérez-Cogollo LC, Rodríguez-Vivas RI, Ramírez-Cruz GT, Rosado-Aguilar JA. Survey of *Rhipicephalus microplus* resistance to ivermectin at cattle farms with history of macrocyclic lactones use in Yucatán, México. *Vet Parasitol* 2010;172:109-113.
50. Pérez-González IE. “Evaluación *in vitro* del efecto de nuevos carbamatos sobre cepas de garrapatas del género *Boophilus sp.*, resistentes a ixodicidas”. (Tesis de Maestría en Ciencias), Cuautitlán Izcalli (Estado de México) México: UNAM, 2010.
51. Pérez-González IE, Prado-Ochoa MG, Muñoz-Guzmán MA, Vázquez-Valadez VH, Velázquez-Sánchez AM, Ávila-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* 2014;199:235–241.
52. Piper EK, Jackson LA, Bagnall NH, Kongsuwan KK, Lew AE, Jonsson NN. Gene expression in the skin of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle infested with the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Vet Immunol Immunopathol* 2008;126:110–119.
53. Polanco-Echeverry DN, Ríos-Osorio LA. Aspectos biológicos y ecológicos de las garrapatas duras. *Corpoica Cienc Tecnol Agropecuaria* 2016;17(1):81-95.
54. Prado-Ochoa MG. “Evaluación *in vitro* de la eficacia de nuevos carbamatos sobre garrapatas *Boophilus microplus*”. (Tesis de Maestría en Ciencias). Cuautitlán Izcalli (Estado de México) México: UNAM, 2009.
55. 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.

56. Prado-Ochoa MG, Ramírez-Noguera P, Díaz-Torres R, Garrido-Farina GI, 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 2014
- 57.;199:215–224.
58. Pulido-Villamarín AP, Castañeda-Salazar R, Ibarra-Ávila H, Gómez-Méndez LD, Barbosa-Buitrago AM. Microscopía y Principales Características Morfológicas de Algunos Ectoparásitos de Interés Veterinario. Rev Inv Vet Perú 2016;27(1):91-113.
59. Quiroz RH. Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos. México D.F.: Limusa, 2009.
60. Rebhun WC, Guard C, Richards CM. Enfermedades del ganado vacuno lechero. Zaragoza, España: Acribia S.A., 1999.
61. Reck Jr. J, Berger M, Terra RMS, Marks FS, da Silva Vaz Jr. I, Guimarães JA, Termignoni C. Systemic alterations of bovine hemostasis due to *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infestation. Res Vet Sci 2009;86:56–62.
62. Reviere JE, Papich MG. Veterinary Pharmacology and Therapeutics. 9 ed. EUA: Wiley-Blackwell, 2009.
63. Rodríguez M, Rubiera R, Penichet M, Montesinos R, Cremata J, Falcón V, Sánchez G, Bringas R, Cordovés C, Valdés M, Lleonart R, Herrera L, de la Fuente J. High level expression of the *B. microplus* Bm86 antigen in the yeast *Pichia pastoris* forming highly immunogenic particles for cattle. J of Biotech 1994;33:135-146.
64. Rodríguez M, Penichet ML, Mouris AE, Labarta V, Lorenzo Luaces L, Rubiera R, Cordovés C, Sánchez PA, Ramos E, Soto A, Canales M, Palenzuela D, Triguero A, Lleonart R, Herrera L, de la Fuente J. Control of

Boophilus microplus populations in grazing cattle vaccinated with a recombinant Bm86 antigen preparation. *Vet Parasitol* 1995;57:339-349.

65. Rodríguez-Vivas RI, Hodgkinson JE, Trees AJ. Resistencia a los acaricidas en *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: situación actual y mecanismos de resistencia. *Rev Mex Cienc Pecuarias* 2012;3(1):9-24.
66. Rodríguez-Vivas RI, Rosado-Aguilar JA, Ojeda-Chi MM, Pérez-Cogollo LC, Trinidad-Martínez I, Bolio-González ME. Control integrado de garrapatas en la ganadería bovina. *Ecosistemas y Recur Agropecuarios* 2014;1(3):295-308.
67. Rosa AB, Ribicich MM. *Parasitología y enfermedades parasitarias en veterinaria*. Buenos Aires, Argentina. Hemisferio Sur, 2012.
68. SAGARPA 2017. Recuperado en Junio de 2017, de <https://www.gob.mx/senasica/documentos/situacion-actual-del-control-de-la-garrapata-boophilus-spp>
69. Shaw, RD. Culture of an organophosphorus-resistant strain of *Boophilus microplus* (Can.) and an assessment of its resistance spectrum. *Bull Entomol Res* 1966;56(3):389-405.
70. Soulsby E.J.L. *Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos*. 7ma ed. México (D.F.): Interamericana, 1988.
71. Sumano LH, Ocampo CL, Gutiérrez OL. *Farmacología Veterinaria*. 4ta ed. México: Oralia Hernandez Argumedo, 2015.
72. Taylor MA. Recent Developments in Ectoparasitocides. *The Vet J* 2001;161:253–268.
73. Taylor MA, Coop RL, Wall RL. *Veterinary Parasitology*. 3ra ed. Inglaterra: Blackwell Publishing, 2007.

74. Urquhart GM, Armour J, Duncan JL, Dunn AM, Jennings FW. Parasitología Veterinaria. Zaragoza, España: Acribia S.A., 2001.
75. Wall R, Shearer D. Ectoparasitología Veterinaria Biología, patología y control. Zaragoza, España: Acribia S.A., 2010.
76. Williams RE. Veterinary entomology, livestock and companion animals. USA: CRC Press, 2010.
77. WingChing-Jones R. Extracción manual de garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en ganado bovino como estrategia de control. Nutr Anim Trop 2015;9(1):88-101.