



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCION Y DE LA SALUD ANIMAL

**“Determinación de la Máxima Dosis Tolerada e Índice de Seguridad
del compuesto ixodicida 712-BF-016 en el bovino”**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:
CARLOS ARMANDO SOLARES FLORES

TUTOR PRINCIPAL:
Dr. Froylán Ibarra Velarde
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, U.N.A.M.

COMITÉ TUTORAL:
Dra. María Teresa Quintero Martínez
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, U.N.A.M.

Dr. Pedro Mendoza De Gives
Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Parasitología
Veterinaria, INIFAP

México, D. F. Noviembre 2015



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.

DEDICATORIA

A mi Madre Teresa Flores y a mi Tío Carlos Flores por su cariño y apoyo siempre incondicional sobre todo durante los periodos más difíciles del desarrollo de este trabajo.

A los profesionales que con su dedicación contribuyen al bienestar animal.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco el apoyo brindado a la Universidad Nacional Autónoma de México, al personal de Posgrado de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por su valiosísima ayuda. A la Dra Clara Aguillón por su voto de confianza. Al CONACYT por el financiamiento otorgado.

Al Dr. Froylan Ibarra por su paciencia, confianza, enseñanzas y por permitirme la oportunidad de colaborar en su proyecto. Al Dr. Héctor Quiroz por sus consejos y guía en la conducción de esta investigación. A mi comité tutorial la Dra. María Teresa Quintero, el Dr. Pedro Mendoza y a la Dra. Vera Montenegro por sus valiosas observaciones que permitieron nutrir el presente trabajo. A la Dra. Irene Cruz, por sus comentarios y colaboración para el desarrollo de las pruebas de pre-formulación.

A mis profesores que contribuyeron de gran manera para mi formación profesional: el Dr. Daniel Díaz, el Dr. Gabriel Gutiérrez, la Dra. Tatiana Fiordelisis, el Dr. Héctor Sumano, el Dr. René Rosiles y la Dra. Sara Caballero.

Al Dr. Héctor Salgado, la Dra. María Elena Campos Aldrete y al personal de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas que me ayudaron a completar la etapa de formulación del compuesto experimental.

Al personal del Departamento de Parasitología y del CEIEPASP de la FMVZ por las facilidades otorgadas. A las vaquillas y becerras limousine por su colaboración para el desarrollo de las pruebas de campo.

A mis compañeros de aula Irais Granda, Samuel Ortega, Elizabeth Ramírez, Rosalba Lazcano y Arely Quezada; que me acompañaron dentro y fuera de la academia.

A mis amigos que siempre me motivaron a creer en mis ideas y me alentaron para desarrollar este trabajo.

RESUMEN

SOLARES FLORES CARLOS ARMANDO. Determinación de la Dosis Máxima Tolerada e Índice de Seguridad del compuesto Ixodicida 712-BF-016 en el Bovino (bajo la dirección de: Dr. Froylán Ibarra Velarde).

El compuesto 712-BF-016 tiene una eficacia ixodicida superior al 90% contra garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, de acuerdo con estudios previos que evaluaron el potencial *in vitro* de este compuesto. El presente estudio evaluó el efecto del compuesto experimental 712-BF-016 en el bovino con la finalidad de dilucidar la toxicidad con dosis superiores a la recomendada. Se preparó una formulación madre a partir de ingredientes con bajo grado de toxicidad y una alta adherencia al pelo de bovino (isopropanol, glicerina, tween 80, eumulgin y aceite mineral). A partir de la formulación madre, se obtuvieron 5 tratamientos a concentraciones de 20%, 24%, 28%, 32% y 36% con el compuesto 712-BF-016. Para la evaluación en campo se utilizaron 6 grupos con 3 novillas de la raza Limousine. Todos los animales recibieron un solo baño de aspersion y posterior al tratamiento se monitorearon las siguientes constantes fisiológicas: Temperatura, Frecuencia Cardíaca, Frecuencia Respiratoria y Movimientos Ruminales. Se registraron un total de 11 mediciones de cada constante fisiológica a lo largo de 3 días de estudio. El comportamiento de los animales fue monitoreado con la finalidad de apreciar signos clínicos de toxicidad aguda. Los promedios de cada grupo se graficaron para de cada una de las constantes fisiológicas y se compararon con los rangos de normalidad que reporta la literatura. No se observaron diferencias marcadas por fuera de los rangos de normalidad para cada una de las constantes fisiológicas, tampoco se observaron signos clínicos asociados a una toxicidad aguda. La dosis al 36% de concentración con el compuesto 712-BF-016 se determinó como la Dosis Máxima Tolerada. El índice de seguridad se calculó en 2.25.

Palabras clave: *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, Ixodicidas químicos, Toxicología.

ABSTRACT

Determination of the Maximum Tolerated Dose and Safety Index of the ixodicide compound 712-BF-016 in Cattle.

Solares F.C., Ibarra V.F.

1.- Programa de Maestría en Ciencia de la Producción y de la Salud Animal. UNAM-FMVZ. México.

2.- Departamento de Parasitología. UNAM-FMVZ. México.

The compound 712-BT-016 has an acaricide efficiency greater than 90% against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks, in agreement with previous studies that evaluated *in vitro* potential of this compound. The dose of the compound in which effects of toxicity are visible in animals remains unknown. This study evaluated the effect of the experimental compound 712-BF-016 in cattle in order to elucidate the toxicity of the compound above the recommended dose. A mother formulation was prepared from ingredients with low toxicity and high adhesion to the hair of bovine (isopropanol, glycerin, Tween 80, Eumulgin and mineral oil). From the mother formulation, 5 treatments at concentrations of 20%, 24%, 28%, 32% and 36% with compound 712-BF-016 were obtained. For the field evaluation 6 groups with 3 heifers from the Limousin breed were used. All animals received a single spray bath and after treatment the following physiological constants were monitored: temperature, heart rate, respiratory rate and ruminal movements. A total of 11 measurements for each physiological constant over 3 days of study were recorded. The behavior of animals was monitored in order to appreciate clinical signs of acute toxicity. The averages of each group were plotted for each of the physiological constants and compared with normal ranges reported by the literature. No differences were observed outside the normal range for each of the physiological constants, no clinical signs were observed associated with acute toxicity. The dose to 36% concentration with compound 712-BF-016 was determined as the maximum tolerated dose. The safety index was calculated at 2.25.

Keywords: *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, Chemical acaricides, Toxicology.

CONTENIDO

PÁGINA

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Garrapatas	1
1.2. <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	1
1.2.1. Características morfológicas	2
1.2.2. Ciclo biológico	3
1.2.3. Efectos causados al hospedador	3
1.2.4. Epidemiología	4
1.2.5. Impacto económico	5
1.3. La Ganadería Bovina en México	5
1.4. Control de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	6
1.4.1. Ixodicidas Químicos	7
1.4.1.1. Amidinas.....	7
1.4.1.2. Fenilpirazolonas	8
1.4.1.3. Organofosforados	8
1.4.1.4. Piretroides	8
1.4.1.5. Lactonas Macroclícas	9
1.4.1.6. Inhibidores del desarrollo.....	9
1.4.2. Métodos de aplicación de Ixodicidas	10
1.5. Resistencia a Ixodicidas	11
1.6. Desarrollo de Ixodicidas	11
1.7. Compuesto Experimental 712-BF-016.....	12
1.8. Justificación.....	14
1.9. Hipótesis	14
1.10. Objetivo General	14
1.10.1. Objetivos Específicos	14
2. MATERIALES Y MÉTODOS	16
2.1. Pre-formulación	16
2.1.1. Cromatografía en Placa Fina	16
2.1.2. Selección de Excipientes	18
2.2. Preparación de la Formulación.....	18
2.3. Preparación de Tratamientos	20
2.4. Fase Experimental	21
2.4.1. Lugar de Estudio	21
2.4.2. Animales y Grupos.....	21

2.4.3. Aplicación de Tratamientos	22
2.4.4. Monitoreo de Constantes Fisiológicas.....	22
2.4.5. Monitoreo Toxicológico	23
2.5. Estrategia de Análisis	24
3. RESULTADOS.....	25
3.1. Cromatografía en Placa Fina.....	25
3.2. Formulación	25
3.3. Análisis Post-Tratamiento.....	25
3.3.1. Monitoreo de Temperatura.....	26
3.3.2. Monitoreo de Frecuencia Cardíaca	27
3.3.3. Monitoreo de Frecuencia Respiratoria.....	30
3.3.4. Monitoreo de Movimientos Ruminales.....	31
3.3.5. Monitoreo de Signos Clínicos.....	33
3.4. Determinación de la Máxima Dosis Tolerada (MDT)	34
3.5. Cálculo del Índice de Seguridad	34
4. DISCUSIÓN.....	35
5. CONCLUSIÓN	40
6. REFERENCIAS	41

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Materiales empleados para la realización de la prueba de Cromatografía en Capa Fina	17
Cuadro 2. Materiales empleados para preparar la formulación del compuesto 712-BF-016.....	19
Cuadro 3. Valores Promedio, Varianza y Desviación Estándar para la constante de Temperatura.	26
Cuadro 4. Valores Promedio, Varianza y Desviación Estándar para la Constante de Frecuencia Cardíaca.....	28
Cuadro 5. Valores Promedio, Varianza y Desviación Estándar para la Constante de Frecuencia Respiratoria.....	30
Cuadro 6. Valores Promedio, Varianza y Desviación Estándar para la Constante de Movimientos Ruminales.....	32

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Monitoreo de Temperatura	27
Gráfica 2. Monitoreo de Frecuencia Cardíaca 1	29
Gráfica 3. Monitoreo de Frecuencia Cardíaca 2	29
Gráfica 4. Monitoreo de Frecuencia Respiratoria	31
Gráfica 5. Monitoreo de Movimientos Ruminales	33

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Garrapatas

Las garrapatas son ectoparásitos hematófagos que se alimentan de animales vertebrados. Se clasifican dentro del filo Arthropoda, especies caracterizadas por poseer un esqueleto externo, con un cuerpo segmentado y una cavidad corporal conocida como hemocele (Martínez, 2012). Se han identificado 896 especies de garrapatas que se agrupan en 3 familias (Guglielmone *et al.*, 2010). Las especies que tienen una importancia para la salud humana y animal pertenecen a las familias: Ixodidae y Argasidae (Domínguez-García *et al.*, 2010).

Las garrapatas Ixodidae constituyen alrededor del 80% del total de especies identificadas, se distinguen por poseer placas de quitina, lo cual brinda rigidez al exoesqueleto, por esta razón se les denomina como “garrapatas duras”. En México se han identificado al menos 77 especies de garrapatas, pero las de mayor importancia para la ganadería son: *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* y *Amblyomma cajennense* (Rodríguez-Vivas *et al.*, 1998).

1.2. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

La garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, tiene una estrecha relación filogenética con el género *Rhipicephalus*, razón por lo que se ha propuesto que las 5 especies agrupadas en el género *Boophilus* se clasifiquen en el género *Rhipicephalus*. Existe controversia en la comunidad científica respecto a esta clasificación, ya que las especies del género *Boophilus* mantienen diferencias biológicas respecto a las especies del género *Rhipicephalus*; sin embargo, existe una concordancia general para que la denominación de *Boophilus* permanezca como la de un subgénero de *Rhipicephalus* (Domínguez-García *et al.*, 2010). En el presente trabajo sólo se hace referencia a la especie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Con objetivos prácticos pero respetando la nomenclatura taxonómica se utilizará la abreviatura del género *Rhipicephalus* de la siguiente forma: *R. (Boophilus) microplus*.

Las garrapatas del *R. (Boophilus) microplus* cumplen su ciclo de vida en un solo hospedador. Se han reportado una amplia variedad de especies domésticas (equinos, caprinos, ovinos y caninos) y silvestres (ungulados) que pueden servir como hospedadores para *R. (Boophilus) microplus*, pero es en el ganado bovino donde esta especie se desarrolla abundantemente (Temeyer *et al.*, 2012).

La garrapata *R. (Boophilus) microplus* causa grandes pérdidas económicas para las producciones de ganado bovino, es por esto, que el control de las poblaciones de esta garrapata se ha convertido en una necesidad.

1.2.1. Características morfológicas

La garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tiene un cuerpo ovalado con apéndices segmentados (patas) distinguiéndose un dimorfismo sexual marcado. Las larvas tienen 3 pares de patas, mientras que en las ninfas y adultos se desarrollan 4 pares de patas. El tamaño va de 1mm a 12mm de longitud. La forma del cuerpo puede ser aplanada dorso-ventralmente (en ayuno) o globosa en la repleción. El color puede variar del amarillo al café oscuro. El cuerpo en su parte dorsal se compone de un escudo rígido quitinoso sin ornamentación, se observa completo en el macho e incompleto en la hembra (Bazan, 2002).

En la parte anterior del cuerpo se encuentra el gnatosoma; que es corto, recto y su base tiene forma hexagonal; de esta estructura se desprenden los quelíceros, estructura en forma de gancho que permiten cortar la piel del hospedador. En la base del gnatosoma se encuentra un órgano dentado (hipostoma) que permite perforar la piel y fijarse al hospedador. En ambos lados del hipostoma se encuentra un pedipalpo, estructura segmentada y con función sensorial (Bazan, 2002).

Detrás del último par de patas, se encuentra de cada lado, un espiráculo con forma ovalada (estructuras conectada al sistema traqueal) (Ibarra, 2012). *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* se diferencia de *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus*, por ostentar una espina caudal en el dorso y presentar dos espolones en la coxa I (Bazan, 2002).

1.2.2. Ciclo Biológico

El ciclo de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* comprende una fase de vida libre y otra en el hospedador (fase parasítica). La fase de vida libre comienza en el momento en que una hembra fecundada y repleta (teleogina) se desprende del hospedador para buscar un lugar donde ovipositar (pre-oviposición). Cabe señalar que para todas las fases del ciclo en vida libre, los rangos de tiempo en los que se completan, pueden acortarse o alargarse dependiendo de las variaciones en la temperatura y humedad del ambiente (Rodríguez *et al.*, 2011).

A partir del huevo eclosiona una larva, que se distingue por tener 3 pares de patas, la cual asciende por el pasto hasta los extremos de las hojas. La búsqueda del hospedador, se orienta con la ayuda de receptores que le permiten detectar el movimiento cuando un animal viable se aproxima (Rosario *et al.*, 2009).

La larva trepa al hospedador, busca un sitio de la piel con una buena vascularización sanguínea y se adhiere con el hipostoma para comenzar a alimentarse de sangre. Posteriormente, la larva se desprende de su exoesqueleto, proceso conocido como muda o ecdisis, dando origen a una ninfa, que ya presenta 4 pares de patas. La ninfa vuelve a fijarse al mismo hospedador, se alimenta y muda dando origen a una garrapata adulta (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2006).

El macho se alimenta y aparea, este proceso se repite hasta su muerte. La hembra (teleogina) se aparea, se alimenta hasta repletarse y se desprenderse del hospedador para buscar en el suelo un sitio húmedo y fuera del alcance de los rayos del sol para ovopositar (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2006).

El ciclo en el hospedador dura entre 18 a 22 días y la incubación dura al menos 14 días. Cada hembra puede ovopositar entre 2000 y 4500 huevos. El ciclo completo dura alrededor de los 2 meses (Ibarra, 2012).

1.2.3. Efectos causados al hospedador

El daño que genera la garrapata en el hospedador comienza en el sitio de adherencia a la piel, el hipostoma causa una lesión que se agrava con las sustancias cementantes que secreta la garrapata para fijarse (Nuñez *et al.*, 1985).

Este efecto traumático deteriora la piel de manera irreversible, ya que la lesión queda expuesta al exterior siendo proclive a la infección con bacterias y la formación de abscesos.

La gravedad de estos efectos se incrementa por el número de individuos presentes en la infestación, siendo una infestación grave cuando el número de hembras adultas que llegan a desarrollarse alcanza el centenar de individuos. Los sitios de adherencia en el ganado bovino, pueden distribuirse por diferentes zonas del cuerpo, principalmente: patas, flancos, cuello, lomo, cola, pliegues de extremidades, orejas y en el caso de hembras la glándula mamaria. Infestaciones severas pueden causar una pérdida de sangre suficiente como para generar anemia. La condición del animal puede empeorar por la inoculación de toxinas al torrente sanguíneo. La consecuencia de estos efectos provoca una disminución del apetito, lo cual se refleja en la disminución de la ganancia diaria de peso.

Debido al periodo de permanencia durante la alimentación, la garrapata juega un papel como potencial vector transmisor de microorganismos hemoparásitos causantes de graves enfermedades para el ganado. Se sabe que la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* puede transmitir la rickettsia *Anaplasma marginale*, los protozoarios *Babesia bigemina* y *Babesia bovis*, que infectan y destruyen los eritrocitos de la sangre (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2006).

1.2.4. Epidemiología

La presencia de la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* se extiende a lo largo de continentes como Oceanía, Asia, África y América. La distribución en el continente americano se extiende desde países sudamericanos como Uruguay, Argentina, Brasil, Colombia y Venezuela; hasta países de Norteamérica y el caribe como México, Cuba y los Estados Unidos de América.

La gran capacidad de adaptación de esta garrapata, le ha permitido colonizar regiones con climas tropicales y sub-tropicales; persistiendo en una gran diversidad de nichos ecológicos, principalmente en hábitats donde abunda el ganado bovino. Es por esta razón que cobra una relevancia sanitaria en países donde la producción de carne representa una actividad económica importante.

Su distribución en México se extiende a través de 1,043,772 Km² (53% del territorio nacional) (Rodríguez *et al.*, 2011).

1.2.5. Impacto Económico

Las infestaciones de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* representan uno de los principales problemas sanitarios y económicos que disminuyen la eficiencia productiva del ganado bovino en el mundo y en México.

El SENASICA-SAGARPA (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria) manifiesta que cada garrapata hembra puede causar una disminución de la ganancia de peso diaria en 0.6 g por animal (SENASICA, 2014). De esta pérdida, alrededor del 65% se debe a la inapetencia provocada en los animales infestados. Otros estudios mencionan que en zonas enzoóticas de garrapata, un bovino puede llegar a perder entre 40 y 60 kg de peso vivo al año (Rodríguez *et al.*, 2011).

Se han realizado estimaciones del verdadero impacto que implica la garrapata *R. microplus* en la producción. Se calcula que aproximadamente mil millones de bovinos en el mundo se encuentran en zonas de riesgo de ser afectados por las garrapatas. La FAO menciona que las pérdidas originadas por las garrapatas representan entre el 20% y 40% del total de la producción (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2006).

En México, se estima que alrededor de 1,425,000 hectáreas se encuentran infestadas por *R. (Boophilus) microplus* y las pérdidas generadas pueden rebasar los 48 millones de dólares al año (Rodríguez *et al.*, 2011).

1.3. La Ganadería Bovina en México

La ganadería, es la actividad que ocupa la mayor extensión de uso de suelo en México, se desarrolla en el 58% de la superficie del territorio nacional (113.8 millones de hectáreas). Los sistemas productivos de la ganadería varían de acuerdo al tipo de desarrollo tecnológico (tecnificado, semi-tecnificado), sistema de producción (estabulación, complementación y pastoreo) y tipo de ganado en crianza (carne, leche y pie de cría) (SAGARPA, 2012).

La ganadería bovina en México constituye una actividad económica importante, vinculada en gran medida con el consumo de insumos agrícolas. En el estado de Veracruz se estima que este tipo de ganadería genera 350 mil empleos directos e indirectos (Román, *et al.*, 2012).

El SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera) menciona que el hato ganadero en México para el año 2013 fue de 32,402,461 cabezas, siendo los principales estados productores: Veracruz, Jalisco y Chiapas (SIAP, 2015).

El hato bovino destinado para carne representa más del 90% del total de cabezas del hato ganadero nacional, el cual se divide de acuerdo a su finalidad como: carne para abasto, becerro para exportación y la producción de pie de cría. Los sistemas de crianza que predominan son el intensivo (engorda en corral) y el extensivo (engorda en praderas) (SIAP, 2014).

El 33 % de la producción de carne en México se localiza en las regiones áridas y semiáridas, regiones donde predominan razas europeas, cuyo mercado tradicional es la exportación hacia los Estados Unidos de América (SAGARPA, 2012). La región templada aporta el 31.6 %, donde predomina la cruce del ganado con razas europeas, bajo un sistema de crianza extensiva y suplementación en época de secas (SAGARPA, 2012).

Las regiones del trópico húmedo y seco, son las que tienen mayor aporte en la producción con el 35.4%; en estas regiones, predominan las cruces de razas cebuínas con razas europeas. Es en la región sureste del país, donde se ubica la mayor parte del inventario nacional y que provee una fuente considerable de becerros destinados para el abasto de carne en canal (SAGARPA, 2012).

1.4. Control de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

La base teórica para el control antiparasitario radica en interrumpir el ciclo biológico del parásito evitando que se generen nuevos individuos en la población. Para el control de las garrapatas, se emplean diversas estrategias para interrumpir el ciclo en la fase parasítica y no parasítica.

Las pérdidas económicas ocasionadas por *R. (Boophilus) microplus*, ha desencadenado que los sectores económicos afectados impulsen fuertes

campañas de erradicación y en las que se ha recurrido a diversas estrategias para el control de *R. (Boophilus) microplus*.

El control químico tiene una alta eficacia en reducir las poblaciones de garrapatas, pero como consecuencia al uso intensivo con estos compuestos, han emergido y proliferado poblaciones de garrapatas resistentes a los Ixodicidas.

1.4.1. Ixodicidas Químicos

La estrategia de control más ampliamente utilizada para interrumpir el ciclo de las garrapatas en la fase parasítica, consiste en el tratamiento con compuestos químicos que son letales para las garrapatas y que se conocen comúnmente como ixodicidas. Los ixodicidas reducen de manera sustancial la población ya que tienen un efecto letal en larvas y adultos.

Los ixodicidas son moléculas con capacidad de unión a las células del sistema de la garrapata, irrumpiendo la homeostasia, este proceso se conoce como mecanismo de acción. Los mecanismos de acción, se observan en diferentes blancos celulares, pero generalmente ejercen su efecto al nivel del Sistema Nervioso, modificando la actividad de conducción de los impulsos nerviosos en las uniones sinápticas donde se altera la acción de los neurotransmisores o el funcionamiento de los canales iónicos (Díaz, 2012). El efecto inducido es neurotóxico y letal en los ectoparásitos (Ojeda-Chi *et al.*, 2011).

Existen 6 grupos químicos de ixodicidas, que se utilizan para el control de las garrapatas en México. Los diferentes productos de cada grupo mantienen una relación en cuanto a las características moleculares y mecanismo de acción.

1.4.1.1. Amidinas

Ligeramente soluble en agua y soluble en solventes orgánicos. Su paso por el organismo pasa por una conversión a un metabolito denominado U-40481 o también conocido como BTS-27271. Se considera que imita la acción de la octopamina la cual regula el comportamiento de excitación del Sistema Nervioso Central, aunque su acción también actúa a nivel periférico. La acción de la octopamina es la unión a receptores que aumentan la cantidad de Monofosfato de Adenosina Cíclico (MFA), lo cual provoca una excitación nerviosa (Olivera, 2010).

Las amidinas interfieren en los procesos metabólicos de las garrapatas inhibiendo el sistema enzimático monoamino oxidasa. Se presenta una parálisis en la musculatura, incapacidad para ingerir las proteínas sanguíneas y un bloqueo en el desarrollo de los ovarios y finalmente la muerte. El compuesto de mayor uso es el amitraz (Olivera, 2010).

1.4.1.2. Fenilpirazolonas

Su mecanismo de acción es similar al de las avermectinas, ya que bloquea el paso de iones cloro a través del sistema receptor GABA. El Fipronil en su presentación “pour on”, permite que penetre la cutícula de los ectoparásitos.

1.4.1.3. Organofosforados

Los compuestos de este grupo se derivan del ácido fosfórico y se componen de un átomo de fósforo en el centro de la molécula. Son lipofílicos y pueden absorberse a través de la piel. Se acumulan en el tejido adiposo, permaneciendo en el organismo entre 4 y 8 días. Bloquean la actividad de la enzima acetilcolinesterasa mediante una reacción de fosforilación irreversible produciendo un aumento de la acetilcolina causando una tetanización y finalmente la muerte. Debido a su toxicidad, se recomienda utilizar equipo de protección durante su manipulación. Los organofosforados de mayor uso son: clorfenvinfos, clorpirifos, coumafos y diazinón (Olivera, 2010).

1.4.1.4. Piretroides

Sus efectos conocidos en insectos bloquean la actividad motriz, producen excitabilidad, incoordinación de movimientos, irritabilidad, parálisis, letargo y muerte. Su efecto residual es de aproximadamente 15 días. Los piretroides que se utilizan con mayor frecuencia son: cipermetrina, deltametrina y flumetrina (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2006).

1.4.1.5. Lactonas macrocíclicas

Se conocen dos grupos: las avermectinas y milbemicinas. Las principales avermectinas son: ivermectina, doramectina, abamectina y eprinomectina. Dentro del grupo de las milbemicinas se encuentra la moxidectina y milbemicina oxima. Se obtienen a partir de hongos del género *Streptomyces* (*S. avermitilis* y *S. cyaneogriseus*). Tiene un efecto endectocida, ya que actúa también contra endoparásitos. Son insolubles en agua y altamente liposolubles. En parásitos susceptibles las lactonas macrocíclicas se unen a receptores de glutamato ligado a canales de cloro, impidiendo el cierre de los canales, aumentando la permeabilidad de iones de cloro, esto genera una hiperpolarización de la membrana, cesando el estímulo nervioso, causando una parálisis flácida, desprendimiento del parásito y finalmente la muerte. El método más utilizado de aplicación son las inyecciones (Díaz, 2012).

1.4.1.6. Inhibidores del desarrollo

Esta clase de compuestos anti-parasíticos puede dividirse en 3 categorías de acuerdo a su modo de acción: análogos de hormonas juveniles, inhibidores de deposición o síntesis de quitina y derivados del compuesto orgánico de triazona, el cual interfiere en la generación de la pupa y evolución de los insectos (Costa *et al.*, 2015).

Para el uso en ganado, se ha desarrollado el fluazurón, compuesto que pertenece a la clase de benzoilfenilureas. Fue el primer producto registrado como regulador de crecimiento para el control de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. El fluazurón inhibe la síntesis de quitina de las garrapatas, posiblemente a través de la inhibición de enzimas específicas involucradas en el proceso de ecdisis, lo cual impide que se forme correctamente la cutícula del ectoparásito, La principal ruta de aplicación del fluazurón es la vía pour-on (Costa *et al.*, 2015).

La limitante de estos productos, es que las garrapatas tratadas no mueren al instante, ya que su efecto es reducir la capacidad reproductiva y por ende las poblaciones, efecto se observa de una manera gradual (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2006).

1.4.2. Métodos de aplicación de Ixodicidas

Existen diferentes presentaciones comerciales de ixodicidas, los cuales podrán aplicarse mediante diferentes métodos. De acuerdo con la vía de aplicación, se pueden clasificar como aquellos que se administran en el cuerpo del animal (baño, aspersion) y los que se administran de manera sistémica (inyección). Las presentaciones comerciales van desde las soluciones líquidas, polvos, soluciones concentradas que se absorben por medio de la piel (pour-on) y las que se colocan en el exterior de los animales (aretes).

El baño de inmersión consiste en sumergir al ganado y hacerlo pasar por depósitos de agua con soluciones, suspensiones o emulsiones de 7,000 litros a 10,000 litros. Este método permite el baño completo del cuerpo del animal y el contacto directo del ixodicida con la garrapata. La aspersion se utiliza cuando se requiere bañar pocos animales. La solución ixodicida se aplica por medio de una bomba aspersora. El tratamiento parenteral se aplica mediante inyecciones, es el método comúnmente utilizado para el tratamiento con endectocidas (lactonas macrocíclicas) por vía intramuscular o subcutánea. Los productos aplicados por este medio ejercen su efecto a largo plazo durante 30 días o más (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2011).

El tratamiento por derrame dorsal "pour on" o epicutáneo consiste en derramar el producto sobre la línea medial dorsal del bovino, desde la cruz hasta la base de la cola. El tratamiento por derrame dorsal "spot on" o transcutáneo es cuando el producto se coloca en un solo sitio del dorso del animal, las formulaciones ixodicidas actúan en las garrapatas por contacto y vapores. Los aretes y collares se elaboran con materiales como plástico o PVC y se encuentran impregnados con compuestos ixodicidas, esta vía permite la liberación paulatina y sostenida de la sustancia activa (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2011).

1.5. Resistencia a Ixodicidas

El control químico disminuye considerablemente la población de garrapatas, pero al uso irracional en la aplicación de los tratamientos y la capacidad de adaptabilidad de las garrapatas, han originado la aparición de poblaciones resistentes a la mayoría de los compuestos ixodicidas que se utilizan en la actualidad (organofosforados, piretroides, y lactonas macrocíclicas).

Desde el año 1981 se tiene conocimiento de la aparición de cepas resistentes de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* a organofosforados en México, a partir de estos reportes, se difundió el control a base de piretroides. Ocho años después del inicio del control con piretroides, se reportó la resistencia en *R. (Boophilus) microplus*. El establecimiento de la resistencia a organofosforados y piretroides promovió el uso de Amitraz, pero ya para el año 2001 se reportó por primera vez la resistencia en el estado de Tabasco. A partir de estos hallazgos, comenzaron a aparecer las evidencias de la aparición de cepas multi-resistentes, problema que se ha extendido a lo largo de todo México (Domínguez-García *et al.*, 2010). El incremento del problema de resistencia, ha incentivado la búsqueda de nuevos compuestos con potencial ixodicida.

1.6. Desarrollo de Ixodicidas

Como consecuencia al problema de la resistencia de las garrapatas a los ixodicidas, los sectores público y privado (gobierno federal, grupos de investigación, industria farmacéutica y productores de ganado), han promovido la búsqueda de blancos ixodicidas distintos a los conocidos actualmente con el consiguiente desarrollo de nuevos compuestos.

El desarrollo de un nuevo ixodicida sigue una ruta similar a la de la mayoría de los medicamentos. El diseño de nuevos compuestos permite descubrir moléculas con un potencial ixodicida. El desarrollo comprende la realización de pruebas pre-clínicas y clínicas.

Una vez conocida la dosis efectiva *in vitro* de un ixodicida experimental, deben evaluarse los efectos causados en animales mediante pruebas farmacológicas y

toxicológicas, así como, la concentración de residuos en tejidos y fluidos (NOM-006-ZOO-1993).

Las pruebas toxicológicas evalúan los efectos perjudiciales para un organismo vivo posterior a la exposición con una sustancia química. Dentro de la serie de pruebas toxicológicas se encuentran aquellas que monitorean los efectos durante las primeras horas posteriores a la aplicación o pruebas de toxicidad aguda. Estas pruebas permiten identificar la aparición de efectos adversos (signos clínicos), así como, conocer la cantidad en la que un ixodicida deja de tener un efecto benéfico y genera efectos tóxicos.

La finalidad de realizar pruebas toxicológicas en animales que se encuentran destinados para el consumo animal, es: evitar que los productos y subproductos de origen animal representen un riesgo sanitario para el humano garantizando la calidad e inocuidad de estos productos. La evidencia proveniente de las pruebas anteriormente señaladas, conforman parte de los requisitos necesarios para que los ixodicidas sean aprobados para permitir su registro, distribución y libre venta por parte de empresas farmacéuticas (NOM-006-ZOO-1993).

1.7. Compuesto experimental 712-BF-016

La investigación en el campo de nuevos ixodicidas, en la mayoría de los casos, sigue una ruta similar a la de un medicamento, es decir, que primero se busca una molécula con potencial ixodicida para realizar evaluaciones *in vitro* e *in vivo*. Un grupo interdisciplinario compuesto por investigadores del Departamento de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), del Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Química de la UNAM y del Departamento de Química Orgánica de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional (IPN); han colaborado en la selección, síntesis, formulación y evaluación biológica de diferentes moléculas con potencial ixodicida contra *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

El compuesto denominado 712-BF-016, es una molécula con propiedades ixodicidas, que posee las siguientes características fisicoquímicas: polvo blanco

cristalino, soluble en MeOH, EtOH, DMSO, C₆H₆, AcOET, Acetona, Tricloroetileno, ligeramente soluble en agua e insoluble en Et₂O (Éter dietílico); peso molecular de 223.66, con un punto de fusión de 48-50 °C; su fórmula química es C₁₀H₁₀ClN₃O (Santillán-Velazquez et al., 2013).

El compuesto 712-BF-016 demostró tener una alta eficacia ixodocida *in vitro* sobre larvas (91.1%) y adultos (97.65%) de *R. (Boophilus) microplus*. En pruebas realizadas con bovinos infestados con *R. (Boophilus) microplus*, se observó que puede reducir el porcentaje de ovoposición (50.1%) y eclosión de larvas (50.57%) (Santillán-Velazquez et al., 2013). Durante el transcurso de estos estudios se observó que las larvas tratadas con este compuesto presentaron una parálisis, que se describe similar como la presentada por la exposición a ixodocidas de la familia de los carbamatos (Santillán, 2013).

El compuesto 712-BF-016 es una molécula modificada a partir de otras dos moléculas: un imidazol y una piridina, de las cuales se han derivado estudios de efectividad contra diversos artrópodos e insectos (Santillán, 2013).

Las pruebas realizadas en bovinos, sugieren que el compuesto 712-BF-016 tiene un potencial promisorio para su desarrollo como ixodocida; sin embargo, las conclusiones generadas a partir de los resultados obtenidos en campo, han planteado interrogantes sobre la disminución de la efectividad en pruebas *in vivo*. Se cree que el vehículo adicionado a la formulación con el compuesto 712-BF-016, no fue el más adecuado y que la modificación en la composición de excipientes podría mejorar la eficacia ixodocida (Santillán, 2013).

En adición a lo anterior, existe poca información sobre el margen de seguridad con el que puede aplicarse el compuesto, así como los efectos adversos que el ganado podría presentar posterior al tratamiento. Para la obtención del margen de seguridad es necesario evaluar la respuesta del ganado a dosis superiores a la recomendada. La identificación de la Dosis Máxima Tolerada (DMT) permitiría calcular el Índice de Seguridad. Con el conocimiento de estos 2 indicadores es posible encontrar la dosis con mayor eficacia ixodocida y que no represente un riesgo de intoxicación para el ganado.

1.8. Justificación

Debido a la persistente problemática en el control de las poblaciones de garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* y del creciente número de reportes sobre el aumento de poblaciones resistentes a los ixodicidas que se encuentran disponibles en la actualidad, el desarrollo de ixodicidas con diferentes blancos terapéuticos, es de gran utilidad. Es por esto, que el desarrollo de estudios enfocados a la búsqueda de compuestos con una alta eficacia ixodicida y con menor grado de toxicidad para el ganado es tarea de diferentes grupos de investigadores.

El desarrollo de un nuevo ixodicida requiere que a lo largo de sus diferentes etapas, se someta a diferentes pruebas que validen su efectividad e inocuidad biológica. Estas evaluaciones son parte de la evidencia científica que establece el marco legal para determinar el registro, regulación y comercialización.

Las pruebas toxicológicas de compuestos ixodicidas, requieren evaluar la toxicidad en diferentes especies animales. La evaluación toxicológica en el bovino permitirá obtener información del Margen de Seguridad del compuesto 712-BF-016, derivado de los resultados de estas pruebas, es posible justificar la viabilidad para realizar estudios subsecuentes.

1.9. Hipótesis

El tratamiento con el compuesto 712-BF-016 a una concentración del 36% no causará signos de toxicidad aguda en los bovinos.

1.10. Objetivo General

Determinar la Dosis Máxima Tolerada (DMT) y el Índice de Seguridad del compuesto 712-BF-016 en ganado bovino.

1.10.1. Objetivos específicos

1. Evaluar y seleccionar los excipientes que integrarán la formulación con el compuesto 712-BF-016.

2. Preparar 5 tratamientos con las siguientes concentraciones del compuesto 712-BF-016: 20%, 24%, 28%, 32% y 36%.
3. Aplicar los tratamientos a grupos de 3 bovinos por medio de un baño de aspersión.
4. Registrar las constantes fisiológicas de cada animal a los siguientes intervalos de tiempo: 0 h, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 22 h, 24 h, 26 h, 46 h, 48 h y 50 h posteriores al tratamiento.
5. Monitorear los efectos posteriores al tratamiento en el ganado.
6. Analizar la respuesta a los tratamientos y comparar las diferencias con el grupo testigo.
7. Identificar el tratamiento en el cual los bovinos no muestren signos clínicos de toxicidad, para determinar la DMT del compuesto 712-BF-016.
8. Calcular a partir de la DMT y Dosis Efectiva, el Índice de Seguridad del compuesto 712-BF-016 en el ganado bovino.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. Pre-formulación

Una vez concluido el proceso de síntesis de la molécula 712-BF-016, en los laboratorios de investigación del Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, se obtuvieron 500 g del compuesto 712-BF-016 en polvo, que se almacenó en frascos de polietileno de alta densidad con liner sensitivo para cerrado hermético y se transportaron al Laboratorio de investigación del Departamento de Química Orgánica de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional.

2.1.1. Cromatografía en Placa Fina

Previo a la etapa de formulación se decidió evaluar la disponibilidad de compuesto 712-BF-016 presente en una formulación líquida que se utilizó con anterioridad en otros ensayos, esto con la finalidad de realizar la extracción del compuesto 712-BF-016 para utilizarlo en la formulación realizada en el presente trabajo. Para evaluar la disponibilidad del compuesto 712-BF-016 se decidió utilizar la prueba de cromatografía en capa fina.

La prueba de cromatografía en capa fina consiste en la visualización del movimiento de una sustancia en un medio sólido. La muestra a analizar se deposita en una fase estacionaria (placa), la cual se le adiciona un eluyente (mezcla de varios disolventes) que permite a la muestra desplazarse a través de la placa. Esta prueba, puede utilizarse de manera cualitativa para corroborar la presencia de una sustancia en un medio. Los materiales que se utilizaron se encuentran descritos en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Materiales empleados para la realización de la prueba de Cromatografía en Capa Fina.

• Placas con gel de sílice 2 x 6 cm	Compuesto 712-BF-016 en polvo (1 g)
• Encendedor de gas común	
• Capilar de vidrio de 15 cm	Eluyente
• Pinzas de disección	
• Pipetas de plástico	• Hexano (2 mL)
• Cámara de Elución	• Acetato de Etilo (3 mL)
• Lámpara UV	• Cloruro de Metileno (1 mL)
	• Isopropanol (2 mL)

La metodología que se utilizó, siguió las especificaciones señaladas en los manuales de procedimientos del Laboratorio de Química Orgánica de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN, la cual se basa a partir de la metodología descrita por Scott (2003). El método se describe a continuación:

1. Dilución de una muestra con el compuesto 712-BF-016 en polvo + Isopropanol.
2. Colocación de la muestra disuelta con ayuda del capilar en una placa de vidrio recubierta con gel sílice
3. Preparación del eluyente: Hexano + Acetato de Etilo + Cloruro de Metileno
4. Colocación del eluyente en la cámara de elución
5. Colocación de la placa en la cámara de elución por 5 minutos
6. Visualización de la placa con una lámpara fluorescente
7. El procedimiento se repitió hasta obtener una proporción ideal de los disolventes (eluyente) y que permitieran visualizar una buena movilidad del compuesto 712-BF-016 a través de la placa.

2.1.2. Selección de Excipientes

Previo a la formulación del compuesto experimental 716-BF-016 se consideró seleccionar los excipientes que incrementaran el rendimiento del compuesto posterior a la aspersión de los animales, por lo que se buscó obtener una formulación con las siguientes características:

1. Mayor protección de la molécula ante la exposición medioambiental.
2. Mayor adherencia al pelo.
3. Menor pérdida al deslavado por medio de sustancias acuosas.
4. Excipientes con bajo grado de toxicidad.

Se escogió el método de emulsificación para obtener una suspensión coloidal de dos fases.

Para evaluar el rendimiento de las formulaciones con diferentes excipientes se realizaron ensayos con ratas de la cepa Wistar, a las que se aplicaron diferentes formulaciones en el pelo del dorso. La determinación final de la proporción de excipientes, se realizó a partir de los resultados obtenidos en ensayos con pieles del cuello de bovinos obtenidos del rastro (Trabajo no publicado). El resultado de los ensayos anteriormente señalados permitió seleccionar la siguiente combinación de excipientes para constituir la formulación con el compuesto 712-BF-016: Isopropanol, Glicerina, Tween 80, Aceite Mineral, Eumulgin y H₂O.

2.2. Preparación de la Formulación

Se prepararon dos formulaciones: una formulación ixodicida con el compuesto 712-BF-016 y una formulación testigo. A la formulación testigo se le sustituyó la proporción del compuesto 712-BF-016 con H₂O. Los materiales empleados para constituir la formulación del compuesto 712-BF-016 se encuentran descritos en el cuadro 2.

Cuadro 2. Materiales empleados para preparar la formulación del compuesto 712-BF-016	
Materiales	Formulación
<ul style="list-style-type: none"> • Báscula • Pipetas graduadas • Pro-pipeta • Probetas graduadas • Vasos de precipitados • Matraces Erlenmeyer • Agitador magnético • Bala magnética 	<ul style="list-style-type: none"> • Compuesto 712-BF-016 en polvo <p style="text-align: center;">Excipientes:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Isopropanol • Glicerina • Tween 80 (Polisorbato 80) • Eumulgin • Aceite Mineral • H₂O

La preparación de la formulación se realizó con la mezcla de los excipientes en dos fases:

1. Fase acuosa:

- a. Pesado del compuesto 712-BF-016 y medición de Isopropanol, Glicerol, Tween 80 y H₂O.
- b. Adición del compuesto 712-BF-016 con el Isopropanol y mezclado con ayuda de la bala magnética y agitador magnético hasta disolver.
- c. Adición de Glicerol a la mezcla del compuesto 712-BF-016 + Isopropanol, se mezcló hasta homogeneizar.
- d. Adición de Tween 80 a la mezcla del compuesto 712-BF-016 + Isopropanol + Glicerol, se mezcló hasta homogeneizar.
- e. Adición de H₂O a la mezcla del compuesto 712-BF-016 + Isopropanol + Glicerol + Tween 80, hasta aforar a un volumen de 1.5 litros, se mezcló hasta homogeneizar.

2. Fase oleosa:

- a. Medición de Aceite Mineral y Eumulgin.
- b. Adición de Eumulgin al Aceite Mineral, se mezcló hasta homogeneizar.

La fase acuosa se mantuvo en constante movimiento para después adicionar lentamente la fase oleosa. Una vez homogeneizada la preparación, se vertió en un recipiente de plástico de 4 litros y se etiquetó para su identificación.

2.3. Preparación de Tratamientos

Una vez obtenida la formulación con el compuesto 712-BF-016 y los excipientes, el recipiente fue transportado al Laboratorio de investigación del Departamento de Parasitología de la FMVZ-UNAM.

Los materiales que se utilizaron para la preparación de las formulaciones y su almacenaje fueron: guantes de vicryl, pipeta graduada de 5 mL, pro-pipeta, probeta graduada de 50 mL y recipientes de plástico de 1 litro.

Se prepararon 5 tratamientos con concentraciones del compuesto 712-BF-016 al 20%, 24%, 28%, 32% y 36%. El porcentaje se expresa de acuerdo a la cantidad en gramos de sustancia activa disuelta en el vehículo a 100 mL. El cálculo de la dosis se realizó de acuerdo con las indicaciones mencionadas por Olivera (2010) para la preparación de tratamientos por baño de aspersion con el ixodicida experimental Tlalaxin (Cipermetrina al 16%). La dosificación indica 20 mL de formulación para preparar 10 L. El cálculo anterior se utilizó previamente en la preparación de tratamientos por baño de aspersion para evaluar de la efectividad ixodicida del compuesto experimental 712-BF-016 en bovinos infestados con garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Santillan, 2013).

Para el cálculo de la cantidad necesaria a extraer de la formulación al 20%, se consideró preparar un volumen de 3 litros para cada animal, de acuerdo con la experiencia previa en campo, ya que se observó una pérdida considerable del compuesto a una cantidad de 4 L. Se preparó un volumen total de 10 L para cada grupo con la finalidad de que no faltara solución durante el baño de aspersion.

Una vez conocidas las cantidades necesarias, éstas se tomaron a partir de la formulación madre y se vertieron en recipientes de plástico de un litro. Los recipientes se etiquetaron y almacenaron para su transporte.

2.4. Fase Experimental

2.4.1. Lugar de Estudio

La aplicación de tratamientos y monitoreo posterior se realizó en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Agrosilvopastoril (CEIEPASP) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) ubicado en el Municipio de Chapa de Mota, Estado de México. El municipio se ubica al noroeste del Estado de México, colinda al norte con los municipios de Jilotepec y Villa del Carbón, al sur con el municipio de Morelos, al este con Villa del Carbón y al oeste con Timilpan. Se localiza en las coordenadas geográficas entre los paralelos 19° 43' y 19° 55' de latitud norte; los meridianos 99° 25' y 99° 41' de longitud oeste. La altitud es de 2,750 msnm. El clima de la región es templado subhúmedo: presenta temperaturas extremas en invierno y principios de primavera (temperaturas mínimas de hasta -14°C y máximas de hasta 40°C). Régimen pluvial de Primavera-Verano con promedios de 1100 mm anuales. Las heladas comienzan en octubre y finalizan en la primera quincena de abril (FMVZ, 2012).

2.4.2. Animales y Grupos

Se utilizaron 18 bovinos hembra de raza Limousin con edades entre 6 meses y 11 años. Los animales se mantuvieron bajo un sistema agrosilvopastoril (pastoreo extensivo). El ganado lo conformaron hembras con sus crías y un macho semental. La alimentación de los animales consistió en mayor parte de pastos nativos con la suplementación por la tarde con paja de avena y melaza.

Los bovinos se dividieron en 6 grupos de 3 bovinos cada uno (G1, G2, G3, G4, G5 y Testigo). La formación de los grupos se hizo por selección al azar el mismo día en el que se aplicaron los tratamientos. Para el levantamiento de la información se diseñaron formatos de registro individuales.

2.4.3. Aplicación de Tratamientos

Los bovinos recibieron un baño de aspersión de acuerdo al grupo y tratamiento en el siguiente orden: G1=20%, G2=24%, G3=28%, G4=32% y G5=36%. El grupo testigo (GT) recibió un tratamiento con una formulación preparada con la mezcla de excipientes pero el contenido del compuesto 712-BF-016 se sustituyó con H₂O.

Para la administración de los baños, se utilizó una bomba de aspersión marca Olinko con una capacidad de 15 litros. La bomba se enjuagó con agua y se purgó antes de cargar los tratamientos. Cada tratamiento se vació en la bomba y se diluyó con agua hasta obtener un volumen total de 10 litros. Una vez cargada la bomba se agitó para homogeneizar el contenido. Los tratamientos para cada grupo se prepararon y se aplicaron siguiendo un orden cronológico ascendente en cuanto a concentración de tratamiento: testigo, 20%, 24%, 28%, 32% y finalmente 36%.

Previo a la aplicación del baño de aspersión, y como medida de seguridad, se colocó equipo de protección personal, que consistió en: overol, gorra, mascarilla buco-nasal, gafas de policarbonato, mandil, guantes y botas de hule.

Una vez colocado el equipo de protección, se procedió a aplicar un baño de aspersión por todo el cuerpo de cada animal de la siguiente manera: se comenzó por el dorso siguiendo por los flancos, desde el cuello hasta la cola, descubriendo la base de la cola, los pliegues de las extremidades anteriores y posteriores, el pecho, región abdominal, la glándula mamaria, región inguinal y finalmente las patas. Cada animal recibió un baño con un volumen aproximado de 3 litros de acuerdo con las cantidades mínimas recomendadas en el manual técnico para el control de garrapatas en el ganado bovino (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2006).

2.4.4. Monitoreo de Constantes Fisiológicas

Se tomaron las siguientes constantes fisiológicas: Temperatura, Frecuencia Cardíaca, Frecuencia Respiratoria y Movimientos Ruminales. El procedimiento se siguió a partir de la metodología descrita por Cano en el Manual de Prácticas de Clínica de los Bovinos I de la FMVZ-UNAM.

Para la toma de Frecuencia Cardíaca, Frecuencia Respiratoria y Movimientos Ruminales se utilizó un estetoscopio cardiológico Master Cardiology de Medimetrics.

Para realizar el conteo de los latidos cardíacos y respiraciones se utilizó la aplicación Metrónomo para Smartphone, la cual realiza el cálculo de la frecuencia de las pulsaciones por minuto.

En el caso de los Movimientos Ruminales el tiempo se tomó con una aplicación de cronómetro para Smartphone. La temperatura se tomó con la ayuda de un termómetro digital marca Neutek.

El monitoreo se realizó durante 3 días y las mediciones se tomaron entre las 8AM y 6PM. La primera medición se realizó previa a la aplicación del tratamiento específico para cada grupo. Posterior a la aplicación del baño de aspersión, las mediciones se tomaron en los siguientes intervalos de tiempo: 0 h, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 22 h, 24 h, 26 h, 46 h, 48 h y 50 h. Los intervalos de tiempo en el que se tomaron las mediciones se determinaron en base a la observación de los signos y síntomas clínicos asociados a una intoxicación aguda con compuestos organofosforados donde los efectos observables (síndrome colinérgico) se aprecian durante las primeras 12 horas post-tratamiento. El monitoreo se prolongó hasta el tercer día post-tratamiento para evaluar la evolución y posible aparición de un síndrome intermedio, el cual se hace aparente entre las 24 y 48 horas post-tratamiento (Fernández *et al.*, 2010).

2.4.5. Monitoreo Toxicológico:

El seguimiento de la evaluación toxicológica se realizó con la inspección física de los animales en el momento que se tomaron las constantes fisiológicas. Para la evaluación toxicológica, los animales se monitorearon posteriormente a la aplicación de los tratamientos poniendo especial atención a la aparición de signos asociados a una intoxicación con ixodicidas, signos clínicos como: ptialismo, epífora, incoordinación motora, nerviosismo, hiperactividad, agresividad y postración. Además se monitoreó el comportamiento y la apetencia al alimento durante los 3 días del estudio. Para la evaluación de la gravedad y evolución de

signos clínicos asociados a una intoxicación se utilizó una escala de severidad de intoxicación (Poisoning Severity Score), la cual, clasifica de manera cualitativa los signos en los siguientes grados: Nula (sin signos vinculables a intoxicación), Leve (sintomatología leve, transitoria, de resolución espontánea), Moderada (sintomatología marcada o persistente), Severa (sintomatología severa o de riesgo vital) y Fatal (Muerte) (WHO, 2015).

2.5. Estrategia de Análisis

Las mediciones obtenidas durante los 3 días de estudio de campo, se capturaron en una base de datos del programa Excel. Se elaboraron gráficas y cuadros que muestran las variaciones de los promedios de cada grupo para cada constante fisiológica durante el tiempo que duró el estudio. Los datos obtenidos se analizaron comparando las respuestas al tratamiento con el grupo testigo.

Como resultado del análisis se determinó el tratamiento con la dosis más alta en la cual no se observaron diferencias con respecto al grupo testigo ni signos asociados a toxicidad como la Dosis Máxima Tolerada (DMT). El Índice de Seguridad se obtuvo como resultado del cociente de la DMT entre la dosis clínica recomendada.

3. RESULTADOS

3.1. Cromatografía en Placa Fina

El eluyente que demostró obtener la mejor movilidad del compuesto 712-BF-016 a través de la fase estacionaria, se conformó con las siguientes proporciones de disolventes: 2 mL de Hexano, 3 mL de Acetato de Etilo y 1 mL de Cloruro de Metileno para 1g de compuesto 712-BF-016.

La exposición de la placa a la luz ultravioleta reveló una línea que corresponde al desplazamiento de la muestra en polvo del compuesto 712-BF-016 a lo largo de la placa. En la evaluación de las formulaciones líquidas no se observó la presencia de líneas en las placas, lo cual indica la ausencia del compuesto en estas formulaciones.

3.2. Formulación

Los excipientes seleccionados para preparar la formulación fueron: Isopropanol, Glicerina, Tween 80, Aceite Mineral, Eumulgin y H₂O.

Se obtuvo una formulación oleosa en un sistema bifásico con el compuesto 712-BF-016. Se preparó un volumen de 3 litros con las siguientes cantidades: 200 g de 712-BF-016 + 250 mL de Isopropanol + 342 mL Glicerol + 286 mL de Tween 80 + 422 mL de H₂O + 1312 mL de aceite mineral + 188 mL de Eumulgin.

La formulación testigo se preparó a un volumen de 1 litro con la misma proporción a la que se preparó la formulación madre, pero el contenido de BF se sustituyó con H₂O. La formulación testigo se compuso de las siguientes cantidades: 0 g de 712-BF-016 + 83.33 mL de Isopropanol + 114 mL Glicerol + 95.33 mL de Tween 80 + 207.34 mL de H₂O + 437.33 mL de aceite mineral + 62.67 mL de Eumulgin.

3.3. Análisis Post-tratamiento

Se registraron 11 mediciones para cada una de las constantes fisiológicas, la primera antes de recibir el tratamiento y posterior a la aplicación de cada tratamiento a los siguientes intervalos de tiempo: 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 22 h, 24 h, 26

h, 46 h, 48 h y 50 h. El registro se capturó en una base de datos del programa Excel. Se calcularon los valores promedio, varianza y desviación estándar. Estos valores se pueden apreciar en los Cuadros 3 – 7.

Con los valores promedio se graficaron las variaciones para cada uno de los grupos a lo largo del tiempo. Además del registro calculado para el grupo testigo (GT), se consideró agregar a cada gráfica el rango de normalidad reportado en la literatura. Se agregaron los rangos de normalidad tanto para becerros como para bovinos adultos (Gasqué, 2008). Las gráficas del monitoreo de las constantes fisiológicas de Temperatura, Frecuencia Cardíaca, Frecuencia Respiratoria y Movimientos Ruminales se muestran en las Gráficas 1 - 5.

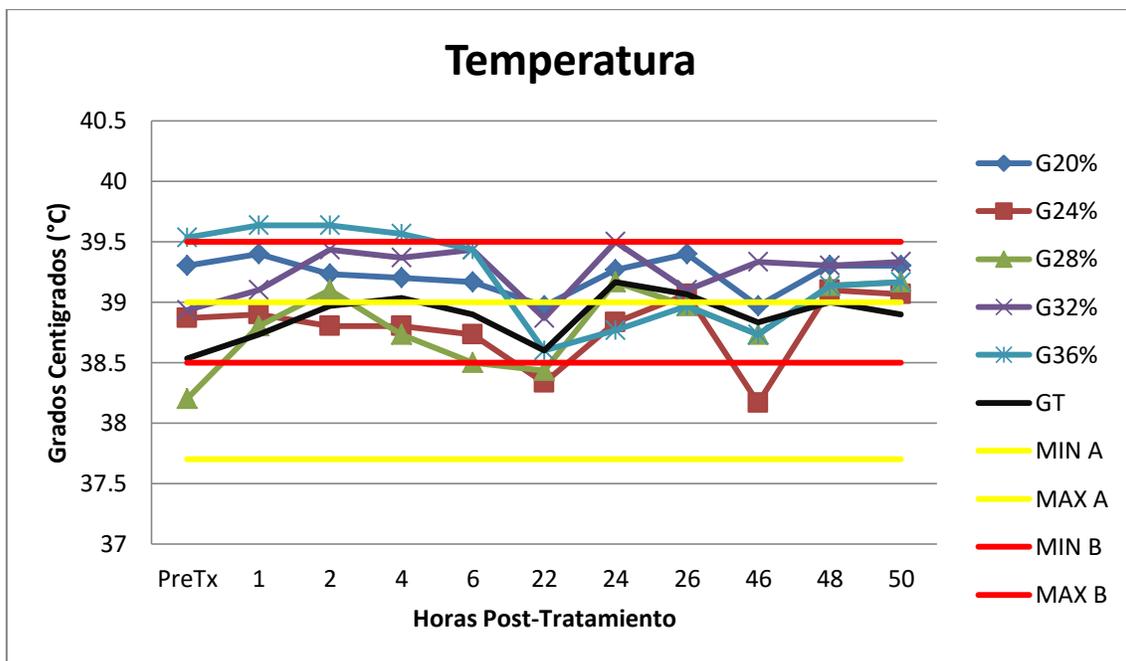
3.3.1. Monitoreo de Temperatura

Para la constante fisiológica de Temperatura, no se observaron grandes variaciones con respecto al promedio de todas las mediciones (39.03 °C), observándose una desviación estándar de ± 0.40 °C. El promedio de todas las mediciones del Grupo Testigo (GT) fue de 38.88 °C y el promedio de las mediciones pre-tratamiento de todos los grupos fue de 38.89 °C (Cuadro 3).

Cuadro 3. Valores Promedio, Varianza y Desviación Estándar para la Constante de Temperatura.										
Medición	Hora	G1 (G20%)	G2 (G24%)	G3 (G28%)	G4 (G32%)	G5 (G36%)	GT	PROM Hora	VAR Hora	DESV-E Hora
1	Pre-Tx	39.30	38.87	38.20	38.93	39.53	38.53	38.89	0.26	0.51
2	1	39.40	38.90	38.80	39.10	39.63	38.73	39.09	0.15	0.39
3	2	39.23	38.80	39.10	39.43	39.63	38.97	39.19	0.11	0.34
4	4	39.20	38.80	38.73	39.37	39.57	39.03	39.12	0.13	0.37
5	6	39.17	38.73	38.50	39.43	39.43	38.90	39.03	0.18	0.42
6	22	38.97	38.33	38.43	38.87	38.60	38.60	38.63	0.20	0.45
7	24	39.27	38.83	39.17	39.50	38.77	39.17	39.12	0.13	0.36
8	26	39.40	39.07	38.97	39.10	38.97	39.07	39.09	0.07	0.26
9	46	38.97	38.17	38.73	39.33	38.73	38.83	38.79	0.20	0.45
10	48	39.30	39.10	39.13	39.30	39.13	39.00	39.16	0.06	0.24
11	50	39.30	39.07	39.17	39.33	39.17	38.90	39.16	0.08	0.27
PROM G		39.23	38.79	38.81	39.25	39.20	38.88	PROM GG = 39.03		
VAR G		0.04	0.18	0.15	0.13	0.18	0.08	VAR GG = 0.16		
DESV-E G		0.19	0.43	0.39	0.36	0.42	0.28	DESV-E GG = 0.40		

En la Gráfica 1 se muestra la variación de los promedios calculados por cada grupo para las constante de Temperatura, donde se observan valores ligeramente por encima de los rangos de normalidad en el grupo 5 (G36%), sin embargo a partir de la hora 22 las mediciones se mantuvieron dentro del rango de normalidad para becerros (38.5 °C – 39.5 °C).

En general los promedios se observaron dentro del rango de normalidad para becerros y cercanos al rango superior del rango de normalidad para bovinos adultos (37.7 °C – 39 °C). Los promedios del Grupo Testigo (GT) se encontraron dentro del rango de normalidad para becerros. Se observaron promedios por debajo del rango de normalidad para becerros en: el grupo 3 (G28%), antes del tratamiento y a la hora 22; al igual que para el grupo 2 (G24%) a la hora 22 y 46.



Gráfica 1. Monitoreo de Temperatura (Promedios de Grupos)

MIN A y MAX A = Valores Mínimos y Máximos para Adultos;
 MIN B y MAX B = Valores Mínimos y Máximos para Becerros (Gasqué, 2008).

3.3.2. Monitoreo de Frecuencia Cardíaca

En el Cuadro 4 se muestran los valores calculados para la constante de Frecuencia Cardíaca. Se observan variaciones entre los promedios de grupos con respecto al promedio general el cual fue de 60.10 Latidos por Minuto (LPM). Los

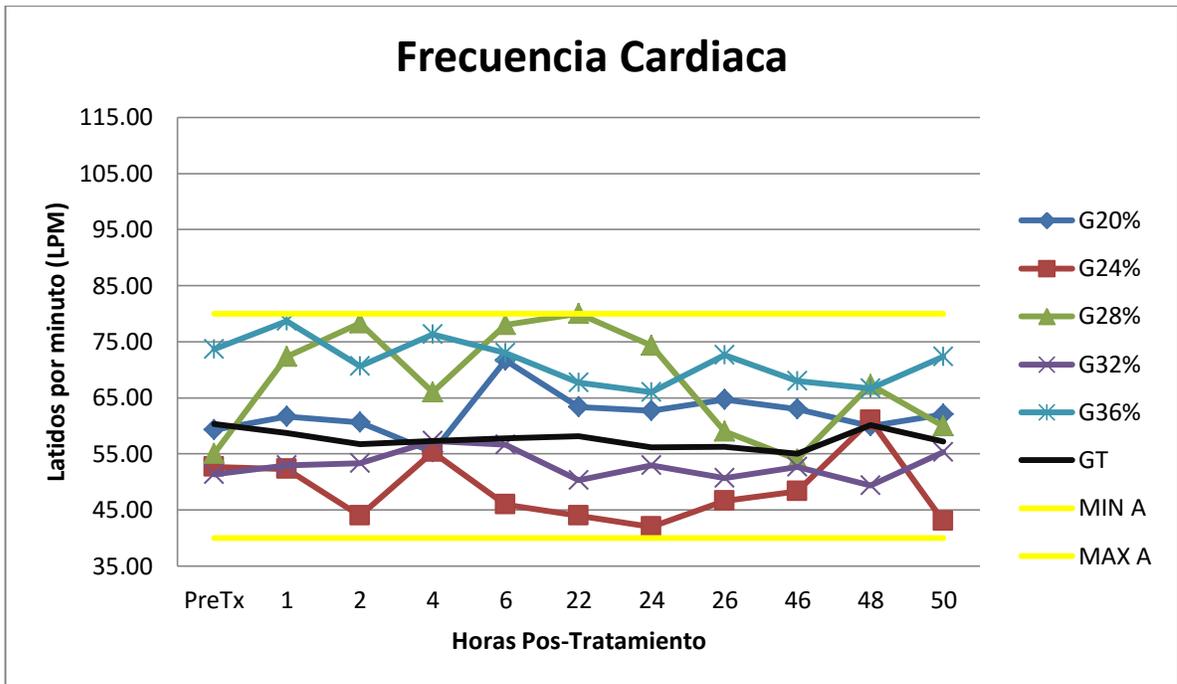
promedios de los grupos 2 (G24%) y 4 (G32%) se mantuvieron por debajo del promedio del Grupo Testigo (GT) el cual fue de 57.64 LPM. El grupo con menor promedio se observó para el Grupo 2 (G24%) con 48.67 LPM mientras que el Grupo 5 (G36%) obtuvo un promedio de 71.42 LPM.

Todos los promedios se encontraron dentro del rango de normalidad que reporta la literatura para bovinos adultos (40 LPM y 80 LPM). Los promedios del Grupo Testigo (57.64 LPM), promedio de grupos pre-tratamiento (58.73 LPM) y promedio general (60.1 LPM) obtuvieron valores similares valores. La desviación estándar de todas las mediciones fue de ± 12.93 LPM con respecto al promedio.

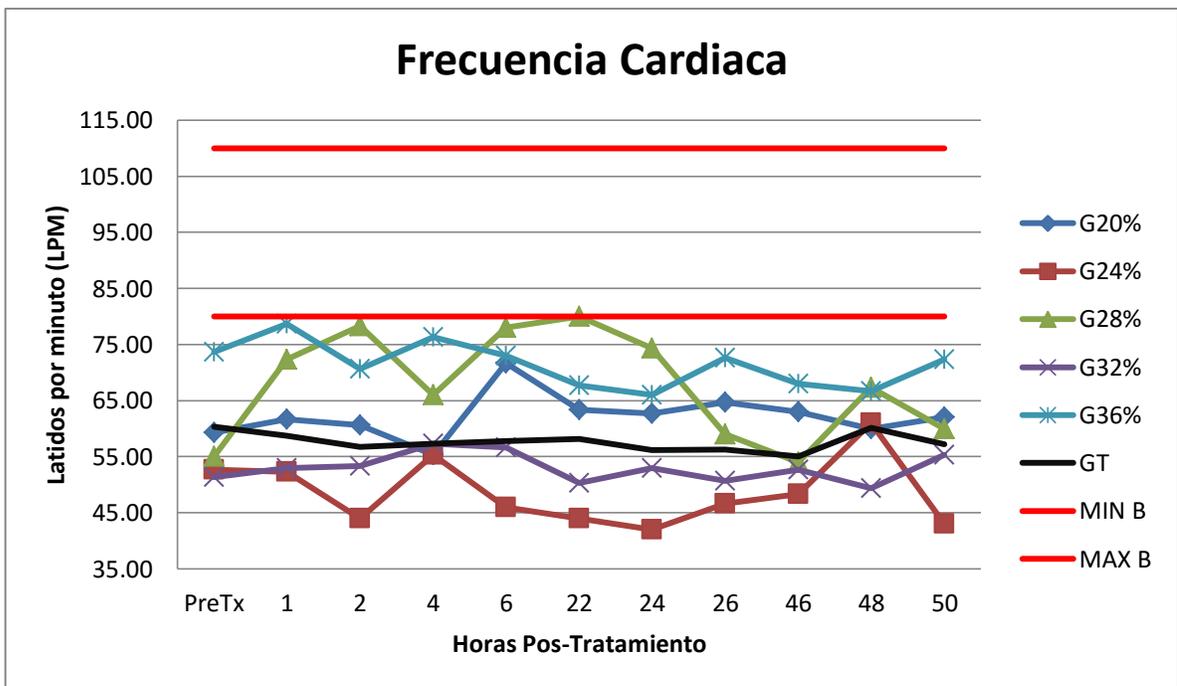
Cuadro 4. Valores Promedio, Varianza y Desviación Estándar para la Constante de Frecuencia Cardíaca.

Medición	Hora	G1 (G20%)	G2 (G24%)	G3 (G28%)	G4 (G32%)	G5 (G36%)	GT	PROM Hora	VAR Hora	DESV-E Hora
1	Pre-Tx	59.33	52.67	55.00	51.33	73.67	60.35	58.73	146.82	12.12
2	1	61.67	52.33	72.33	53.00	78.67	58.72	62.79	127.31	11.28
3	2	60.67	44.00	78.33	53.33	70.67	56.72	60.62	179.24	13.39
4	4	55.33	55.33	66.00	57.33	76.33	57.30	61.27	157.43	12.55
5	6	71.67	46.00	78.00	56.67	73.00	57.80	63.85	266.54	16.33
6	22	63.33	44.00	80.00	50.33	67.67	58.13	60.58	213.44	14.61
7	24	62.67	42.00	74.33	53.00	66.00	56.22	59.04	178.12	13.35
8	26	64.67	46.67	59.00	50.67	72.67	56.31	58.33	170.97	13.08
9	46	63.00	48.33	54.00	52.67	68.00	55.06	56.84	142.77	11.95
10	48	60.00	61.00	67.33	49.33	66.67	60.13	60.74	163.78	12.80
11	50	62.00	43.00	60.00	55.33	72.33	57.26	58.32	140.26	11.84
PROM G		62.21	48.67	67.67	53.00	71.42	57.64	PROM GG = 60.10		
VAR G		69.55	91.54	169.42	124.50	51.06	249.68	VAR GG = 167.11		
DESV-E G		8.34	9.57	13.02	11.16	7.15	15.80	DESV-E GG = 12.93		

Las Gráficas 2 y 3 muestran el monitoreo para la Frecuencia Cardíaca. En la Gráfica 2 se observan que las mediciones se encuentran dentro de los rangos de normalidad para bovinos adultos (40 LPM – 80 LPM). Sin embargo el grupo 5 (G36%), el cual se encontró constituido por animales menores a 1 año de edad, no demostró comportarse dentro de los rangos de normalidad para becerros (80 LPM – 110 LPM), así como se observa en la Gráfica 3.



Gráfica 2. Monitoreo de Frecuencia Cardíaca 1 (Promedios de Grupos)
 MIN A y MAX A = Valores Mínimos y Máximos para Adultos (Gasqué, 2008).



Gráfica 3. Monitoreo de Frecuencia Cardíaca 2 (Promedios de Grupos)
 MIN B y MAX B = Valores Mínimos y Máximos para Becerros (Gasqué, 2008).

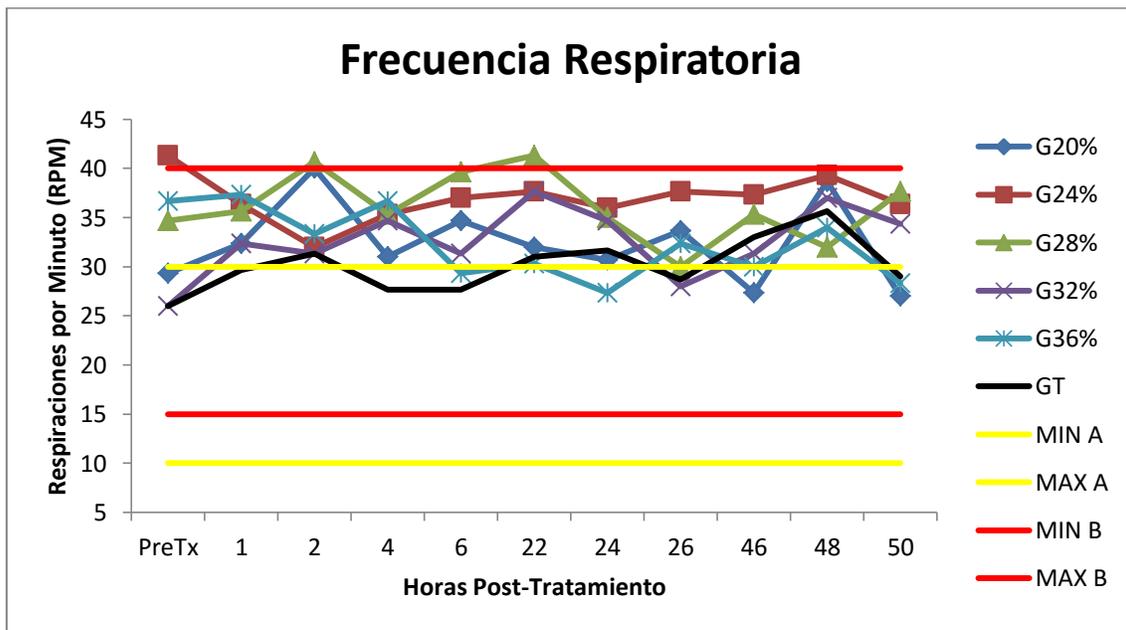
3.3.3. Monitoreo de Frecuencia Respiratoria

En el Cuadro 5 donde se muestran los valores calculados para la Frecuencia Respiratoria, no se observó mayor variación con respecto al promedio general el cual se calculó en 33.42 Respiraciones por Minuto (RPM) con una desviación estándar de ± 7.25 RPM con respecto al promedio. El Grupo Testigo (GT) presentó el promedio más bajo (30.12 RPM) con respecto a los grupos que recibieron tratamiento. Los promedios de grupos y los promedios calculados por hora de medición se encontraron por encima del rango de normalidad para bovinos adultos (10 RPM - 30 RPM), pero se encontraron dentro del rango de normalidad para becerros, esto de acuerdo con lo que reporta la literatura (15 RPM - 40 RPM) (Gasqué, 2008).

Cuadro 5. Valores Promedio, Varianza y Desviación Estándar para la Constante de Frecuencia Respiratoria.										
Medición	Hora	G20%	G24%	G28%	G32%	G36%	GT	PROM Hora	VAR Hora	DESV-E Hora
1	PreTx	29.33	41.33	34.67	26.00	36.67	26.00	32.33	68.24	8.26
2	1	32.33	36.33	35.67	32.33	37.33	29.67	33.94	18.53	4.30
3	2	40.00	32.00	40.67	31.33	33.33	31.33	34.78	29.01	5.39
4	4	31.00	35.33	35.33	34.67	36.67	27.67	33.44	36.14	6.01
5	6	34.67	37.00	39.67	31.33	29.33	27.67	33.28	57.51	7.58
6	22	32.00	37.67	41.33	37.67	30.33	31.00	35.00	59.29	7.70
7	24	30.67	36.00	35.00	34.67	27.33	31.67	32.56	43.20	6.57
8	26	33.67	37.67	30.00	28.00	32.33	28.67	31.72	99.51	9.98
9	46	27.33	37.33	35.33	31.33	30.00	33.00	32.39	94.84	9.74
10	48	38.67	39.33	32.00	37.00	34.00	35.67	36.11	53.05	7.28
11	50	27.00	36.33	37.67	34.33	28.33	29.00	32.11	29.75	5.45
PROM G		32.42	36.94	36.12	32.61	32.33	30.12	PROM GG = 33.42		
VAR G		33.56	32.56	74.30	29.87	98.85	20.30	VAR GG = 52.61		
DESV-E G		5.79	5.71	8.62	5.47	9.94	4.51	DESV-E GG = 7.25		

El monitoreo para la Frecuencia Respiratoria demostró que la mayoría de los promedios se encontraron dentro del rango de normalidad para becerros (15 RPM – 40 RPM). Sólo algunas mediciones del Grupo 1 (G20%), Grupo 4 (G32%), Grupo 5 (G36%) y Grupo Testigo (GT) se encuentran dentro del rango de

normalidad para bovinos adultos (10 RPM – 30 RPM). Se observaron mediciones por encima de los rangos de normalidad en el Grupo 2 (G24%), sin embargo, las mediciones posteriores para este grupo se encontraron dentro del rango de normalidad para becerros. Para el Grupo 3 (G28%) se observaron mediciones por encima de los rangos de normalidad a las 2 h y 22 h para becerros, pero el resto de las mediciones para grupo se encontró dentro del rango de normalidad para becerros.



Gráfica 4. Monitoreo de Frecuencia Respiratoria (Promedios de Grupos)

MIN A y MAX A = Valores Mínimos y Máximos para Adultos;
 MIN B y MAX B = Valores Mínimos y Máximos para Becerros (Gasqué, 2008).

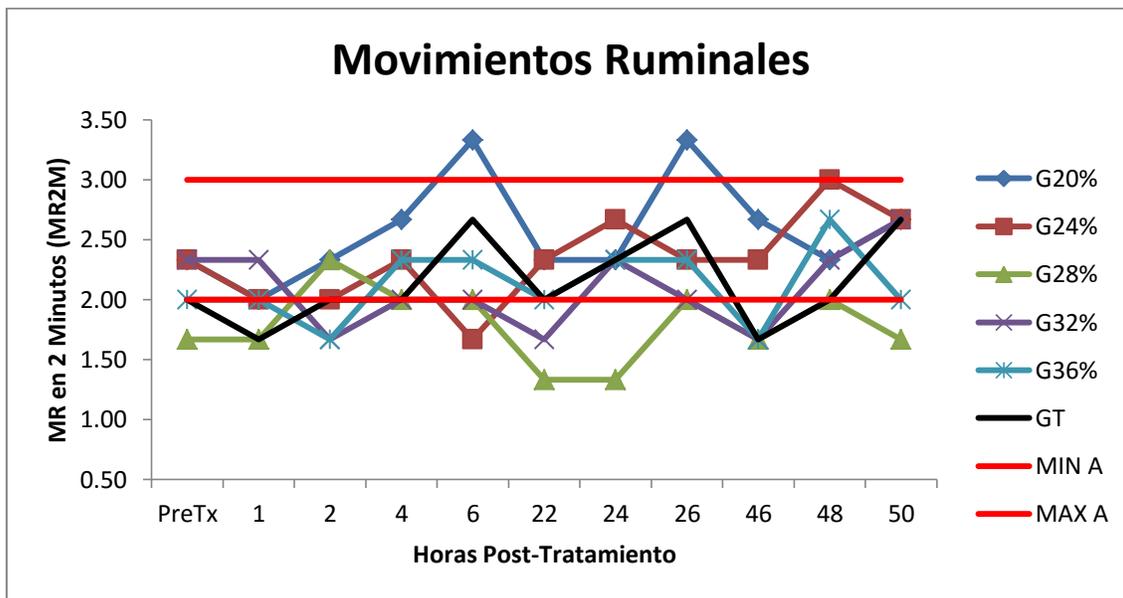
3.3.4. Monitoreo de Movimientos Ruminales

En el Cuadro 6 se observan los valores calculados para la constante de Movimientos Ruminales. El promedio general fue de 2.18 Movimientos Ruminales en 2 Minutos (MR2M), el cual se encuentra dentro del rango de normalidad que reporta la literatura (2-3 MR2M). La desviación estándar del promedio general fue de 0.263 MR2M. Se observaron valores por debajo del rango de normalidad que reporta la literatura para el promedio del Grupo 3 (1.79 MR2M) y para el promedio

en la medición de la hora 1 (1.94 MR2M), hora 22 (1.94 MR2M) y hora 46 (1.94 MR2M).

Cuadro 6.- Valores Promedio, Varianza y Desviación Estándar para la Constante de Movimientos Ruminales.										
Medición	Hora	G20%	G24%	G28%	G32%	G36%	GT	PROM Hora	VAR Hora	DESV-E Hora
1	PreTx	2.33	2.33	1.67	2.33	2.00	2.00	2.11	0.58	0.76
2	1	2.00	2.00	1.67	2.33	2.00	1.67	1.94	0.41	0.64
3	2	2.33	2.00	2.33	1.67	1.67	2.00	2.00	0.24	0.49
4	4	2.67	2.33	2.00	2.00	2.33	2.00	2.22	0.42	0.65
5	6	3.33	1.67	2.00	2.00	2.33	2.67	2.33	0.71	0.84
6	22	2.33	2.33	1.33	1.67	2.00	2.00	1.94	0.64	0.80
7	24	2.33	2.67	1.33	2.33	2.33	2.33	2.22	0.42	0.65
8	26	3.33	2.33	2.00	2.00	2.33	2.67	2.44	0.73	0.86
9	46	2.67	2.33	1.67	1.67	1.67	1.67	1.94	0.53	0.73
10	48	2.33	3.00	2.00	2.33	2.67	2.00	2.39	0.60	0.78
11	50	2.67	2.67	1.67	2.67	2.00	2.67	2.39	0.49	0.70
PROM G		2.58	2.33	1.79	2.09	2.12	2.15	PROM GG = 2.18		
VAR G		0.38	0.48	0.42	0.71	0.42	0.51	VAR GG = 0.53		
DESV-E G		0.61	0.69	0.65	0.84	0.65	0.71	DESV-E GG = 0.73		

En la Gráfica 5 se muestra el monitoreo de los Movimientos Ruminales, donde se observan promedios por encima de los rangos de normalidad para el Grupo 1 (G20%) a la hora 6 y 26 post-tratamiento. Se encontraron mediciones por debajo del rango de normalidad para el Grupo 2 (24%), 3 (28%), 4 (32%), 5 (36%) y Testigo (GT). Los promedios más bajos se observaron para el Grupo 3 a la hora 22 y 24 post-tratamiento.



Gráfica 5. Monitoreo de Movimientos Ruminales (Promedios de Grupos)

MIN A y MAX A = Valores Mínimos y Máximos para Adultos (Gasqué, 2008).

3.3.5. Monitoreo de Signos Clínicos

Durante la toma de constantes fisiológicas y el monitoreo, no se observaron signos claros de toxicidad aguda en ninguno de los grupos, sólo en uno de los animales del Grupo 2 (G24%) se observó ligera sialorrea a la hora 1 post-tratamiento y epífora a la hora 2 post-tratamiento. Posterior a la hora 2 post-tratamiento estos signos no se volvieron a observar posteriormente.

Al tercer día de estudio, se observó en las heces del ganado la presencia de parásitos gastrointestinales. Se recolectaron y llevaron al laboratorio del Departamento de Parasitología de la FMVZ de la UNAM para su observación, la identificación macroscópica concuerda con proglótidos de *Moniezia* spp.

3.4. Determinación de la Máxima Dosis Tolerada (MDT)

El análisis de los registros obtenidos para las constantes fisiológicas y monitoreo signos clínicos, no detectó diferencias marcadas en los grupos tratados con respecto al grupo testigo. Las mayores variaciones de encontraron para la constantes de Frecuencia Cardíaca, pero los promedios se encontraron dentro de los rangos de normalidad. El tratamiento con la dosis más alta en la que no se observaron diferencias marcadas en comparación con el grupo testigo, además de ser el tratamiento en el que no se observaron signos clínicos de toxicidad aguda, corresponde con el grupo que recibió una dosis al 36% con el compuesto 712-BF-016. La dosis con el compuesto 712-BF-016 al 36% se reconoce cómo la Máxima Dosis Tolerada.

3.5. Cálculo del Índice de Seguridad

El Índice de Seguridad se obtiene como resultado del cociente de la Máxima Dosis Tolerada y la Dosis Clínica Recomendada (MDT) (Vera *et al.*, 2006). La dosis clínica recomendada se determinó en una concentración al 16% del compuesto 712-BF-016. Esta determinación, se obtuvo a partir de la evaluación de la eficacia ixodida del compuesto 712-BF-016 en el trabajo de Santillán (2013). El análisis de los resultados determinó como la MDT el tratamiento con el 36% del compuesto 712-BF-016, por lo que el cálculo del Índice de Seguridad da como resultado 2.25.

$$\text{ÍS} = \frac{\text{MDT}}{\text{DC}} = \frac{36}{16} = 2.25$$

ÍS = Índice de Seguridad

MDT = Máxima Dosis Tolerada

DC = Dosis Clínica Recomendada

4. DISCUSIÓN

La oferta de compuestos ixodicidas para el control de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* es numerosa; sin embargo, estos compuestos se agrupan en sólo 6 familias. En relación a lo anterior, la frecuencia de los reportes de resistencia a los ixodicidas, convierte en una necesidad realizar investigación orientada a evaluar moléculas diferentes a las existentes con la finalidad de contar con alternativas viables para realizar el control químico de *R. (Boophilus) microplus*.

Con referencia a la información obtenida durante el proceso de formulación del compuesto 712-BF-016 en el presente estudio, se observó que la cromatografía de capa fina es una técnica que permite corroborar la presencia de una molécula en un medio, lo cual, es de gran utilidad para evaluar la estabilidad del compuesto durante su almacenamiento; sin embargo, esta técnica es de tipo cualitativa y no determina la cantidad de compuesto disponible en la formulación. No obstante, la cromatografía en capa fina posee bondades debido a que es un método sencillo y rápido de realizar, además de que el costo es relativamente bajo.

Las pruebas de evaluación de excipientes, permitieron guiar la selección del vehículo que poseyera una mayor adherencia; sin embargo, valdría la pena desarrollar una metodología para cuantificar la cantidad de compuesto 712-BF-016 que permanece en el pelo y la piel del bovino.

La evaluación de las constantes fisiológicas conforma una parte relevante del examen clínico y representa un primer indicador observable del estado de salud de un animal. Las constantes fisiológicas varían de manera natural, ya que los factores medioambientales como la temperatura ambiente y la humedad relativa, se comportan de manera cambiante a lo largo del día y de los meses del año. El animal compensa estos cambios por medio de mecanismos de regulación homeostática. El estado de homeostático mantiene las constantes dentro de un rango de normalidad, la variación que se observa fuera de este rango es sugerente al curso con un proceso patológico. Este equilibrio se compromete, ante la exposición de un factor que genera estrés.

El manejo que recibe el animal durante la toma de constantes fisiológicas e inspección clínica puede generar estrés, sobre todo si los animales no están

acostumbrados a la interacción con el humano, como en el caso de los animales que se mantienen bajo un sistema semi-extensivo. El arreo y la permanencia del ganado dentro de la manga generan estrés. Si los factores estresantes permanecen constantes, el comportamiento cambia, lo cual puede favorecer que se rompa el equilibrio homeostático. Los factores estresantes pueden ser controlados utilizando corrales individuales para cada animal, lo cual minimizaría el manejo, además de que permitiría monitorear el consumo de agua y alimento.

La exposición ante un ixodocida, puede generar alteraciones en las constantes fisiológicas por fuera de los rangos de normalidad, lo anterior se manifiesta con la aparición de signos clínicos. En un estudio que analizó 33 casos clínicos con diagnóstico de intoxicación aguda por plaguicidas, se observó que los principales signos clínicos a la intoxicación con estos compuestos fueron: miosis, broncorrea, fasciculaciones, irritabilidad, salivación, diaforesis, confusión, contracturas musculares, vómito y debilidad muscular entre otros. También se observó insuficiencia respiratoria y bradicardia (Durán-Nah y Collí-Quintal, 2000).

Durante el monitoreo, no se observaron efectos secundarios post-tratamiento de una manera generalizada. Se observó ptialismo y epífora en uno de los animales del grupo 2, pero estos signos no se observaron en las mediciones posteriores. El ptialismo o epífora puede presentarse como consecuencia de un reflejo parasimpático y sus causas pueden ser diversas desde las inflamatorias, infecciosas además de las toxicológicas. La aparición de ptialismo, puede ser atribuida al estrés por manejo excesivo, lo cual se acentúa en animales de temperamento agresivo. La epífora, puede atribuirse a una irritación, como consecuencia al contacto de la formulación con los ojos durante la aspersión.

Con respecto a la metodología empleada en el presente estudio, la toma de constantes fisiológicas y el monitoreo del comportamiento permiten observar el efecto toxicológico ante la exposición con un ixodocida, pero no es posible conocer el efecto real en los órganos internos, por lo tanto, se recomienda en este tipo de evaluaciones, obtener mediciones con parámetros relacionados a la presentación de una intoxicación con ixodocidas, como la medición de los niveles de la enzima acetilcolinesterasa en los glóbulos rojos y Aspartato aminotransferasa observable

en consecuencia de un daño celular generalizado. No obstante, el monitoreo de las constantes fisiológicas asociado a la aparición de signos clínicos observables, es un método sencillo que no requiere equipo costoso y puede identificar efectos generalizados en los animales posterior a la exposición con ixodíctidas.

El análisis de los promedios de las constantes fisiológicas a lo largo del monitoreo, no denota una tendencia por fuera de los rangos de normalidad; sin embargo, este tipo de estudios deben de minimizar los factores causantes de estrés para evitar variaciones que impacten en los promedios.

En el análisis de los promedios de Frecuencia Cardíaca los valores del Grupo 5 (G5) se mantuvieron por debajo del rango de normalidad para becerros que reporta Gasqué (2008). Lo anterior, considerando que los bovinos del G5 se integraron con animales menores a 1 años de edad. De acuerdo con lo mencionado por Fazio *et. al.* (2012) en un estudio donde reporta mediciones de constantes fisiológicas para bovinos de la raza Limousine, los valores promedio de la Frecuencia Cardíaca para bovinos con temperamento calmado fueron de 55.76 LPM \pm 6.08 LPM y para bovinos con temperamento inquieto 65.60 LPM \pm 9.31 LPM. Estos valores nos indicarían un rango entre 49.67 LPM y 74.6 LPM, lo cual se ajusta más a los valores obtenidos en este estudio.

De manera similar al ejemplo de la Frecuencia Cardíaca, los valores obtenidos en este estudio oscilan entre los rangos de normalidad de becerros y adultos que reporta Gasqué para la constante de Temperatura. Con los datos reportados por Fazio *et. al.* se obtiene un rango de 38.3 °C y 40.06 °C, el cual también se ajusta más para la mayoría de las mediciones obtenidas en este estudio. Lo anterior sugiere que la bibliografía para diversas fuentes debe de ampliarse, ya que las constantes fisiológicas pueden varias poder diversos factores,

Respecto a las condiciones bajo las que se realizó la evaluación de campo, se recomienda realizar estudios posteriores bajo condiciones climatológicas de clima subtropical o tropical, donde la temperatura y humedad relativa, favorecen el desarrollo de garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Un estudio bajo estas condiciones habrá de considerar los cambios en la homeostasia del animal en comparación con las que se presentan en un clima templado.

Si bien, no se presentaron signos claros de un efecto toxicológico, ni se observó un efecto sostenido de las constantes fisiológicas por fuera de los rangos, aún no existe evidencia sobre el tipo de interacción biológica y afinidad celular que tiene el compuesto 712-BF-016, por lo que estudios de farmacocinética y farmacodinamia permitirían aclarar la afinidad por diferentes órganos y tejidos, así como los mecanismos de excreción.

Debido al número de animales por grupo, no fue posible realizar un análisis estadístico más riguroso. El aumento en el tamaño de los grupos contribuiría a comprobar si existe un patrón multivariado de las constantes fisiológicas ante la exposición con un ixodicida.

Estudios de DL50% realizados en ratones de laboratorio, esclarecerían en que dosis es posible observar un efecto de toxicidad en el ganado y el humano. Con relación al sacrificio de animales que contemplan este tipo de estudios y considerando el bienestar animal, cabe la posibilidad de considerar alternativas viables de estudios toxicológicos basados en modelos *in vitro*.

Hace falta conducir más estudios que despejen incógnitas del efecto reductor de la eficacia ixodicida en modelos *in vitro* con respecto a la observada *in vivo*, ya que en evaluaciones de campo realizadas en el ganado infestado, el porcentaje de efectividad ixodicida disminuye considerablemente (Santillan, 2013). Una gran cantidad de publicaciones describen los mecanismos que generan resistencia en las garrapatas, considerando que lo anterior juega el papel determinante en la reducción de la eficacia de los ixodicidas; sin embargo, existen factores físico-químicos, medioambientales y operacionales que deberían considerarse además de la resistencia intrínseca de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

Diversos factores pueden minimizar la pérdida en la eficacia con la que actúan los ixodicidas disueltos en baños de inmersión y que pueden confundirse con algún tipo de resistencia intrínseca. Una variedad de factores que incluyen: la naturaleza de la formulación, el grado de suciedad del pelo, la presencia de tierra o estiércol. La degradación del amitraz puede prevenirse manteniéndolo en una solución con un pH aproximado de 12 (George *et al.*, 2004). Lo anterior interviene

en la reducción de la efectividad en pruebas de campo problema que enfrentan los ixodicidas que se aplican por medio de aspersión.

Sin embargo, es importante señalar que la información obtenida bajo las condiciones en las que se desarrolló el presente estudio, demuestran que la aplicación del compuesto experimental 712-BF-016, no constituye un riesgo considerable que impacte la salud de los animales, inclusive con la aplicación de la dosis más alta (36%), la cual excede en más del doble la concentración de la mayoría de los ixodicidas comerciales como es el caso de piretroides y organofosforados (entre 16% y 20%). Cabe señalar que el Médico Veterinario no utilizaría una dosis por encima de concentración recomendada con el conocimiento de que al incrementar la dosis podría contribuir a generar cepas resistentes de garrapatas.

Respecto a la presencia de proglotidos de *Moniezia* spp. en las heces del ganado, no existe un antecedente de que el compuesto 712-BF-016 pueda actuar con un efecto tenicida. Cuando existe una parasitosis con *Moniezia* spp, el diagnóstico de esta enfermedad se apoya en la observación de cadenas de proglotidos en la superficie del bolo fecal (Quiroz, 2005). Esto podría indicar que la liberación de los proglotidos no necesariamente se debe al efecto del tratamiento con el compuesto 712-BF-016.

Con relación a lo arriba señalado, se ha descrito que el compuesto 712-BF-016 se compone de dos moléculas: un imidazol y una piridina (Santillan, 2013). La molécula de imidazol se encuentra presente en una diversidad de compuestos de la familia de bencimidazoles que se han utilizado para el tratamiento antihelmíntico contra nematodos gastrointestinales y pulmonares de rumiantes. Es posible que la conformación molecular del compuesto 712-BF-016 posea una propiedad antihelmíntica, pero habría que conducir estudios para evaluar su eficacia.

El presente trabajo es una contribución más al conocimiento de las ventajas o desventajas que posee un compuesto experimental con potencial ixodicida. Futuros estudios toxicológicos y farmacológicos podrían dilucidar el verdadero potencial ixodicida que tiene el compuesto 712-BF-016.

5. CONCLUSIÓN

No se observaron signos clínicos marcados de toxicidad aguda en ninguno de los grupos de los animales tratados con compuesto 712-BF-016 durante la toma de constantes fisiológicas ni durante el tiempo que se monitoreo el ganado.

La Dosis Máxima Tolerada para el compuesto 712-BF-016 en este trabajo se observó para la formulación al 36%. El cociente de la división entre la formulación al 36% y la dosis clínica recomendada (16%), generó un Índice de Seguridad de 2.25.

6. REFERENCIAS

1. BAZAN TM. Efecto de *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) en el control biológico de *Boophilus microplus* Canestrini (Acari: Ixodidae) en ganado bovino estabulado. (tesis de maestría). Tecomán (Colima): Maestría en Ciencias: Área de Biotecnología. Universidad de Colima, 2002.
2. CANO CJP. Practica 1: Examen Clínico. En: Manual de Prácticas de Clínica de los Bovinos 1. Editores: AVILA GJ, CANO CJP, OLGUÍN BA. México D.F. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. [citado 2014-03-28]. Disponible en: URL: http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/licenciatura/coepa/archivos/Manuales/22_CLINICA_BOVINOS.pdf
3. COSTA GLV, ZANETTI LWD, CAYEIRO CB, TEIXEIRA WF, FELIPPELLI G, MACIEL WG, ABUD BM, RUIVO MA, ALCANTARA CMH, SILVEIRA CR, CAMPANHA MA, SOARES VE, DA COSTA AJ. Acaricidal effects of fluazuron and a combination of fluazuron + ivermectin administered at different routes against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* parasitizing cattle. *Experimental Parasitology*. 2015; 153: 22–28.
4. DÍAZ RE. Mecanismos moleculares y bioquímicos de resistencia a acaricidas en la garrapata común de los bovinos *Rhipicephalus microplus*. *Revista Colombiana de Ciencia Animal*. 2012; 5 (1): 72-81.
5. DOMÍNGUEZ-GARCÍA DI, ROSARIO-CRUZ R, ALMAZÁN-GARCÍA C, SALTIJERAL OJA, DE LA FUENTE J. *Boophilus microplus*: Aspectos Biológicos y Moleculares de la Resistencia a los acaricidas y su impacto en la Salud Animal. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 2010 (12): 181 – 192.
6. DURÁN-NAH JJ, COLLÍ-QUINTAL J. Intoxicación aguda por plaguicidas. *Salud Publica Mex*. 2000; 42: 53-55.
7. FAZIO E, MEDICA P, CRAVANA C, CAVALERI S, FERLAZZO A. Effect of temperament and prolonged transportation on endocrine and functional variables in young beef bulls. *Veterinary Record*. 2012; 171 (25): 644.
8. FERNÁNDEZ ADG, MANCIPE GLC, FERNÁNDEZ ADC. Intoxicación por organofosforados. *Revista Med*. 2010; 18 (1): 84-92.
9. FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA (FMVZ). UNAM. Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Agro Silvo Pastoril (CEIEPASP), Chapa de Mota, Estado de México. Localización. 2012. [citado 2015-05-15]. Disponible en: URL: <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/centros/ceiepasp/localizacion.html>
10. GEORGE JE, POUND JM, DAVEY RB. Chemical control of ticks on cattle and the resistance of these parasites to acaricides. *Parasitology*. 2004; 129: S353-S366.
11. GASQUÉ GR. Capítulo 5: Características Generales del Ganado Bovino. En: *Enciclopedia Bovina 1a Edición*. México: UNAM, 2008. 232.
12. GUGLIELMONE AA, ROBBINS RG, APANASKEVICH DA, PETNEY TN, ESTRADA-PEÑA A, HORAK IG, SHAO R, BARKER SC. The Argasidae,

Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names. Zootaxa. 2010; 2528: 1-28.

http://www.nuttropic.com/publicaciones/produccion_y_comercializacion_de_la_carne_veracruz_vf.pdf

13. IBARRA VF. Capítulo 23: Infestación por garrapatas *Boophilus*. En: Parasitología Veterinaria Volumen III, Artrópodos. Editores: IBARRA VF, FIGUEROA CJA, QUINTERO MMT. México, DF: Color SA de CV, 2012. 141-149.
14. MARTINEZ CM, RIVAS G. Capítulo 1: Introducción y generalidades de los artrópodos. En: Parasitología Veterinaria Volumen III, Artrópodos. Editores: IBARRA VF, FIGUEROA CJA, QUINTERO MMT. México, DF: Color SA de CV, 2012. 1-11.
15. NOM-006-ZOO-1993, Requisitos de efectividad biológica para los ixodicidas de uso en bovinos y método de prueba. Septiembre, 21, 1994.
16. NUÑEZ, JL, MUÑOZ-COBENAS ME, MOLTEDO HL. *Boophilus microplus*, the common cattle tick. Berlin, Germany: Springer-Verlag, 1985.
17. OJEDA-CHI MM, RODRÍGUEZ-VIVAS RI, GALINDO-VELASCO E, LEZAMA-GUTIÉRREZ R, CRUZ-VÁZQUEZ C. Control de *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) mediante el uso del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae). Revisión. Rev Mex Cienc Pecu. 2011; 2 (2): 177-192.
18. OLIVERA GJA. Evaluación de la Efectividad de un Ixodicida experimental contra una cepa susceptible de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Tesis de Maestría). México (D.F.): Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México, 2010.
19. QUIROZ RH. Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos. México DF: Limusa, 2005.
20. RODRÍGUEZ-VIVAS RI, DOMINGUEZ AJ. Grupos entomológicos de importancia veterinaria en Yucatán, México. Rev Bioméd. 1998; 9: 26-37.
21. RODRÍGUEZ-VIVAS RI, ROSADO AA, BASTO EG, GARCÍA VZS, ROSARIO CR, FRAGOSO SH. Manual Técnico para el control de garrapatas en el ganado bovino. Publicación Técnica No. 4, CENID-Parasitología Veterinaria, Jiutepec, Morelos. México. 2006.
22. RODRÍGUEZ-VIVAS RI, TORRES AJF, RAMÍREZ CGT, AGUILAR RJA, AGUILAR CAJ, OJEDA, CMM, BOLIO GME. Manual técnico: Control de parásitos internos y externos que afectan al ganado bovino en Yucatán, México. UADY-CONACYT. Mérida, México. 2011. [citado 2013-12-05]. Disponible en: URL: <http://www.uady.mx/~veterina/CASaludAnimal/Manual%20control%20de%20parasitos.pdf>
23. RODRÍGUEZ VRI, OJEDA CMM, PÉREZ CLC, ROSADO AJA. Capítulo 33: Epidemiología y control de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en México. En: Epidemiología de enfermedades parasitarias en animales domésticos. Editores: QUIROZ RH, FIGUEROA CJA, IBARRA VF, LÓPEZ AME. México, 2011. 477-504.
24. ROMÁN PH, AGUILERA SR, PATRACA FA. Producción y Comercialización de Ganado y Carne de Bovino en el Estado de Veracruz. Comité Nacional del

- Sistema Producto Bovinos Carne (CNSPBC). Veracruz, Veracruz. 2012. [citado 2014-06-17]. Disponible en:
http://www.nuttropic.com/publicaciones/produccion_y_comercializacion_de_la_carne_veracruz_vf.pdf
25. ROSARIO CR, DOMÍNGUEZ GDI, ROJAS RE, ORTIZ EM, MARTÍNEZ IF. Estrategias para el control de la garrapata *Boophilus microplus* y la mitigación de la resistencia a los pesticidas. Folleto Técnico No. 6. INIFAP CENID PAVET. Jiutepec Morelos, México. 2009. [citado 2015-08-24]. Disponible en:
<http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/jspui/bitstream/handle/123456789/3141/FolletoTecnicoN6.pdf?sequence=1>
 26. SANTILLÁN VG. Eficacia del ixodicida experimental 712-BF-016 contra *Rhipicephalus (Boophilus) microplus in-vitro* e *in-vivo* en bovinos (tesis de maestría). México (D.F.): Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México, 2013.
 27. SANTILLÁN-VELAZQUEZ G, IBARRA-VELARDE F, FLORES PB, ROMERO-AVILA M, ALCALÁ-CANTO Y, SALGADO-ZAMORA H, VERA MY. In Vitro and in Vivo Efficacy of an Experimental Compound against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Ticks. *Pharmacology & Pharmacy*, 2013; 4:41-45.
 28. SCOTT RPW. Principles and Practice of Chromatography. Chrom-Ed Book Series, 2003: 10-12, 59-62.
 29. SECRETARÍA DE AGRICULTURA, GANADERÍA, DESARROLLO RURAL, PESCA Y ALIMENTACIÓN (SAGARPA)-Coordinación General de Ganadería, México. 2013. Programa Nacional de los Recursos Genéticos Pecuarios. [citado 2014-06-17]. Disponible en:
<http://www.sagarpa.gob.mx/ganaderia/Publicaciones/Lists/Otros/Attachments/2/conargen.pdf>
 30. SERVICIO DE INFORMACIÓN AGROALIMENTARIA Y PESQUERA (SIAP), MÉXICO. 2015. Población ganadera, Bovino Carne y Leche 2004-2013. [citado 2015-04-01]. Disponible en:
http://www.siap.gob.mx/opt/poblagand/Bovinos_carne_leche.pdf
 31. SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD, INOCUIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA (SENASICA) – Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), Gobierno Federal. Garrapata *Boophilus* spp. México. 2014. [citado 2014-02-05]. Disponible en:
<http://www.senasica.gob.mx/?id=4373>
 32. TEMEYER KB, CHEN AC, DAVEY RB, GUERRERO FD, HOWELL JM, KAMMLAH DM, LI AY, LOHMEYER KH, OLAFSON PU, PEREZ DE LEON AA, PHILLIPS PL, POUND JM, WELCH JB. Nuevos enfoques para el control de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Rev Mex Cienc Pecu*. 2012; 3 (1): 25-40.
 33. VERA Y, IBARRA F, CANTÓ GJ, SORIA O, CASTILLO R, HERNÁNDEZ A. Determination of the maximum tolerated dose and the safety index of an experimental fasciolicide in cattle. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. 2006; 53: 145-9.
 34. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). 2015. International Programme on Chemical Safety - INTOX tools for harmonized data collection: Poisoning Severity Score. [citado 2015-04-01]. Disponible en:
http://www.who.int/ipcs/poisons/pss_es.pdf?ua=1