



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

DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA DE LA EMBRIOGÉNESIS DE LA
GARRAPATA DEL GANADO *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

T E S I S

Que para optar por el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS

Presenta

IRAIS GRANDA GARCÍA

Tutor Principal

RAQUEL COSSÍO BAYÚGAR

CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES DISCIPLINARIAS EN
PARASITOLOGÍA VETERINARIA, INIFAP

Comité Tutorial

HÉCTOR QUIROZ ROMERO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, UNAM

SERGIO DARÍO RODRÍGUEZ CAMARILLO

CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES DISCIPLINARIAS EN
PARASITOLOGÍA VETERINARIA, INIFAP

México, D.F. AGOSTO 2014.



Universidad Nacional
Autónoma de México



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

LA PRESENTE TESIS ES EL RESULTADO DEL ESFUERZO Y DEDICACIÓN EN MI CRECIMIENTO PROFESIONAL Y PERSONAL, POR LO QUE DEDICO ESTE TRABAJO EN AGRADECIMIENTO A:

MIS PADRES

Alejandro Granda Vallejo y Virginia García Gonzáles, por su gran apoyo moral y el inmenso amor que me han brindado guiándome y aconsejándome en cada paso que doy para caminar sobre el camino al éxito, sin olvidar los valores que me han inculcado pues son los que nos caracterizan como persona

MIS HERMANOS

Janet Granda García y Alexy Granda García, por haber creído en mí y haberme permitido compartir con ellos momentos de alegrías y tristezas, por haberme enseñado que unidos podemos salir adelante y porque siempre que los he necesitado han estado ahí, apoyándome y brindándome su cariño inigualable, gracias.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente quiero agradecer a Dios porque es a Él a quien debo todo lo que soy y por permitirme levantarme día a día hasta lograr este propósito.

Agradezco inmensamente a la Dra. Raquel Cossío Bayúgar, por haberme permitido llevar a cabo parte de su proyecto y haber depositado su confianza en mí apoyándome y guiándome a lo largo de la investigación.

Expreso mis sinceros agradecimientos a la Universidad Nacional Autónoma de México por abrirme sus puertas y poder crecer y desarrollarme profesionalmente.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para el financiamiento de mis estudios durante la maestría, así como a SEP-CONACYT, por haber financiado el proyecto No. 103026, pues sin este apoyo no hubiera logrado alcanzar este objetivo.

A su vez quiero agradecer a los miembros de mi comité tutorial, al Dr. Héctor Quiroz Romero y al Dr. Sergio Darío Rodríguez Camarillo por haber aceptado formar parte de este proyecto de investigación y que gracias a su colaboración, observaciones y comentarios certeros se pudo finalizar esta tesis.

Infinitamente agradezco al Dr. Enrique Alejandro Reynaud Garza del departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular en el Instituto de Biotecnología-UNAM, al M. en C. Francisco Javier García Vázquez del departamento de anatomía patológica del Instituto Nacional de Pediatría y a la M. en C. Hortensia Rosales Montellano del departamento de morfología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas-IPN; por su valiosa cooperación, asesoría y profesionalismo al permitirme hacer uso de sus espacios para el desarrollo parcial de la investigación.

Así mismo, expreso mis agradecimientos al Jurado, por haberme dedicado un poco de su valioso tiempo, profesionalismo y conocimiento en la revisión de esta tesis, ya que sin ello, no se hubiera podido lograr el principal objetivo de la misma.

Y por último pero sin restarles importancia agradezco primeramente a una persona muy especial, Héctor Hugo Pelenco Hernández y a mis amigos por estar siempre al pendiente de mí, mostrándome su apoyo incondicional y compartiendo momentos de alegrías, tristezas, reflexión, conocimiento y consejos que día a día nos hace mejores personas.

RESUMEN

Uno de los principales problemas de la ganadería bovina en zonas tropicales y subtropicales es la presencia de garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Estos ectoparásitos han tenido gran impacto en la salud del ganado debido a daños directos e indirectos y en la salud humana por la contaminación por pesticidas de los productos y subproductos de origen vacuno. Este conjunto de problemas, han llevado a desarrollar nuevos métodos de control para estos parásitos hematófagos, sin embargo le han restado importancia a uno de los aspectos más básicos de este artrópodo: su embriología, la cual es un conocimiento fundamental de su biología que a la fecha se desconoce y que incluso, puede dar una visión amplia para identificar nuevas alternativas que ayuden a frenar su ciclo biológico y así solucionar este gran problema; es por ello que el objetivo de este trabajo fue estudiar y caracterizar la embriogénesis de la garrapata *R. microplus* a partir de huevos recién ovipositados hasta la eclosión de las larvas. Se obtuvieron huevos recién ovipositados de garrapatas *R. microplus* y se mantuvieron a 28°C y 80% de humedad relativa. Se fijaron muestras de huevos cada 24hr y se tiñeron con Diaminofenilindol (DAPI), los huevos se visualizaron al microscopio de fluorescencia y se obtuvieron imágenes de los eventos del desarrollo embrionario. Los eventos fisiológicos observados desde la oviposición hasta la eclosión se clasificaron en 14 etapas de desarrollo embrionario: primeras divisiones nucleares(1-3 días), blastodermo (día 4), blastoporo (día 5), engrosamiento primario (día 5), formación del campo dorsal (día 9), formación de la banda germinal (día 9), segmentación de la banda germinal (día 9), brote de las extremidades (día 9), diferenciación de las extremidades (12 días), diferenciación del sistema nervioso (día 13), inversión (día 14), cierre dorsal (día15), cierre ventral (día 16) y postembrión (20 días). La formación del disco germinal característico en otros artrópodos, no se observó como tal. La gastrulación se hizo evidente como en otros artrópodos que si lo presentan. Este trabajo da una visión más amplia de la biología del desarrollo embrionario de la garrapata, la cual nos ayuda a entender más a este ectoparásito mostrándonos su similitud con otros artrópodos.

Palabras claves: Embriogénesis, garrapata, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

ABSTRACT

The cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, is a major problem for the tropical and subtropical cattle industry around the world. This blood sucking ectoparasite have a major impact on cattle health due to direct and indirect harm on the cattle as vector of bovine infectious diseases, and an indirect negative effect in human health due to pesticide contamination of meat, milk and dairy products. For these problems different methods for controlling ticks are being investigated but the basic biology research such as tick embryology has being neglected. Embriology is of great importance but still unknown for most of its details that could help envision a wider scientific view in order to identify alternatives that may help arrest the tick's life cycle as a pest control alternative. The objective of this work was to study and characterize the *Rhipicephalus microplus* embryogenesis from freshly laid eggs to hatching larvae, for this purpose tick egg masses were collected and then incubated in Petri dishes at 28°C and 80% relative moisture. Eggs were fixated every 24 hr and stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (*DAPI*) to obtain images of embryo development stages on a fluorescent microscope. Fourteen stages were identified which represent the physiological events of embryonic development until larval hatching: Early nuclear divisions (1-3 days), blastoderm (day 4) blastopore (day 5), primary thickening (day 5), dorsal field (day 9), germ band formation (day 9), germ band segmentation (day 9), limb buds (day 9) limb differentiation (day 12), nervous system differentiation (day 13), inversión (day 14), dorsal closure (day15), ventral (day16) postembryo (day 20). The characteristic germinal disc present in other arthropods was not well defined. The gastrulation stage was similar to other *arthropods*. This work provides us with a wide vision of the tick embryology, which helps us understand the similitude with other arthropods.

Key words: embryogenesis, tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

ÍNDICE

DEDICATORIA.....	I
AGRADECIMIENTOS	II
RESUMEN	III
ABSTRACT	IV
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN DE LA LITERATURA.....	3
Identificación y Distribución Geográfica	3
Clasificación del ciclo de vida libre o fase no parásita:	6
Clasificación del ciclo de vida parásita.....	7
IMPORTANCIA DE LA GARRAPATA	9
Daños directos.....	9
Daños Indirectos	10
CONTROL.....	11
RESISTENCIA DE LAS GARRAPATAS A LOS GARRAPATICIDAS	12
MORFOLOGÍA DE LAS GARRAPATAS	13
EMBRIOLOGÍA EN ARTRÓPODOS.....	21
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	26
OBJETIVOS	27
Objetivo General	27
Objetivos Específicos.....	27
MATERIALES Y MÉTODOS	28
Obtención de garrapatas repletas y huevos ovipositados.....	28
Fijación de los embriones	28

Visualización de embriones por microscopía de epifluorescencia (Tinción de ADN)	29
Visualización de embriones de garrapata con microscopía invertida.	30
Edición de fotos de microscopía de fluorescencia y de luz invertida.....	30
RESULTADOS.....	31
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	52
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
APÉNDICE	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de la campaña nacional contra la garrapata <i>Boophilus spp.</i>	4
Figura 2. Ciclo biológico de <i>Rhipicephalus microplus</i>	5
Figura 3. <i>Rhipicephalus microplus</i>	13
Figura 4. Morfología externa de la garrapata hembra <i>Rhipicephalus microplus</i> ...	13
Figura 5. Gnatosoma de larva de <i>Rhipicephalus Microplus</i>	14
Figura 6. Extremo anterior de <i>Rhipicephalus microplus</i>	15
Figura 7. Extremo anterior de larva <i>Rhipicephalus. microplus</i>	16
Figura 8. <i>Rhipicephalus microplus</i>	17
Figura 9. Extremidades de <i>Rhipicephalus microplus</i>	18
Figura 10. Primera extremidad podal de <i>Rhipicephalus microplus</i>	19
Figura 11. Morfología externa <i>Rhipicephalus microplus</i>	20
Figura 12. Etapa 1: Primeras divisiones.	38
Figura 13. Etapa 2: Blastodermo.	38
Figura 14. Etapa 3: Placa primitiva.....	38
Figura 15. Etapa 4: Blastoporo	38
Figura 16. Etapa 5: Establecimiento del eje dorso-ventral.	39
Figura 17. Etapa 6: Banda germinal	40
Figura 18. Etapa 7: Segmentación de la banda germinal.....	40
Figura 19. Etapa 8. Brotes de las extremidades.....	42
Figura 20. Etapa 9: Diferenciación de las extremidades.	44
Figura 21. Etapa 10: Diferenciación del tejido neural.	46
Figura 22. Etapa 11: Inversión.	48
Figura 23. Etapa 12: Cierre dorsal.....	48
Figura 24. Etapa 13: Cierre Ventral.....	50
Figura 25. Etapa 14: Post-embrión.....	51

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Etapas de desarrollo embrionario de la garrapata <i>Rhipicephalus microplus</i> . Tinción nuclear con DAPI y esquemas ilustrativos.....	32
Cuadro 2. Etapas del desarrollo embrionario de la garrapata <i>Rhipicephalus microplus</i> . Tinción nuclear con DAPI y esquemas ilustrativos de la etapa 4-6.....	33
Cuadro 3. Etapas del desarrollo embrionario de la garrapata <i>Rhipicephalus microplus</i> . Tinción nuclear con DAPI y esquemas ilustrativos de la etapa 7-9.....	34
Cuadro 4. Etapas del desarrollo embrionario de la garrapata <i>Rhipicephalus microplus</i> . Tinción nuclear con DAPI y esquemas ilustrativos de la etapa 10-12..	35
Cuadro 5. Etapas del desarrollo embrionario de la garrapata <i>Rhipicephalus microplus</i> . Tinción nuclear con DAPI y esquemas ilustrativos de la etapa 13 y 14.	36
Cuadro 6. Nomenclatura de las etapas embrionarias de la garrapata del ganado..	66

INTRODUCCIÓN

Las garrapatas y las enfermedades transmitidas por ellas son uno de los grandes problemas de salud pública y veterinaria en el mundo (Alonso *et al.*, 2006). Las garrapatas se consideran, después de los mosquitos, los segundos vectores más importantes de enfermedades en humanos y vectores de patógenos causantes de enfermedades en animales (Domínguez, *et al.*, 2010).

Estos ectoparásitos pertenecen a un grupo de artrópodos hematófagos que actúan como reservorio de organismos patógenos que incluyen protozoarios como (*Babesia* spp y *Theileria* spp), bacterias (*Rickettsia* spp, *Ehrlichia* spp y *Anaplasma* spp), virus (Nairovirus, *Flavivirus* y *Asfavirus*) y nematodos (*Acanthocheilonema*) (Quiroz, 1984).

A nivel mundial existen más de 900 especies de garrapatas (Hoffmann y López-Campos, 2000). En México se han identificado 82 especies de garrapatas tanto en hospederos silvestres como domésticos, además de 16 especies probables en el territorio nacional, pero las cuales aún no han sido correctamente clasificadas (Hoffmán y López-Campos, 2000). Entre las diferentes garrapatas, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* es específica del ganado bovino, aunque se puede encontrar en equinos y venados (Quiroz, 1984) y es responsable de la disminución de la productividad ganadera al transmitir al menos los tres agentes etiológicos importantes de la ganadería tropical: *Babesia bovis*, *B. bigemina* y *Anaplasma marginale* (Jonsson *et al.*, 2008), además destaca como causante de lesiones y daños en la piel bovina al perforar ésta al alimentarse (Buczen y Bartozic, 2006). Las garrapatas consumen grandes cantidades de sangre inhibiendo funciones de inmunidad y el apetito del animal causando debilitamiento y anemia (Alonso, 2006), además limitan el uso de razas seleccionadas por susceptibilidad a la garrapatas y a las enfermedades que producen (Alonso *et al.*, 2007).

Los miembros pertenecientes al *phylum* Artrópoda incluyen a las langostas, cangrejos, camarones, ciempiés, milpiés, insectos, garrapatas, ácaros y arañas, quienes se definen por ser bilateralmente simétricos, con un exoesqueleto de quitina y patas articuladas; son metaméricos, es decir, el cuerpo exhibe segmentación real en la que no es la replicación de partes del cuerpo, como los músculos y los ganglios nerviosos, así mismo muestran tagmatosis, fenómeno en que los segmentos del cuerpo son modificados y agrupados para formar partes de la boca y las regiones del cuerpo, como el tórax de los insectos (Beatty y Marquardt, 1996).

Dentro de los quelicerados, la embriogénesis de los artrópodos es la menos conocida, por lo que de acuerdo a evidencias disponibles se puede tomar como modelo básico de desarrollo de los quelicerados a *Xiphosura*, donde los diversos patrones de desarrollo embrionario en los arácnidos son derivados de este modelo (Gupta, 1979).

A pesar de su importancia, la embriogénesis de las garrapatas no ha sido estudiada a detalle y por lo tanto la información sobre el desarrollo y los eventos involucrados en la formación del embrión de la garrapata es apenas disponible (Sonenshine, 1991 y Seixas, y col. 2012). En la actualidad se ha comenzado a evaluar la morfología de los embriones de garrapata sobre todo en las primeras fases de su desarrollo (Campos y col. 2006).

REVISIÓN DE LA LITERATURA

IDENTIFICACIÓN Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

Las garrapatas son ectoparásitos (parásitos externos) del *Phylum* Artrópoda que en griego significa “los que tienen patas articuladas”, Clase: Arácnida, Orden: Acarina y de la superfamilia Ixodida. Las garrapatas se consideran el principal ectoparásito del ganado en el mundo, pues son designados como ectoparásitos obligados, es decir, que se sitúan sobre la piel del hospedador alimentándose de la sangre y otros fluidos de animales domésticos, silvestres y del hombre (Jongejan y Uilenberg, 2004).

Se estima que el 80% del ganado en el mundo se encuentra en zonas infestadas por garrapatas, en México se han identificado 82 especies de garrapatas tanto en animales silvestres como domésticos, además de 16 especies probables en el territorio nacional, pero de las cuales aún no se tiene evidencia (Rosario, *et al.*, 2006).

Las garrapatas se clasifican en tres familias: 1) ixodidae o garrapatas duras, 2) argasidae o garrapatas blandas y 3) Nuttalliellidae, presente solo en África de la cual se ha identificado solo una especie, con características intermedias entre las dos familias anteriores (Rosario, *et al.*, 2006), *R. microplus* es un miembro de la familia Ixodidae, estas garrapatas anteriormente se clasificaban en el género *Boophilus*, sin embargo, recientemente se propuso que las cinco especies del género *Boophilus* se agruparan al género *Rhipicephalus* por presentar características filogenéticas estrechamente relacionadas y siendo considerados géneros monofiléticos (Beati y Keirans 2001). Algunos investigadores sin embargo, están en desacuerdo y siguen manteniendo la distinción, ya que las garrapatas del género *Boophilus* se encuentran entre los más importantes en el mundo (Jongejan y Uilenberg, 2004; Seixas, *et al.* 2010).

La garrapata *Boophilus* es conocida como la "garrapata común del ganado vacuno" o "garrapata común con ojos" y *R. microplus* específicamente como "garrapata tropical del ganado vacuno". *R. microplus* (SENASA, 2006), se encuentra principalmente en regiones tropicales (con lluvias regulares, alta humedad y clima cálido) y subtropicales (caracterizadas por temporadas de lluvias y sequías) en todo el mundo (Williams, 2010).

En México se han establecido esfuerzos para paliar este problema mediante una campaña contra la garrapata *R. microplus*, sin embargo algunos municipios donde había logrado erradicarse este ectoparásito, están siendo reinfestados (Rosario, 2006).

Actualmente en la república mexicana, los estados de Aguascalientes, Baja California, Chihuahua, Distrito Federal, Durango, Sonora y Tlaxcala se encuentran libres de garrapata; Baja California Sur, Campeche, Colima, Chiapas, Coahuila de Zaragoza, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, México, Michoacán de Ocampo, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro de Arteaga, Quintana Roo, San Luis Potosí, Sinaloa, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz, Yucatán, Zacatecas, se tiene control químico de las garrapatas Fig. 1 (SAGARPA-SENASICA, 2014).



Figura 1. Mapa de la campaña nacional contra la garrapata *Boophilus* spp. NOM-019-ZOO-1995. SAGARPA-SENASICA, 2014.

CICLO BIOLÓGICO

Rhipicephalus microplus es una garrapata de un solo hospedador (Quiroz, 1984). Su ciclo biológico está compuesto por cuatro estadios: huevo, larva, ninfa y adulto. Las hembras se alimentan de sangre hasta repletarse, mientras que los machos se alimentan por periodos cortos y no tan frecuente (Soulsby, 1987).

Su ciclo biológico se divide en dos fases: 1) fase no parasítica o de vida libre que inicia desde el desprendimiento de la teleogina (garrapata adulta ingurgitada) hasta la aparición de las larvas en la vegetación; 2) fase parasítica o de vida parasitaria, que comienza una vez que las larvas infestan al hospedero y termina con el desprendimiento de las teleoginas (Fig. 2). El ciclo biológico completo, que comprende la fase de vida libre y la fase parasítica puede completarse entre 40 y 300 días según las condiciones climáticas (Rosario, 2006)

La garrapata *R. microplus* se alimenta del animal por un período de tres semanas, pasa por los estadios de larva, ninfa y adulto y en las últimas 24 horas de la fase parasítica aumenta su tamaño más de cinco veces, se llena de sangre, se desprende y cae al suelo para buscar un sitio adecuado para ovipositar (Nuñez 1985).

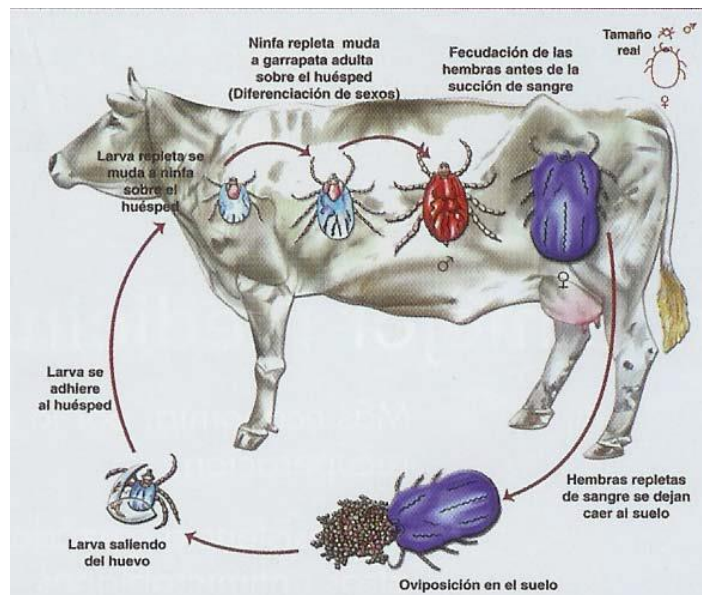


Figura 2. Ciclo biológico de *Rhipicephalus microplus*. Rodríguez-Vivas, et al., 2006.

Clasificación del ciclo de vida libre o fase no parásita:

a) Protoquia o preoviposición: el cual comprende desde el desprendimiento de la teleogina hasta la oviposición; en verano con una humedad relativa mayor al 80% y una temperatura de 28-30°C, tiene una duración de 2-4 días mientras que en invierno se amplía hasta 90 y 97 días (Rosario, *et al.*, 2006).

b) Ootoquia u oviposición, la cual transcurre desde el desove del primer huevo hasta el último; ésta fase dura de 13-15 días en verano y de 35-45 días en invierno (Núñez, 1985), aunque Rosario (2006) menciona que varía de 4 a 60 días dependiendo de factores ambientales notándose en promedio 20 días en laboratorio. Además, los factores climatológicos tienen efecto directo sobre los huevos y las fase no parasítica de la garrapata; se ha reportado que *R. microplus* oviposita 4.400 huevos aproximadamente (Quiroz 1984). Normalmente estos huevos se colocan en grietas o escombros, incluso debajo de las piedras (Soulsby, 1987).

c) Metatoquia o postoviposición, es la fase que ocurre entre el cese de la oviposición y la muerte de la teleogina, este periodo varía de 2 a 15 días siendo muy raros los especímenes que rebasan los ocho días (Nuñez, 1985).

d) Incubación, se define como el periodo desde que inicia la oviposición hasta el momento en que emergen las larvas, este es el estado del ciclo más susceptible a los factores ambientales debido a que la temperatura y humedad pueden acórtalo o alargarlo; se ha descrito un promedio de incubación de 15 días en verano y un máximo de 51 días en invierno y, en relación a lo reportado por Rosario (2006), este periodo varía de 14 a 68 días; Nuñez (1985) menciona que en condiciones de laboratorio el periodo de incubación dura 24 días.

e) Eclosión, es la etapa en donde la larva emerge del huevo. Bajo condiciones controladas de laboratorio con temperatura de 25-35°C y una humedad relativa del 95%, el porcentaje de eclosión es superior al 80% (Rodríguez-Vivas, *et al.*, 2006).

f) Vida de la larva libre, es el tiempo que ocurre desde la eclosión de la larva hasta el encuentro del hospedero; poco después de eclosionar las larvas suben al pasto ascendiendo hasta el extremo de las hojas donde se ubican preferentemente en la cara sombreada para evitar la luz solar, en este momento la larva espera la llegada del hospedero, quien es detectado mediante quimiorreceptores (Rosario, 2006) y se adhiere con las uñas (Soulsby, 1987). Se ha observado que en los meses húmedos ocurre una mayor viabilidad larvaria comparado con los meses secos, variando desde 22 días hasta 240 días y en estudios realizados *in vitro* el tiempo fluctúa entre 10 a 70 días en verano y hasta 250 días en invierno y otoño (Núñez, 1985).

Clasificación del ciclo de vida parásita.

El proceso que completa el ciclo de desarrollo de la garrapata lo constituye la fase parasítica que corresponde a una serie de eventos que ocurren en el hospedero y dura en promedio 21 días (Rosario, 2006); es la fase en donde la garrapata se alimenta de sangre del hospedero, realizándose también los procesos de muda o cambio de estadio de larva a ninfa y de ninfa a adulta. Esta fase es poco variable y se divide en tres etapas:

A) Etapa Larval, dura en promedio de 7 a 12 días y se caracteriza morfológicamente por la presencia de tres pares de patas y un hipostoma con doble hilera dentaria, una vez sobre el hospedero, las larvas se mueven rápidamente sobre de la piel del hospedero buscando los lugares más apropiados para fijarse generalmente en las zonas de piel laxa y con rica vascularización tales como la crural interna, flancos, patas delanteras, papada, cuello y borde anterior de las orejas donde en conjunto se localizan normalmente el 95% de la población parasitaria de *R. microplus*, en las primeras 24 horas la mayoría de las larvas se fijan en minutos y más del 90% comienzan a alimentarse de líquidos tisulares (Quiroz 1984, Nuñez, 1985,).

B) Etapa ninfal, comprende desde la muda de larva a ninfa así como la repleción de ésta para la segunda muda, la cual se da en un tiempo 5 a 17 días en

promedio respectivamente, en esta etapa se hacen presentes cuatro pares de patas y triple hilera dentaria en el hipostoma. Al final de esta etapa el dimorfismo sexual es evidente y las ninfas, después de alimentarse permanecen en el hospedero y emergen como adultos (Quiroz 1984, Nuñez, 1985).

C) Etapa adulta, llegando a esta etapa, la hembra adulta se alimenta por un período de 5 a 23 días, al igual que en la etapa ninfal las garrapatas presentan cuatro pares de patas con la diferencia que en ésta etapa existen ya cuatro hileras dentarias en el hipostoma. Después de 5 días comienzan a evidenciarse las hembras semirepletas y en un periodo de 0.5 a 2 días, se repletan por completo las hembras (Nuñez, 1985); se conoce que en las últimas 24 horas de esta etapa, la hembra emite feromonas para atraer al macho y llevar a cabo el apareamiento el cual es esencial para que las hembras se repletan por completo de sangre y se desprendan del hospedero para que pueda iniciar un nuevo ciclo; por otra parte el macho succiona sangre, sin repletarse, se aparea y nuevamente vuelve a comer para después buscar una nueva hembra para la reproducción, en forma sucesiva hasta su muerte (Rosario, 2006); cada macho puede fertilizar 18 hembras y permanecer en el hospedero hasta 48 días posterior a la muda. De las metaninfas de mayor tamaño y peso (50% de la población) y, posterior a la fecundación (4-6mm) ocurre el desprendimiento después de alcanzar un tamaño de 7-13mm de largo por 4-8mm de ancho (Nuñez, 1985).

En cada etapa de desarrollo (larva, ninfa y adulto) existe una sola alimentación que se realiza durante varios días (Soulsby, 1987).

IMPORTANCIA DE LA GARRAPATA

De forma global, se estima que el 80 % del ganado bovino del mundo está infestado con garrapatas y esto provoca pérdidas de 2,000 a 3,000 millones de USD (Botello *et al.*, 2011).

Estos ectoparásitos son designados como: ectoparásitos obligados, es decir que se sitúan sobre la piel del hospedador alimentándose de la sangre y tejidos tisulares de animales domésticos, salvajes y del hombre; éstos artrópodos representan un gran impacto negativo en el aspecto económico y zoonosológico en las explotaciones ganaderas debido a que afecta a bovinos en todas sus edades causando daños directos e indirectos (Alonso, *et al.*, 2006).

Daños directos. Las garrapatas provocan lesiones por la acción de sus piezas bucales en la piel induciendo efectos infecciosos además de una acción exfoliativa (Quiroz, 1984). Consumen grandes cantidades de sangre, inhibiendo funciones de inmunidad y el apetito del animal causando debilitamiento y anemia (Alonso, 2006).

El deterioro de la piel debido a las perforaciones producidas por el gnatosoma y abscesos que se desarrollan afecta de manera importante la industria del cuero ya que del ganado infestado se obtiene material de inferior calidad y en el caso de ganado lechero, estos abscesos frecuentemente están involucrados en el daño y pérdida de uno o más cuartos de la glándula mamaria con la consecuente disminución de la producción láctea (Rodríguez-Vivas, *et al.*, 2006). Existe también una disminución de la producción de carne por un efecto nocivo directo sobre la ganancia de peso de los animales y por tanto su crecimiento retardado (Muro *et al.*, 2004).

De acuerdo a la FAO (2003) cada garrapata adulta repleta de sangre ha demostrado reducir la ganancia de peso diaria en 0.6 g. en el ganado de engorda, además las pérdidas económicas que ocasiona *R. microplus*, por disminución en la ganancia de peso, se han estimado en 7.3 US dólares/animal/año. También se ha reportado que los animales infestados con garrapatas, reducen su consumo

alimenticio (4.37 kg) en comparación con animales no expuestos a garrapatas (5.66 kg) (Ojeda-Chi, *et al.*, 2011).

En México se estimaron pérdidas a la ganadería bovina de 48 millones de dólares anuales causadas por las garrapatas y enfermedades que producen por lo que se han utilizado fármacos para su control como organofosforados, piretroides, amidinas y endectocidas, sin embargo su uso continuo ha ocasionado la generación de garrapatas resistentes (Rodríguez-Vivas, *et al.*, 2010).

Daños Indirectos. Son representados básicamente por la dificultad en la aclimatación de razas seleccionadas y por la predisposición de este ganado a contraer enfermedades transmitidas por las garrapatas como la babesiosis y la anaplasomosis. Los protozoos y bacterias como *Babesia bovis*, *B. bigemina* y *Anaplasma marginale* causantes de estas enfermedades penetran por las perforaciones producidas en la piel, éstas enfermedades pueden llegar a ser agudas, crónicas e incluso provocar la muerte del animal (Alonso *et al.*, 2007). Las heridas derivadas de las picaduras en la piel pueden atraer a las moscas causantes de miasis, además existen restricciones comerciales por contaminación de productos y medio ambiente debido a la utilización de sustancias químicas para su control.

CONTROL

Existen dos formas de combatir al parásito, en el campo (fase de vida libre) y otro sobre el ganado bovino (fase parásita) sin embargo, el control se ha orientado generalmente hacia el combate de las formas parásitas. Actualmente en México existen seis grupos de productos químicos que se utilizan para el control de garrapatas en forma parásita: organofosforados, piretroides, amidinas, endectocidas, fenilpirazonas e inhibidores del desarrollo (Soberanes *et al.*, 2005 y Hernández, 2011).

En el caso de los inhibidores del desarrollo, se caracterizan por interferir principalmente en la formación de la quitina, impidiendo la formación de la cutícula del ectoparásito, por lo que se les considera inhibidores de las mudas y del crecimiento (Alonso-Díaz *et al.*, 2008).

Como métodos de control biológico se han empleado algunas especies de hormigas (*Pheidole megacephala*), ya que tienen un efecto depredador en la población de garrapatas. También se ha descrito que los hongos entomopatógenos poseen eficacia en el control de la garrapata *R. microplus*, en condiciones *in vitro* (López, Elkin *et al.*, 2009).

Se han introducido vacunas contra *R. microplus* como opción para el control de este ectoparásito, éstas vacunas contienen la proteína Bm86, la cual se encuentra en la superficie del intestino de la garrapata, por lo que cuando el bovino es vacunado se produce una reacción inmunológica mediada por anticuerpos, así, cuando la garrapata ingiere sangre del animal vacunado, los anticuerpos específicos producen lisis de las células del intestino de la garrapata (Willadsen *et al.*, 1989). En México se cuenta con la vacuna Gavac® que contiene el antígeno Bm86 recombinante rBm86, encontrándose una efectividad entre el 51 y el 91% (Rodríguez-Vivas, *et al.*, 2006).

RESISTENCIA DE LAS GARRAPATAS A LOS GARRAPATICIDAS

La aplicación indiscriminada de garrapaticidas ha ocasionado la aparición de cepas de garrapatas resistentes a nivel de campo, así como efectos perjudiciales para los animales (problemas de contaminación de la leche y de la carne con residuos de medicamentos), seres humanos y el medio ambiente (Alonso, et al., 2006).

En México los primeros problemas de resistencia a los ixodicidas aparecieron en 1981 en el Estado de Veracruz a los siete años de iniciados los tratamientos intensivos con los ixodicidas organofosforados, este problema obligó a realizar un cambio en los productos a utilizar en esas regiones, dando lugar al uso de los piretroides y amidinas. El uso de estos garrapaticidas se intensificó desde 1985 hasta 1993 en donde se detectó la doble resistencia a piretroides y organofosforados en Tamaulipas y posteriormente en toda la costa del Golfo de México (Fragoso, 2006).

La resistencia a ixodicidas es un problema creciente que necesita ser atendido ya que en este momento está afectando la competitividad de la ganadería y la economía de miles de productores en México (Domínguez, *et al.*, 2010). Todos estos aspectos refuerzan la necesidad de enfoques alternativos para el control de garrapatas (Canales, *et al.*, 2008). Para lograr nuevos enfoques es necesario ampliar el conocimiento en aspectos básicos de la biología, desarrollo y fisiología de la garrapata para, una vez entendido bien estos procesos se puedan desarrollar nuevas formulaciones que alteren el desarrollo y la fisiología de la garrapata.

MORFOLOGÍA DE LAS GARRAPATAS

La alimentación de las garrapatas es muy importante para la descripción de su tamaño y forma, ya que debido a ello varía su descripción (Cordero, *et al.*, 2002), estos ectoparásitos tienen morfología diferenciada entre familias, géneros y especies, así como entre las fases de su ciclo de vida (Cupp, 1991). Las garrapatas adultas son de forma oval, aplanadas dorso-ventralmente en estado de ayuno y globosas cuando están repletas, con un tamaño corporal que varía de 2-8mm hasta 2cm, y con una variación en su color de amarillo al café oscuro (Fig. 3) (Cupp, 1991 y Cordero, *et al.*, 2002).

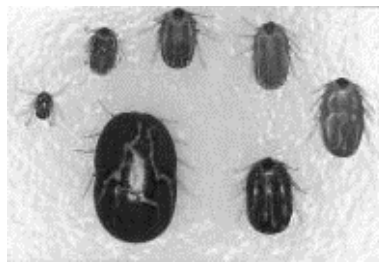


Figura 3. *Rhipicephalus microplus* (CaribVET, 2011).

Estos ectoparásitos presentan dos partes diferenciales visibles: el tronco globoso y extremidades articuladas (Beati y Keirans, 2001). En el extremo anterior del cuerpo tienen el capítulo o gnatosoma (Fig. 4), la cual no es una cabeza propiamente dicha, ya que el cuerpo de la garrapata es una sola masa, asimismo la forma de los apéndices bucales varía mucho entre géneros, especies e incluso, según la fase evolutiva dentro de una misma especie (Beati y Keirans, 2001; y Cordero, *et al.*, 2002).

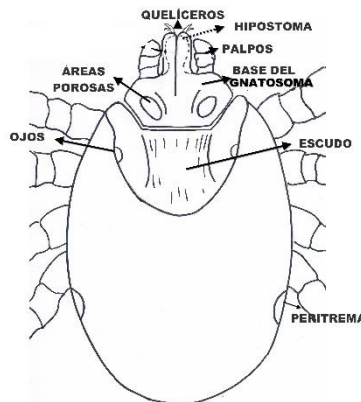


Figura 4. Morfología externa de la garrapata hembra *Rhipicephalus microplus*, vista dorsal.

De acuerdo a varios autores, el gnatosoma, antes llamado capítulo, es conocido como la cabeza falsa de la garrapata, el cual se compone de la base del capítulo, palpos, quelíceros e hipostoma (Don, 1960). La figura 5 muestra la base del capítulo por la cara dorsal de las hembras, donde se observan dos depresiones llamadas áreas porosas, que contienen las aberturas de unas glándulas cuya secreción interviene en la impermeabilización de los huevos (Cordero, *et al.*, 2002), en estas áreas sobresalen dos ganchos denominados quelíceros que ayudan a romper la piel del hospedero (Beati y Keirans, 2001); estas estructuras aparecen en número par, en forma de hoz, sobresalen de la parte dorsal del capítulo y se componen de un par de ejes, cada uno encerrados y rodeados de una cubierta interior, las cuales son invaginaciones de la cutícula producida a partir de la parte anterior del capítulo (Nuñez, 1985).

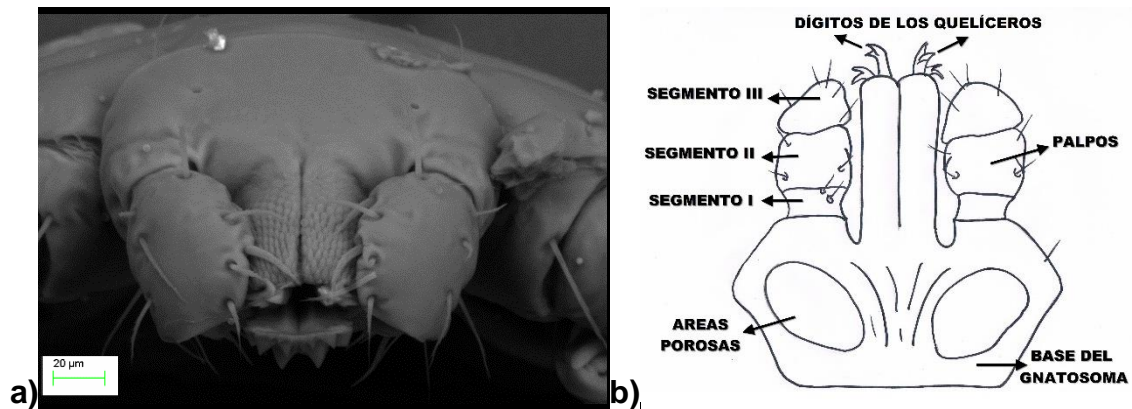


Figura 5. Gnatosoma de larva de *Rhipicephalus microplus*, a) Vista frontal del gnatosoma usando MEB b) Esquema vista dorsal del gnatosoma.

Por debajo de los quelíceros, se observa una prolongación de la base de gnatosoma llamado hipostoma (Fig. 6); está situado en la parte ventral del capítulo, entre los palpos y constan de dos piezas unidas en la línea media, su tamaño varía de una etapa a la siguiente, generalmente el hipostoma es aplanado dorso-ventralmente y su borde anterior es redondeado y se caracteriza por presentar en una posición subapical una corona dentada, y detrás de ella, filas de dientes, el número y la forma de las cuales varían en las diferentes etapas del ciclo de vida, así, en la larva hay cuatro filas (dos en cada una de sus partes) o 5-6 dientes cada uno, de los cuales los situados hacia el hipostoma base son más redondeado que el resto.

En la ninfa la fórmula es de 3/ 3 filas de 5-7 dientes cada uno. Para el caso de las hembras, la formula dentaria es de 4/4 filas de dientes con 11 a 12 elementos cada uno. Dentro de sus funciones en el hospedero, es perforar la piel además de participar como órgano de fijación (Nuñez, 1985 y Voltzit, 1996).

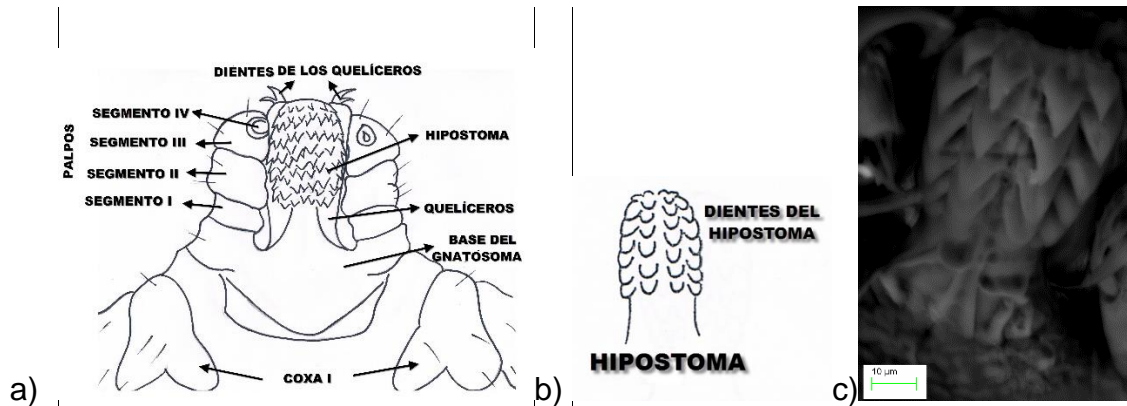


Figura 6. Extremo anterior de *Rhipicephalus microplus*. a) Esquema mostrando el hipostoma de una hembra, b) Esquema mostrando el hipostoma de una larva. c) Micrografía del hipostoma de larva usando MEB.

Los palpos, como se muestra en la (Fig. 7) son otro tipo de apéndice, producidos en los ángulos antero-lateral de la cabeza, en ambos lados del hipostoma, de los cuales cada uno consta de cuatro segmentos cilíndricos. En la larva estas estructuras se observan uniformes sin separación remarcable, en una vista ventral, no es posible distinguir una unión entre los segmentos I y II de los palpos, pero sí la unión entre el II y el III segmento pedipalpal, así como una membrana interarticular que une el III segmento del IV (Nuñez, 1985). Los segmentos, por ser distintos a los de las garrapatas blandas, su estructura es rígida para servir de estuche y proteger a los quelíceros e hipostoma, durante la toma de sangre se apartan a los lados, no interviniendo en la perforación de los tejidos (Voltzit, 1996).

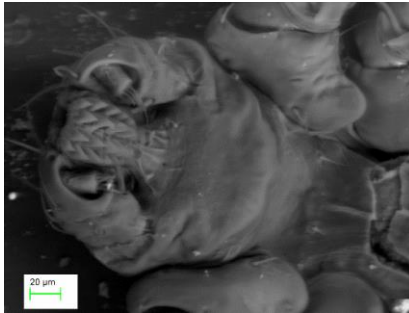
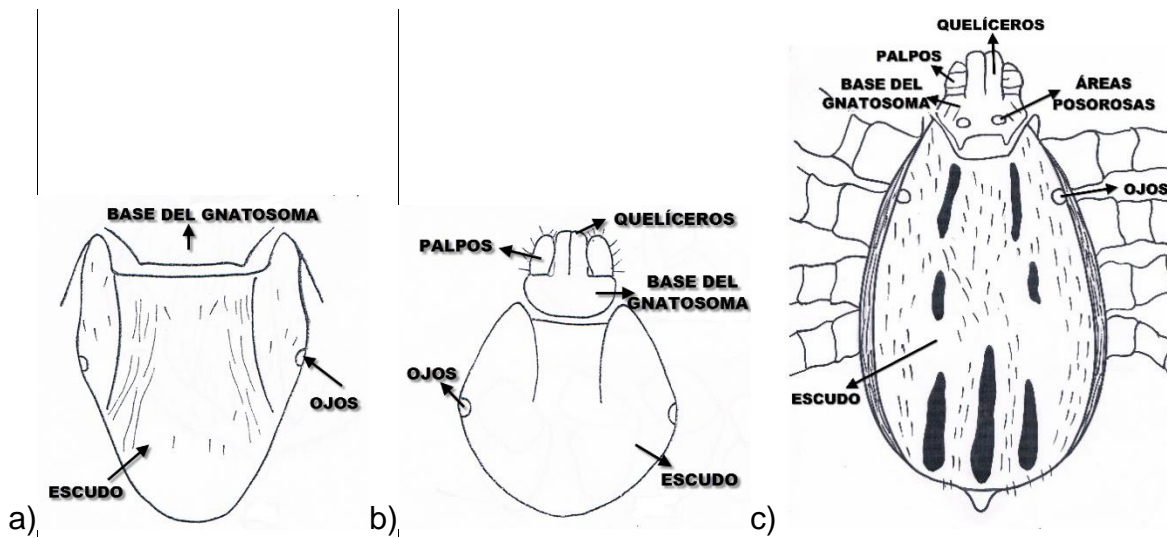


Figura 7.Extremo anterior de larva *Rhipicephalus microplus*, vista ventral mostrando los palpos usando MEB.

En las larvas, ninfas y hembras, la parte anterior de la cara dorsal del idiosoma está cubierta por el escudo (Fig. 8); éste en los machos, cubre toda la cara dorsal, lo que permite reconocerlos a simple vista. Los ojos, se sitúan uno a cada lado de los márgenes del escudo a la altura aproximada del segundo par de patas (Cordero, *et al.*, 2002). En las larvas el escudo ocupa cerca de tres quintas partes de la longitud del cuerpo, con una longitud de 0.29-0.33mm y ancho de 0.40-0.43mm aproximadamente, tiene surcos cervicales cortos y profundos, con superficie lisa y brillante (Don, 1960).



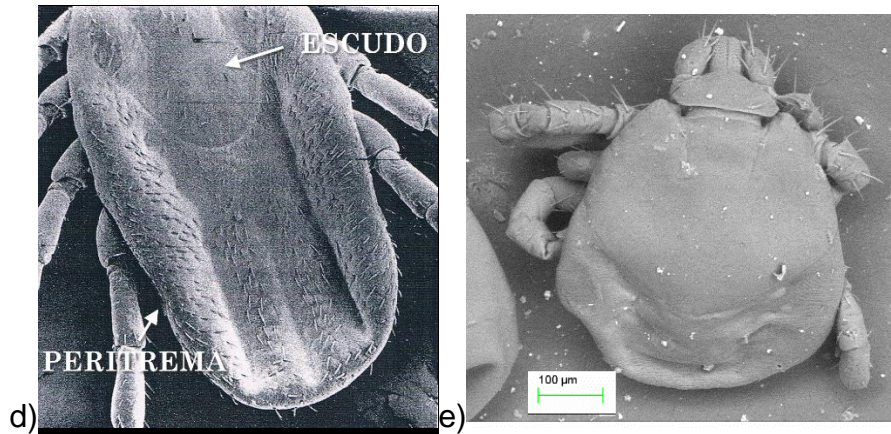


Figura 8. *Rhipicephalus microplus*. a) Escudo de hembra, b) capítulo y escudo de larva, c) vista dorsal del macho mostrando el gnatosoma y escudo y d) Vista dorsal de hembra (modificado de Nuñez, 1985) e) Vista dorsal de larva mostrando el escudo usando MEB.

Enseguida aparecen las extremidades con seis artejos: coxa, trocánter, fémur, tibia, pretarso y tarso, los adultos y las ninfas poseen estigmas y se sitúan en el último par de coxas, mientras que las larvas carecen de ellas (Cupp, 1991).

La garrapata *R. microplus* presenta espina caudal por el dorso, que puede observarse desde el vientre, la coxa I, presenta dos espolones en forma de triángulo; el interno es más ancho y largo que el externo, Las coxas II y III, presentan dos espolones de borde redondeado y una escotadura profunda. La figura 9 muestra las coxas en las hembras, en la cual la coxa I es triangular más larga que ancha con sus dos espolones redondeados casi iguales, que se dividen por una profunda hendidura en forma de V invertida, la coxa II tiene dos espolones ampliamente redondeados y más separados. Para el caso de las larvas, las patas son cortas y pesadas (Don, 1960).

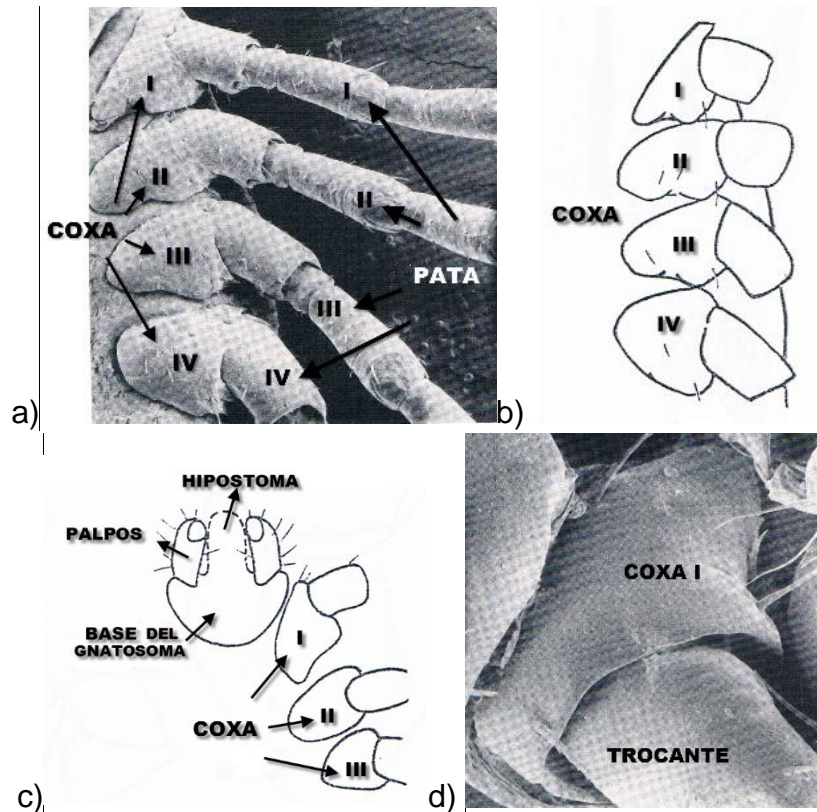


Figura 9.Extremidades de *Rhipicephalus microplus*. a) Extremidades podales de hembra de I – IV Vista ventral (modificado de Nuñez, 1985), b) Esquema de coxas de hembra de I –IV, c) Esquema gnatosoma y coxas de una larva, d) Vista ventral de la coxa de la primera pata de garrapata (Modificado de Nuñez 1985).

La fase larvaria presenta tres pares de patas, como los insectos, en cambio en las fases de ninfa y adulta poseen cuatro pares de patas que la distinguen de los insectos (Fig. 9) (Cupp, 1991). De estas extremidades, el primer par, además de tener una función locomotora tienen otra sensorial, incluyendo algunas ocasiones la función de antenas, es por ello que llevan en el tarso el llamado órgano de Haller (Fig. 10), en el que se concentran varios tipos de sedas (pelos) que perciben la temperatura, humedad, olor y vibraciones, entre otros estímulos. En todas las fases evolutivas de las garrapatas, pero particularmente en las fases inmaduras, la morfología de las sedas y su distribución son los caracteres más importantes en la clasificación de las especies (Cordero, *et al.*, 2002).

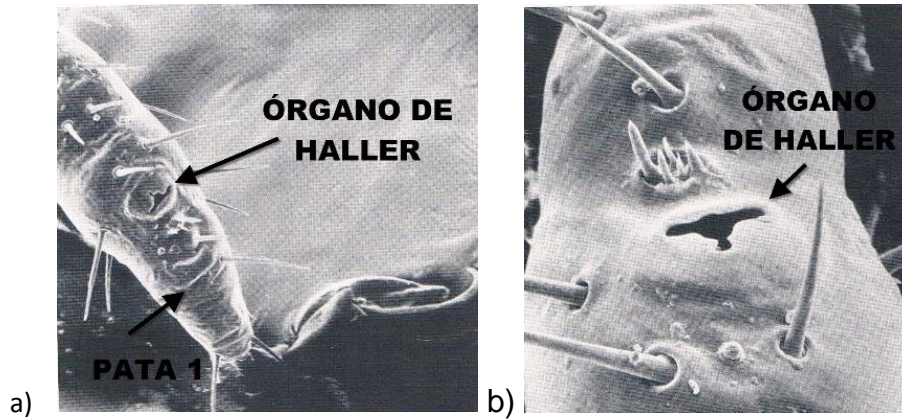
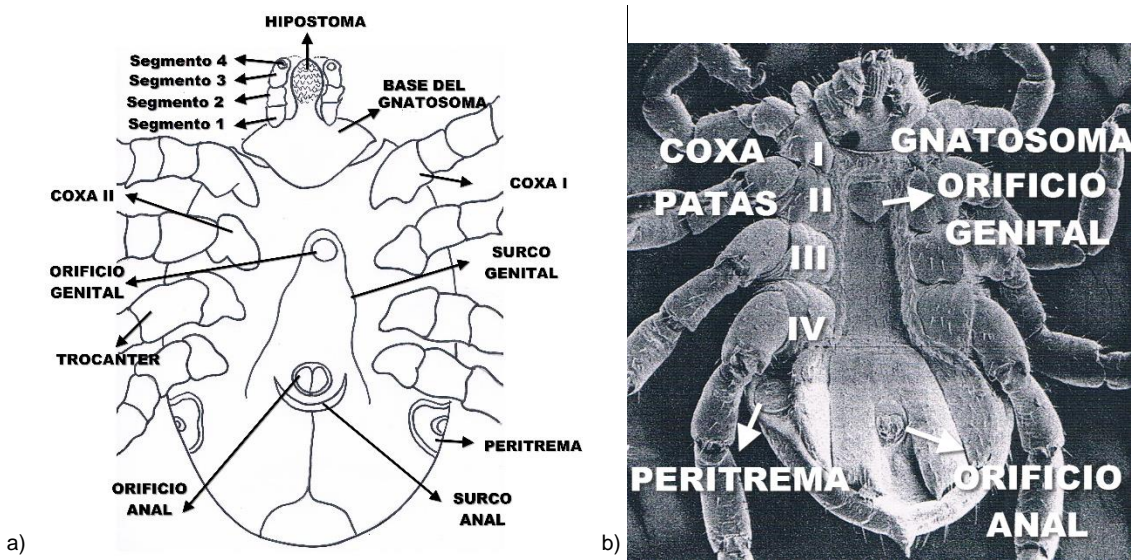


Figura 10. Primera extremidad podal de *Rhipicephalus microplus*. a) Tarso de la primera extremidad podal de larva *Rhipicephalus microplus* y b) órgano de Haller (modificado de Nuñez, 1985).

En los adultos, por la cara ventral, se observan dos aberturas; la anterior es la genital y la posterior, el ano. En los postriata (Ixodidae) el ano está rodeado anteriormente por el denominado surco anal como se muestra en la figura 11, que tiene forma de U invertida. Los machos, en los alrededores del ano pueden encontrarse placas esclerosadas, que se utilizan también en la diferenciación de especies (Cordero, *et al.*, 2002).



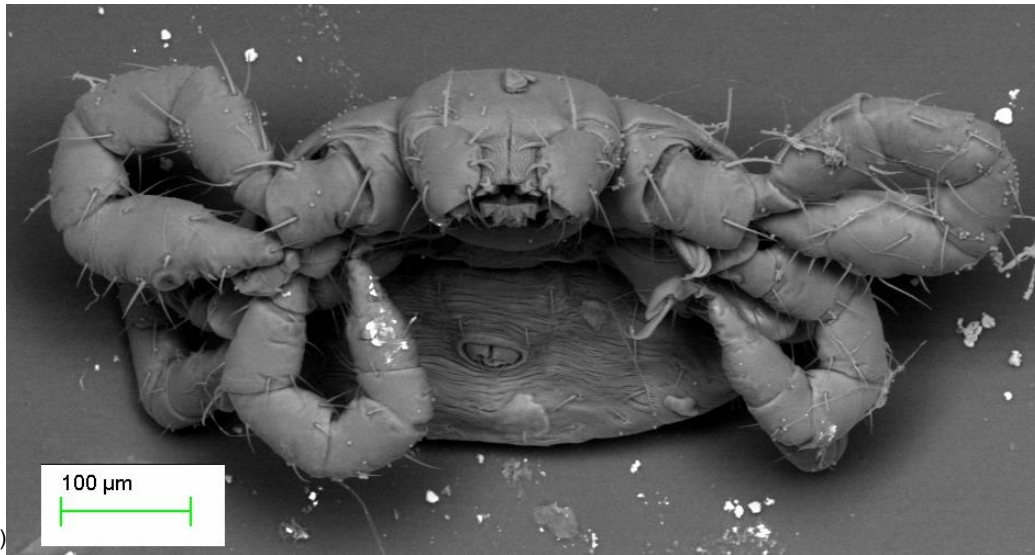


Figura 11. Morfología externa *Rhipicephalus microplus*. a) Vista ventral, características de hembra b) Vista ventral características de macho adulto, (modificado de P. Arrieta, citado en Nuñez, 1985). c) Vista fronto-ventral de larva usando MEB.

Las placas adanales presentan en su borde posterior una escotadura, de donde se origina una espina hacia el extremo interno; las placas accesorias son agudas en su borde posterior y dejan visible la espina caudal, se puede señalar que entre la hembra y el macho existe diferencia en la coxa I, ya que en la hembra, es casi tan larga como ancha y los espolones son redondos. Por otra parte, la coxa IV puede poseer un pequeño espolón o carecer de él (Cupp, 1991).

Las placas espiraculares, placa estigmal o peritrema, son un par de placas respiratorias situadas ventro-lateral y posterior de la coxa IV a cada lado del cuerpo, las cuales pueden ser circulares, ovaladas o en forma de coma sí se observa debajo de la prolongación dorsal (fig. 11). Estas placas espiraculares o canales se aprecian como poros en la cutícula, cuya función es de protección, esta última estructura mencionada, posee tres capas: epicutícula, mesocutícula y endocutícula, este sistema de protección tiene la particularidad de sufrir elongaciones de hasta 20 veces su tamaño original cuando está repleta de sangre (Spickett, 1994).

EMBRIOLOGÍA EN ARTRÓPODOS.

El subphylum *Chelicerata* es un grupo importante desde el punto de vista evolutivo, ya que se han encontrado muchos fósiles de este grupo que demuestra la evolución de los artrópodos (Beatty y Marquardt, 1996).

Existen diferentes quelicerados que han sido estudiados entre ellos, los ácaros, escorpiones y el quelicerado más ancestral, el cangrejo *Limulus polyphemus*, (Mittman y Wolff, 2012). Se informa que los crustáceos pertenecen al conjunto de segmentación espiral y que algunas características básicas de desarrollo de los quelicerados muestran semejanza con las características correspondientes en crustáceos, sin embargo, estos rasgos son aislados y que pueden ser el resultado de una evolución convergente (Gupta, 1979). En las garrapatas no se encuentra segmentación espiral (Schwartz, 1977); por lo que el desarrollo de crustáceos no puede ser utilizado para apoyar una afinidad con otros artrópodos.

La clase *Arachnida* incluye arañas, escorpiones y ácaros, parientes más cercanos a la garrapata, además, hay que tener en cuenta que el término ácaro incluye tanto las garrapatas como a los ácaros a pesar de que generalmente se clasifican por separado, ya que las garrapatas son ácaros gigantes y aunque tienen algunas características distinguibles, se les conoce por separado sólo por ser tan grandes (Beatty y Marquardt, 1996).

Una estrategia común en el campo de la investigación de la evolución del desarrollo, es comparar dicho desarrollo de organismos modelo debido a su posición filogenética (Wolff y Hilbrant, 2011).

Drosophila melanogaster, artrópodo conocido popularmente como “mosca de la fruta”, es uno de los principales modelos para el estudio de la embriología, puesto que se conocen mejor los detalles moleculares de este fenómeno que en ningún otro animal (Watson, *et al.*, 2004).

El hecho de escoger a *Drosophila melanogaster* como modelo experimental para estudiar los fenómenos básicos del desarrollo ha sido debido a la confluencia de los estudios de embriología, genética y biología molecular; además, la amplia

conservación de los genes clave en vías de desarrollo identificados en *Drosophila*, refuerzan la conjetura por la cual los mecanismos básicos que rigen el desarrollo son de relevancia general (Robin, *et al.*, 1999).

En general no hay comparación embriológica de los ácaros con otros grupos de artrópodos, esta escasez se debe en gran parte a los problemas técnicos y biológicos, por ejemplo el tamaño pequeño y la estructura centrolécica de los huevos de muchas especies, lo que ha retrasado la preparación (fijación, seccionamiento), el examen y la descripción (Beaty y Marquardt, 1996).

Sin embargo, una visión general de la embriología de *Ornithodoros moubata* está disponible en la cual se proporcionan datos comparativos, pero también se describen las diferencias en la embriogénesis entre los ácaros y los insectos (Beaty y Marquardt, 1996).

No obstante, en la actualidad existen dos especies de arañas (*Cupiennius salei* y *Parasteatoda tepidariorum*) consideradas como organismos modelos para el estudio de la evolución y desarrollo, debido a sus ventajas en cuanto a mantenimiento, número de capullos producidos por unidad de tiempo y la duración del tiempo de desarrollo, en la cual *P. tepidariorum* ofrece una mayor ventaja (Mittmann y Wolff, 2012), debido a la expresión de genes en embriones de arañas, se ha propuesto que, el límite parasegmental es un rasgo conservado en el desarrollo de los artrópodos, además de que las dos especies se complementan una a otra, como organismos modelo de laboratorio para la comparación de la embriología de quelicerados, con las de otros grupos taxonómicos principales de artrópodos (Wolff y Hilbrant, 2011).

En *Drosophila melanogaster* el nuevo individuo es producto de la fecundación, por parte de un espermatozoide procedente de un macho al óvulo maduro de una hembra, para dar lugar a un cigoto diploide con sus propias características. Tras la fecundación, el cigoto inicia una sucesión de divisiones casi sincrónicas en las regiones centrales del huevo, que dan lugar a la aparición de un sincitio y, tras nuevas divisiones se establece una monocapa de células en la periferia del agregado, que albergan al vitelo central, esta membrana en insectos es denominada

blastodermo sincitial, el cual ya determinado es responsable de que el desarrollo temprano sea bidimensional. (Wolpert *et al.*, 2002).

El huevo en ácaros está encerrado por un corion exterior y una membrana vitelina interior, el huevo es normalmente centrolécito (la yema se concentra en el centro del huevo) con un periplasma distinto, es decir el núcleo del oocito está rodeado de citoplasma que conecta al exterior con un retículo citoplasmático interno al que están unidos gránulos de yema (Krantz y Walter, 2009).

De la información que se conoce sobre la garrapata del ganado *R. microplus* es que durante su embriogénesis, no sintetiza hemo para hacer sus hemoproteínas, sino que se basa únicamente en la recuperación de la hemo de la dieta, por lo que ésta es una reserva para el desarrollo del embrión en forma de gránulos de yema (Logullo, et al., 2002).

En *O. moubata*, después de la división nuclear de la fertilización se producen divisiones nucleares sincrónicas y migran a la superficie del huevo en donde se forma un blastodermo celular uniforme que rodea el saco vitelino; los vitelofagos primarios permanecen en la yema. En garrapatas, el blastodermo se refiere a menudo como una periblástula, y la cavidad llena de yema, el blastocele. Aeschlimann (1985) (citado por Beaty y Marquardt, 1996) sugirió que los vitelófagos primarios permanecen intactos durante la embriogénesis y contribuyen a la formación del epitelio intestinal.

Cada núcleo de migración está rodeado por un halo de citoplasma no encerrada por una membrana celular, los núcleos que se mueve a la superficie de la masa de yema de huevo y forman el blastodermo, posteriormente da lugar al ectodermo. Las células inicialmente tienen forma de huso bien separados, pero con el tiempo forma una capa de células cúbicas (Krantz y Walter, 2009).

Ciertas células a lo largo del blastodermo forman una agregación distinta de células (primordio germinal) que formará la parte ventral del embrión, esta masa prolifera en la yema y se llama disco germinal, demarca el telson (somita que se

encuentra al final del abdomen) del embrión; la aparición y migración de este disco, indica gastrulación (Beatty y Marquardt, 1996). Durante las primeras etapas de la gastrulación el disco germinal ventral se desarrolla como una banda en forma de embudo en la masa de yema de huevo, el desarrollo de esta agregación celular representa la capa interna (mesodermo), mientras que las células blastodérmicas exteriores forman el ectodermo.

El germen de la banda se alarga y da lugar a los lóbulos cefálicos, después de lo cual los segmentos prosomáticos con yemas de las extremidades se diferencian en segmentos de las patas I- III, después un pedipalpo, pata IV, y los segmentos quelicerales; por otro lado aún no se tiene gran información del metamerismo opistosomal, lo que se conoce a la fecha es que pueden presentarse cinco segmentos y el telson (Krantz y Walter, 2009). La proliferación celular se produce en sentido anterior de manera que se forma un lóbulo cefálico (acron), los vitelófagos primarios y una capa de endodermo (derivado desde el disco germinal como células proliferativas internas), posiblemente juegan un papel en la formación del intestino medio (Beatty y Marquardt, 1996).

La segmentación comienza de forma anterior formando el prosoma que es la porción locomotora del cuerpo, inicialmente se distinguen tres segmentos ambulatorios después del pedipalpo y algunos segmentos secundarios ambulatorios, así como segmentos quelicerales, seguidos de cinco segmentos abdominales que se unen con el telson para completar la formación del opistosoma; la formación del cordón nervioso ventral es similar a la de los insectos y comienza en la etapa de banda germinal a lo largo del surco neural central, conocido como surco ventral (Beatty y Marquardt, 1996). El intestino medio y el estomodeo se unen y desplazan el synganglion dorsalmente, se forma una hipodermis que posteriormente dará lugar a la cutícula embrionaria (Krantz y Walter, 2009).

La banda de germen se mueve sobre la superficie de la masa de yema de huevo y conduce al esquema de desarrollo de la larva de seis patas, parte de este proceso implica el fracaso del desarrollo de los “brotes” del cuarto par de patas en el embrión, es decir que permanecen como brotes cuando los demás miembros

comienzan a crecer y aunque la musculatura basal y los nervios de este 4to par de patas desarrollan normalmente, la cutícula larval cubre las yemas de estas extremidades. En muchas especies de ácaros este par de terminales de patas aparece en la muda de la larva hexápodo a ninfa octopoda (Beaty y Marquardt, 1996; Krantz y Walter, 2009).

Las partes principales del cuerpo de los ácaros generalmente difieren de la de los insectos, pero también se pueden dividir en tres unidades: gnatosoma, prosoma y opistosoma, los últimos dos a menudo se fusionaron en una sola unidad funcional nombrada como idiosoma (Beaty y Marquardt, 1996).

A pesar de su importancia, la embriogénesis de las garrapatas no se ha estudiado a detalle y por lo tanto la información sobre el desarrollo y los eventos involucrados en la formación del embrión de la garrapata es apenas disponible (Sonenshine, 1991 y Seixas, y col. 2012). En la actualidad se ha comenzado a evaluar la morfología de los embriones de garrapata sobre todo en las primeras fases de su desarrollo (Campos y col. 2006).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Una de las actividades primarias que se ha desarrollado con el paso del tiempo es la ganadería, la cual tiene un valor importante en el aspecto socioeconómico del país generando una importante cantidad de divisas que se obtienen de la venta de pie de cría, además, las personas que se dedican a la ganadería se ven beneficiadas por la venta de sus diversos subproductos. Sin embargo la industria ganadera se ha visto afectada por parásitos y las enfermedades que transmiten al ganado bovino, específicamente la presencia de garrapatas causando daños directos e indirectos; ejemplo de ello es la baja producción de leche y menor conversión alimenticia a causa de la anemia provocada por la succión de sangre de estos artrópodos, así como la transmisión de patógenos causantes de enfermedades al ganado como Babesiosis y Anaplasmosis, las cuales originan grandes pérdidas económicas a los productores y al país. Otro de los problemas que se ha venido originando en relación a este ectoparásito es la aparición de cepas resistentes a los métodos de control químico, pues en un principio se recurría a insecticidas inorgánicos que en su momento fueron remplazados por insecticidas organoclorados, organofosforados y carbamatos, los cuales con el correr del tiempo, algunas cepas de garrapatas adquirieron resistencias a estos productos incluso los más recientes como el amitraz, por lo cual deben sustituirse como tratamiento en el control de esta parasitosis. No obstante la mayoría de los investigadores han trabajado en buscar una nueva solución al problema que causa este ectoparásito, sin detenerse a preguntar primero cuestiones generales de la biología de esta garrapata, pues es de considerar el conocer primero su biología, en especial aquellos aspectos básicos como es el caso de la embriología de *R. microplus*, pues a la fecha no se tiene gran información que aborde los eventos por los que pasa durante su desarrollo como embrión, por otro lado se puede tener una mayor profundización en el conocimiento de este organismo que ayude a identificar nuevos puntos críticos que ayuden a frenar su ciclo y tener mayor control de esta plaga.

OBJETIVOS

Objetivo General

Conocer y caracterizar la embriogénesis de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* a partir de huevos ovipositados hasta la eclosión.

Objetivos Específicos

1. Obtener y cultivar huevos de garrapata *Rhipicephalus microplus*.
2. Estandarizar técnicas de microscopía que permitan la visualización idónea de la morfogénesis de la garrapata.
3. Fijar y visualizar el desarrollo del ectoparásito en periodos de 24 horas desde el inicio de la oviposición a la eclosión, mediante técnicas de microscopía óptica.
4. Determinar las fases de desarrollo del embrión con base en el análisis de las imágenes obtenidas al microscopio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de garrapatas repletas y huevos ovipositados.

Las garrapatas *R. microplus* que se utilizaron para este estudio, fueron colectadas de bovinos previamente infestados con este artrópodo y mantenidos en el Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria (CENID-PAVET) ubicados en Jiutepec estado de Morelos, México.

Una vez iniciada la oviposición, se colectaron y desecharon los huevos de las primeras 48 horas debido al bajo porcentaje de viabilidad (datos no publicados), posteriormente se obtuvieron los huevos ovipositados a las 72 horas y se mantuvieron en una estufa a 28°C con una humedad relativa del 80% (Miranda–Miranda et al 2009).

Fijación de los embriones

Fijación de huevos de garrapatas. Para frenar el desarrollo de los embriones se utilizó una solución de fijación a base de paraformaldehído, en la cual se tomó 8ml de buffer amortiguador PBS (solución salina buferada), se pesaron 0.400gr de paraformaldehído y se colocaron en un matraz de 25ml, se calentaron los 8ml de PBS en horno de microondas por 10 segundos y se adicionaron al matraz que contenía el paraformaldehído, se homogeneizó la solución con la adición de 6µl de hidróxido de sodio (NaOH), se ajustó el pH a 7.5 con la incorporación de 7µl de ácido clorhídrico (HCL), por último la solución se filtró con un filtro de 0.22µm y se aforó a 10ml. Para la fijación de los embriones, se adicionó 5ml de solución fijadora en un vial y se incorporó un un mililitro de heptano añadido lentamente con la finalidad de formar 2 fases, posteriormente se tomó con la punta de una espátula una pequeña muestra de huevos de *R. microplus* y se colocaron en una canastilla con unas membranas de “Nytech” y se descorionaron sumergiéndolos y sacándolos repetidamente en 10ml de hipoclorito de sodio al 5% (NaCl) por cinco minutos, transcurrido el tiempo se realizaron lavados con buffer amortiguador PBS hasta eliminar residuos de NaCl. Los huevos lavados se colocaron en la interface entre la solución fijadora y el heptano y se incubaron por 20 minutos con movimientos circulares suaves; se prosiguió a realizar tres lavados con metanol en agitación

rápida y violenta eliminando la fase de abajo la mayor cantidad posible en cada lavado y se guardaron en metanol a -20°C (Ashburner. 1989).

Visualización de embriones por microscopía de epifluorescencia (Tinción de ADN)

Esta técnica es utilizada para localizar proteínas u otras moléculas en células y tejidos; por lo cual el principio de la epifluorescencia se basa en que las moléculas fluorescentes absorben la luz de una determinada longitud de onda y emiten luz de otra longitud de onda menos negativa y más larga. Si un compuesto es iluminado a su longitud de onda absorbente y visualizado a través de un filtro que sólo permita pasar la longitud de onda de la luz emitida, el compuesto aparece brillante sobre un fondo oscuro (García, 2004).

El 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) es específico para ADN que fluoresce cuando el colorante se entrelaza con la doble hélice, tiñéndola de azul (Haugland, 2002); su máximo de excitación es de 358nm y la emisión máxima es de 461nm éste se une al surco menor del ADN en lugares ricos en secuencias A-T (Adenina-Timina) y se une por intercalación en lugares con abundancia de secuencias G-C (Guanina-Citosina) que son uniones de tipo no covalentes.

A aproximadamente 5mg de embriones fijados, en un tubo tipo eppendorf de 2.5 ml, se les realizó un lavado con PBS/Tritón X100 al 0.1% por cinco minutos y se eliminó el sobrenadante, se adicionó un mililitro de PBS/Tritón X100 al 0.1% DAPI (2:5000) (Invitrogen, USA) y se incubó por 20min, transcurrido el tiempo, se eliminó el sobrenadante y se realizaron tres lavados con un mililitro de PBS/Tritón X100 al 0.1% por cinco minutos cada lavado; la muestra se montó colocando 160µl de Citifluor® en el centro de un portaobjetos y posteriormente se adicionó la muestra evitando dejar burbujas, se colocó el cubreobjetos y se revisó que no quedara aire, en su defecto se adicionó la cantidad necesaria de citifluor para eliminar el aire existente, se selló el portaobjetos con el cubreobjetos, barniz y se visualizó la muestra en el microscopio de epifluorescencia (Molecular Probes).

Visualización de embriones de garrapata con microscopía invertida.

Se colocó una gota de agua destilada en un portaobjetos limpio, se adicionó la punta de una espátula (aproximadamente cinco miligramos) de huevos de garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* viables evitando dejar burbujas, se colocó el cubreobjetos y se visualizaron en el microscopio de luz invertida. Este proceso se realizó cada 24 horas una vez iniciada la oviposición hasta la eclosión.

Edición de fotos de microscopía de fluorescencia y de luz invertida.

Para iniciar la edición de las imágenes se mejoró su calidad (brillo, contraste, nitidez y exposición) mediante el programa Microsoft Office Picture Manager 2010; una vez logrado este objetivo, se editaron con el programa de uso libre, Snagit 10 Editor (*TechSmith Corporation*), en el cual se colocaron con claves las diferentes estructuras que se logran apreciar en cada una de las fotos más representativas que denotan el desarrollo del embrión de la garrapata (Cuadro 1).

Las imágenes de larvas de microscopía electrónica de barrido (MEB) presentadas en la sección revisión de la literatura (figuras 5a, 6c, 7, 8e y 11c), fueron tomadas de larvas congeladas a -20 y procesadas por Carl Zeiss de México, S.A de C.V usando el microscopio Zeiss EVO modelo 40.

RESULTADOS

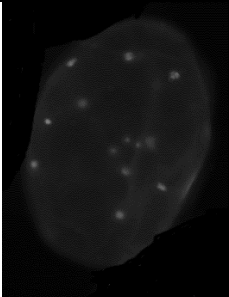
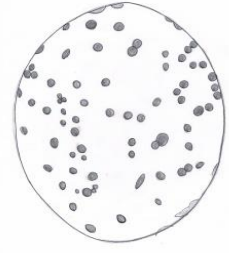
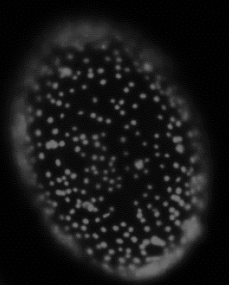
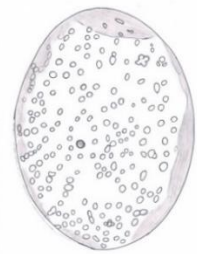
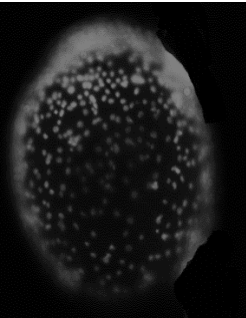
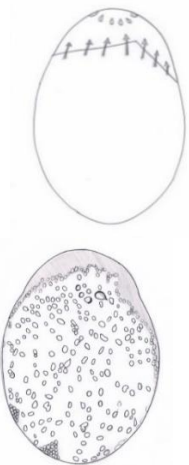
Se fijó una series de 26 muestras de huevos de garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, correspondiente a los 26 días que duró la embriogénesis de la muestra colectada.

Se obtuvieron 828 fotografías de embriones teñidos con DAPI y 349 fotografías tomadas en fresco con microscopio óptico invertido.

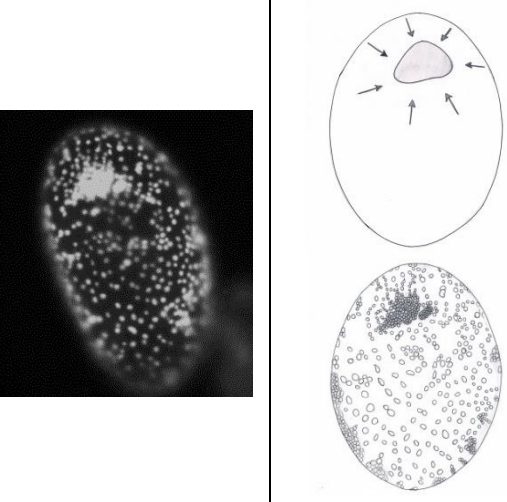
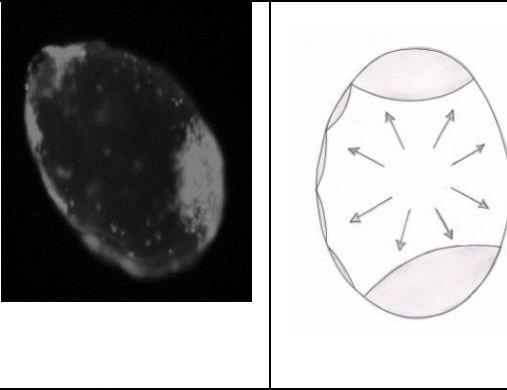
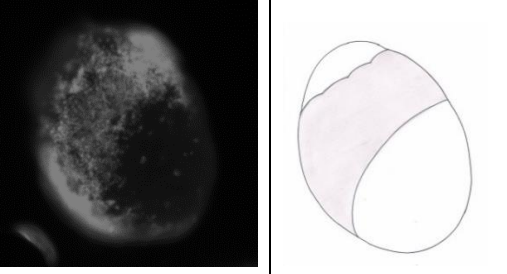
A partir de Las fotografías obtenidas con DAPI se identificaron 14 etapas distintivas del desarrollo embrionario con diferentes tiempos de duración indicados en los Cuadros 2-5 y en detalle en las figuras 12-26. Estas etapas se designaron mediante la comparación con los modelos arácnidos *Cupiennius salei* y *Parasteatoda tepidariorum*, en este mismo cuadro se presenta un esquema que representa de forma general, los cambios que sufre el embrión en las diferentes etapas que pasa durante su desarrollo.

Las fotografías tomadas al microscopio invertido se presentaron de la figura 12 en adelante. Las fotografías obtenidas en DAPI muestran mayor contraste y se distinguen mejor las estructuras cuando son observadas en grises, por lo que se presentan en este modo las imágenes.

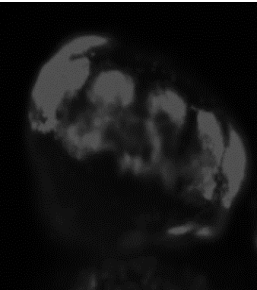
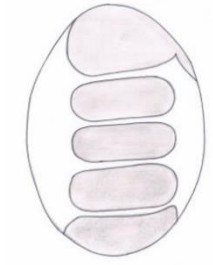
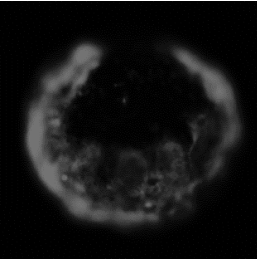
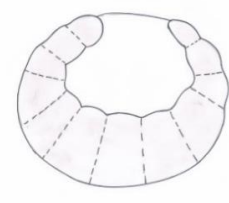
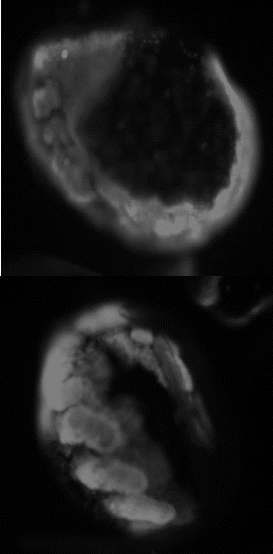
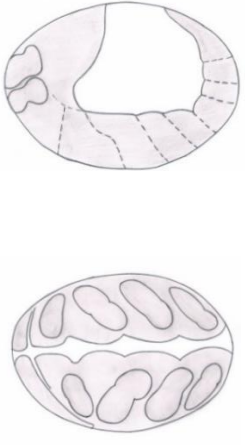
Cuadro 1: Etapas de desarrollo embrionario de la garrapata *Rhipicephalus microplus*. Tinción nuclear con DAPI y esquemas ilustrativos.

ETAPA		DÍAS	TINCIÓN NUCLEAR	ESQUEMA CORRESPONDIENTE	DESCRIPCIÓN
1	Primeras Divisiones	1-3			Los puntos brillantes de la tinción nuclear, así como los puntos grises dibujados en el esquema, simbolizan los núcleos que indican las primeras divisiones celulares.
2	Blastodermo	4			Las zonas más densas en color claro de la tinción y las áreas grises en el esquema, revelan una mayor densidad de núcleos, en los cuales se observa el movimiento de las células a la superficie del huevo.
3	Placa primitiva	5			La imagen de DAPI y en los esquemas, dejan ver el engrosamiento primario, que se observa como una masa densa de núcleos. Las flechas del primer boceto indican la dirección en que se movilizan los núcleos, formando una pequeña joroba en el mismo polo donde posteriormente se formó el blastoporo.

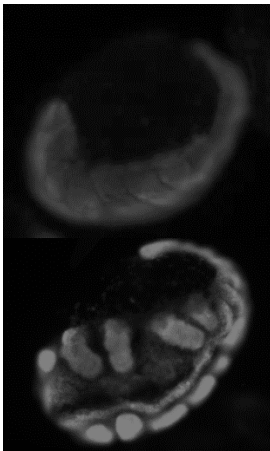
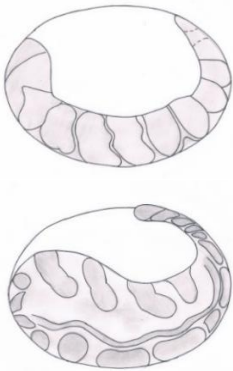
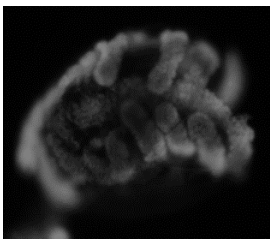
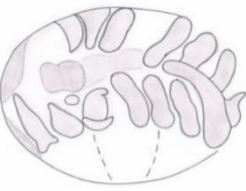
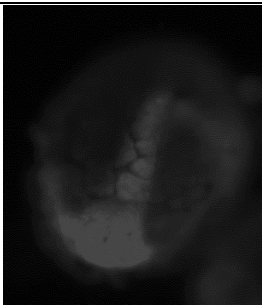
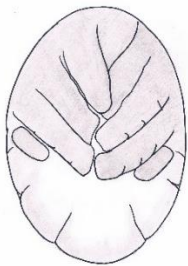
Cuadro 2. Etapas del desarrollo embrionario de la garrapata *Rhipicephalus microplus*. Tinción nuclear con DAPI y esquemas ilustrativos de la etapa 4-6.

ETAPA	DÍAS	TINCIÓN NUCLEAR	ESQUEMA CORRESPONDIENTE	DESCRIPCIÓN
4	Blastoporo	6		Las flechas del esquema superior marcan la dirección en que se movilizan los núcleos hacia uno de los polos, por lo que la imágenes en DAPI y los diseños muestran el blastoporo como una masa celular más densa .
5	Establecimiento del eje dorso-ventral	9		Las flechas del esquema indican la dirección en que se movilizan las células de tal forma que dejan un área con menor densidad celular, nombrándose a esta área, campo dorsal, y la masa de tejido ventralmente formará el embrión, en el cual se establece el eje dorso-ventral.
6	Banda Embrionaria	9		Para esta etapa, se observa en la imagen con DAPI y en el diagrama, una banda la cual está formada de un gran número de células alineadas ventralmente.

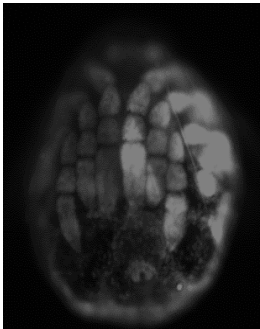


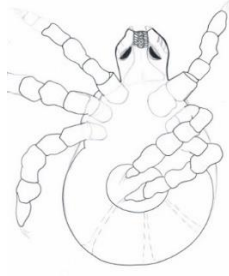
Cuadro 3. Etapas del desarrollo embrionario de la garrapata *Rhipicephalus microplus*. Tinción nuclear con DAPI y esquemas ilustrativos de la etapa 7-9.

ETAPA		DÍAS	TINCIÓN NUCLEAR	ESQUEMA CORRESPONDIENTE	DESCRIPCIÓN
7	Segmentación de la banda embrionaria	9			La etapa siete está caracterizada por la división horizontal de la banda germinal formada en la etapa anterior, se distinguen algunos segmentos gnatosomales como idiosomales.
8	Brotos de las extremidades	9-11			La banda germinal se ha extendido hasta casi cerrar el huevo, al mismo tiempo se observa con mayor detalle las divisiones de lo que formarán las extremidades podales.
9	Diferenciación de las extremidades	12			Las imágenes superiores (DAPI y diagrama) muestran los segmentos que se han formado hasta este momento, asimismo se observa una mayor densidad celular en la parte anterior. Las imágenes inferiores muestran cómo durante esta misma etapa es posible observar con mayor detalle las estructuras como el surco ventral, patas y pedipalpos.

Cuadro 4. Etapas del desarrollo embrionario de la garrapata *Rhipicephalus microplus*. Tinción nuclear con DAPI y esquemas ilustrativos de la etapa 10-12.

ETAPA	DÍAS	TINCIÓN NUCLEAR	ESQUEMA CORRESPONDIENTE	DESCRIPCIÓN	
10	Diferenciación del tejido neuronal	13			Etapa donde se ha definido con mayor precisión la zona pre-gnatosomal e idiosomal, así como una serie de segmentos a lo largo del huevo, en especial los de la parte anterior que originará el tejido neural. La fotografía con DAPI y su respectivo diagrama muestran segmentos con un desarrollo más tardío.
11	Inversión	14			En la etapa once el embrión comienza a engrosarse dorsalmente de tal forma que el surco ventral se abre más y los segmentos idiosomales se alargan hacia el campo dorsal que se formó al inicio.
12	Cierre Dorsal	15			posterior a la inversión se presenta el cierre dorsal o retracción, aquí los segmentos gnatosomales también se alargan de forma que el embrión toma un mayor volumen y cambia su posición.

Cuadro 5. Etapas del desarrollo embrionario de la garrapata *Rhipicephalus microplus*. Tinción nuclear con DAPI y esquemas ilustrativos de la etapa 13 y 14.

ETAPA		DÍAS	TINCIÓN NUCLEAR	ESQUEMA CORRESPONDIENTE	DESCRIPCIÓN
13	Cierre Ventral	16			En esta penúltima etapa, las patas de la incipiente larva se reacomodan de tal forma que es posible distinguir los artejos que la forman. Asimismo, se hacen evidencia el saco excretor y el orificio anal, estructuras que anteriormente no se habían podido observar debido a la posición de las extremidades.
14	Post-embrión	20			El embrión está listo para emerger como larva, se identifican estructuras complejas como detalles del capítulo y los artejos de las extremidades, sin pasar por alto el saco excretor.

Las micrografías obtenidas al microscopio de inversión y fluorescencia, exponen a detalle las 14 etapas que se lograron identificar en la embriología del embrión de la garrapata *R. microplus*, los datos se muestran a continuación.

Etapa 1: Primeras divisiones. Esta primer etapa se presentó del primero al tercer día de desarrollo, se observó un huevo en forma ovalada repleto de vitelina, ésta se distingue como una gran cantidad de yema dividida (Fig. 12a), en esta misma etapa también se distinguieron las primeras divisiones dentro del huevo, que se pudieron identificar como puntos brillantes en la imagen teñida con DAPI (Fig. 12.b).

Etapa 2: Blastodermo. Esta etapa se presentó a los cuatro días de desarrollo del embrión, se observó una mayor cantidad de núcleos en el huevo que comenzaron a distribuirse hacia la superficie del huevo y una gran cantidad de ellas formaron la estructura nombrada “blastoporo”, característica de la siguiente etapa (Fig. 13a). En la fotografía al microscopio de inversión, sólo mostró una densidad en la circunferencia del huevo, así como dos masas densas negras en el centro (Fig. 13b).

Etapa 3: Placa primitiva. Esta etapa se presentó a los cinco días de desarrollo embrionario, donde se observó una mayor densidad de tejido, así como una mayor cantidad de células, dejando como resultado una pequeña prominencia en la región donde posteriormente se formó el blastoporo (Fig. 14).

Etapa 4: Blastoporo. En la etapa de blastoporo existió una subsecuente división asincrónica de las células, donde al sexto día de desarrollo algunas de estas células comenzaron a concentrarse en uno de los polos la cual se denominó como blastoporo (Fig. 15).

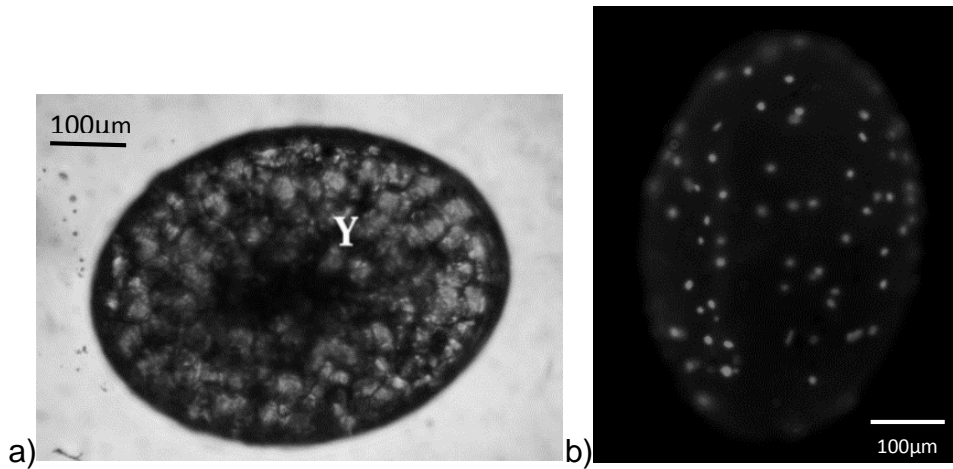


Figura 12. Etapa 1: Primeras divisiones. a) microfotografía de microscopio invertido (10X). b). Micrografía de fluorescencia (10X).

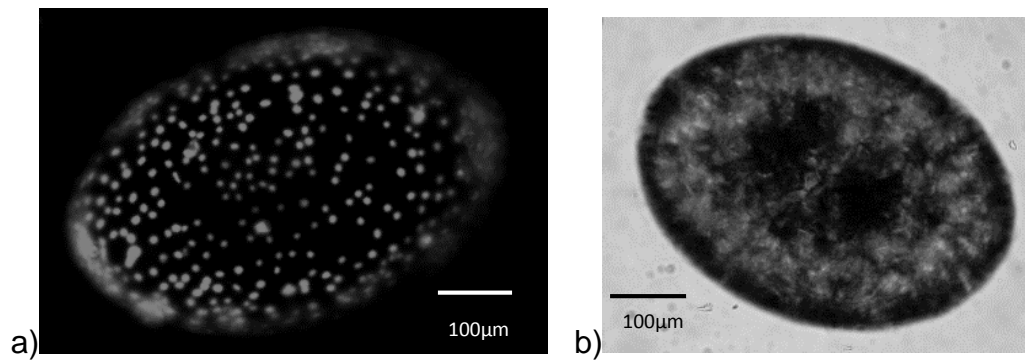


Figura 13. Etapa 2: Blastodermo. a) Micrografía de fluorescencia (10X). B) Micrografía de microscopio invertido (10X).

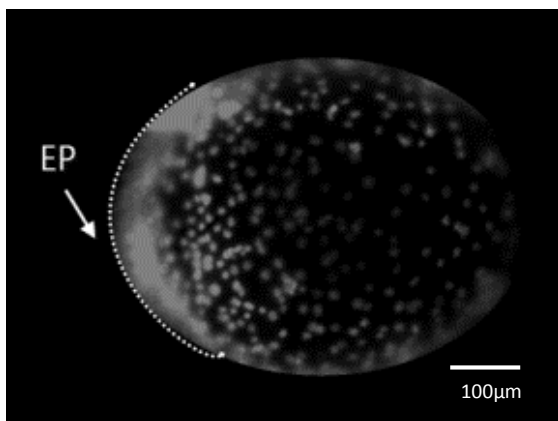


Figura 15. Etapa 3: Placa primitiva. Engrosamiento Primario (EP). Micrografía de fluorescencia (10X).

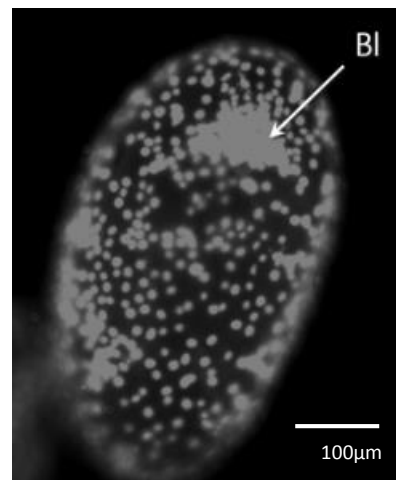


Figura 14. Etapa 4: Blastoporo (BI). Micrografía de fluorescencia (10X).

Etapa 5: Establecimiento del eje dorso-ventral. A los nueve días de desarrollo se aprecia como las células de esta zona migran lateralmente sobre el eje longitudinal, de manera que sólo quedó un número menor de células conocido como campo dorsal. La migración de las células continuó dejando un área semicircular más amplia donde se pudo identificar una división de la masa de tejido del embrión y la vitelina (Fig. 16).

Etapa 6: Banda germinal. Para el noveno día de desarrollo embrionario continuó un desarrollo rápido del embrión, en el cual la migración celular formó una masa de tejido que se extendió a lo largo del huevo de forma ventral convexa dejando notar una mayor visibilidad el campo dorsal. En esta región se apreció mayor densidad celular en comparación con el tejido embrionario restante a la que se le denominó zona de crecimiento (Fig. 17).

Etapa 7: Segmentación de la banda germinal. Tal como en la etapa anterior, esta etapa se presentó a los nueve días de la embriogénesis, en la cual la banda germinal se extendió poco a poco a lo largo de la curvatura ventral, en esta región la densidad celular fue mucho mayor que en el campo dorsal. Se observó el desarrollo de los segmentos primordiales del cuerpo del embrión como un tejido más denso (Fig. 18).

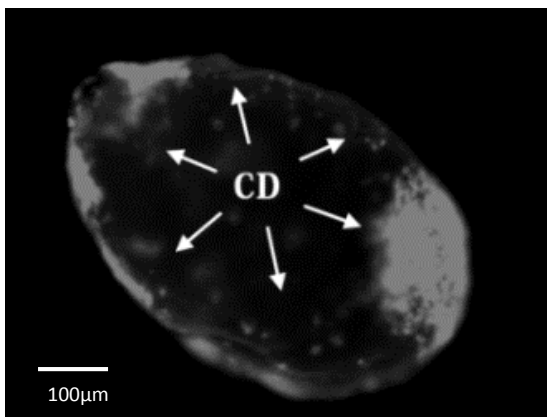


Figura 16. Etapa 5: Establecimiento del eje dorso-ventral (CD). Micrografía de fluorescencia (10X).

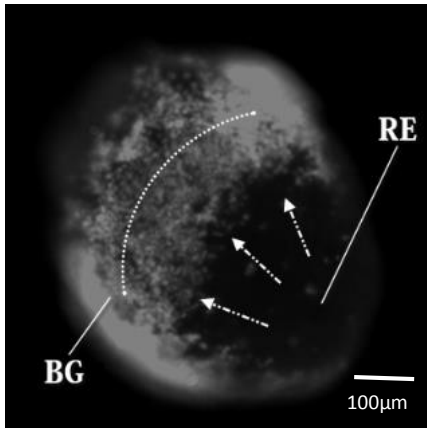


Figura 17. Etapa 6: Banda germinal BG, RE Región Extraembrionaria. Imagen al microscopio de fluorescencia (10X).

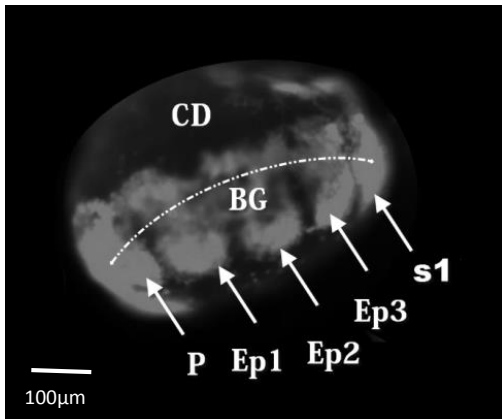
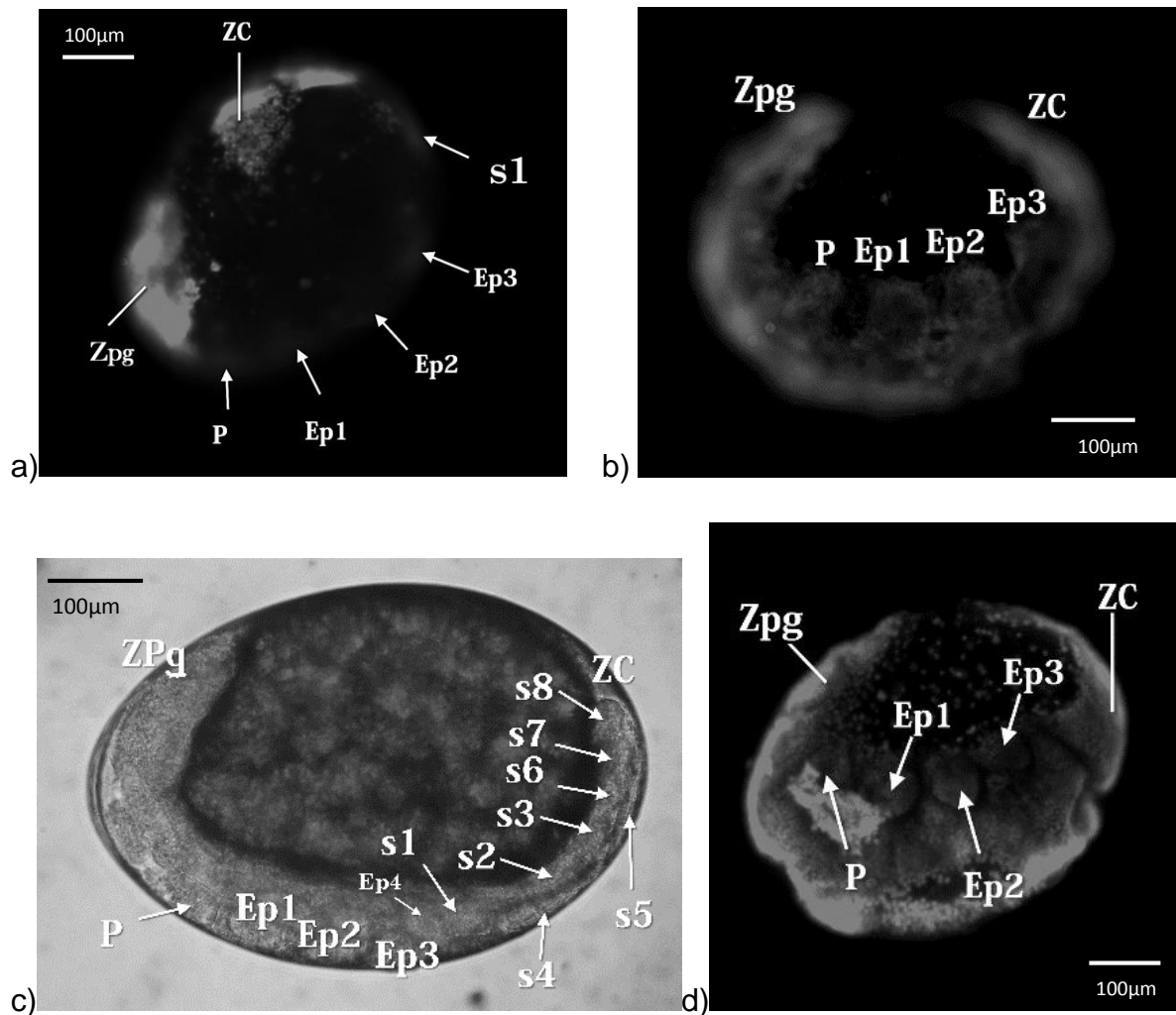


Figura 18. Etapa 7: Segmentación de la banda germinal. BG Banda Germinal; CD Campo Dorsal; P Palpos; Ep1 Extremo podal 1; Ep2 Extremo podal 2; Ep3 Extremo podal 3; s1 Segmento idiosomal 1; Micrografía de fluorescencia (10X).

Etapa 8. Brotes de las extremidades. Período observado de los 9-11 días de desarrollo, en el cual la migración celular antes descrita, continuó de tal forma que se comenzó a observar pequeñas regiones más densas a lo largo de la banda germinal, apareciendo así los primeros esbozos de las extremidades (fig. 19a), así como segmentos de lo que se convirtió en extremidades gnatosomales e idiosomales (Fig. 19b), en la imagen de la figura 19c, se observaron segmentos a lo largo del embrión que se extienden desde la zona pre-gnatosomal hasta la zona de crecimiento, entre ellos se apreció lo que más adelante se convirtieron en las tres extremidades podales de uno de los lados de la larva, también se observan ocho segmentos que en formación hacia la zona de crecimiento, en una vista lateral del

embrión, al décimo día de desarrollo se identificó la región pre-gnatosomal con brotes del pedipalpo gnatosomalmente, tres esbozos de las futuras extremidades podales más hacia la región idiosomal (Fig. 19d) y, dorsalmente se observó la zona pre-gnatosomal y la zona de crecimiento, así como la yema de huevo o vitelogenina indicada como región extraembrionaria (Fig. 19e), también se hizo evidente el surco ventral del embrión, la zona de crecimiento y la región pre-gnatosomal (Fig. 19f), por último en se observó una vista antero-lateral en donde de acuerdo a la distribución de la yema se pudo observar la zona pre-gnatosomal en la parte anterior del huevo y la zona de crecimiento en la parte posterior del mismo, así como la región extraembrionaria (Fig. 19g).



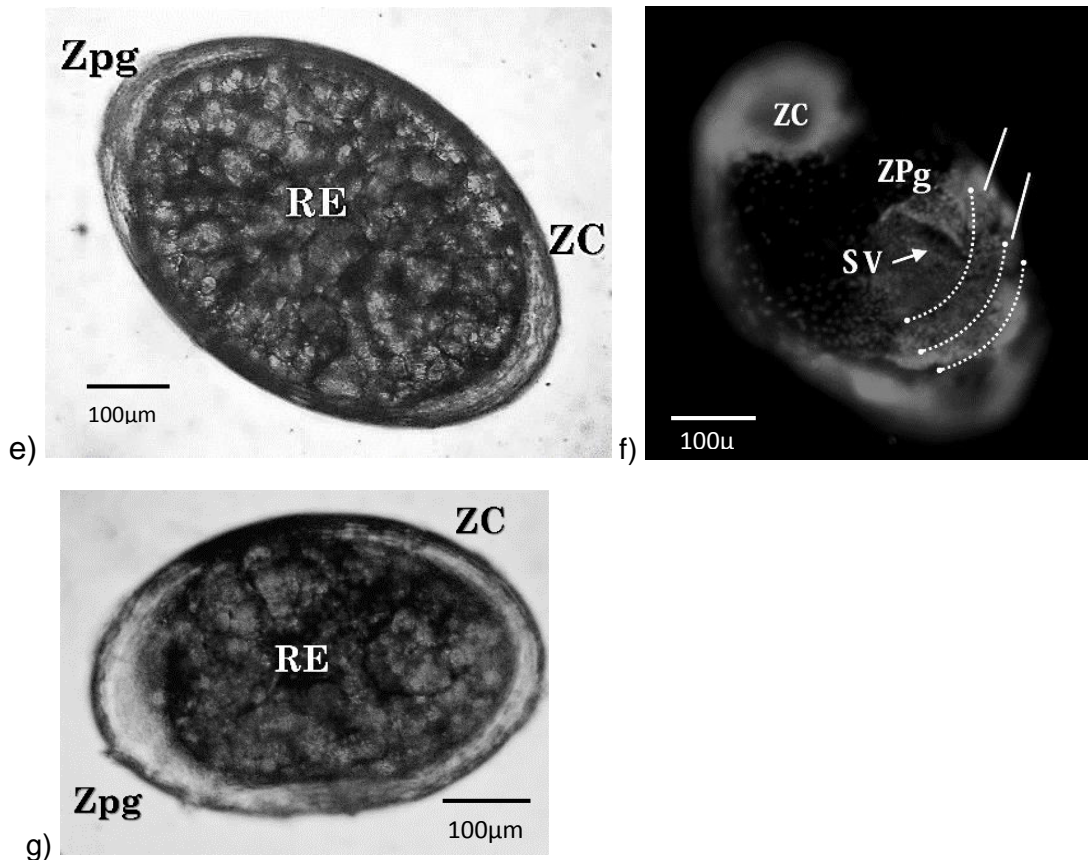
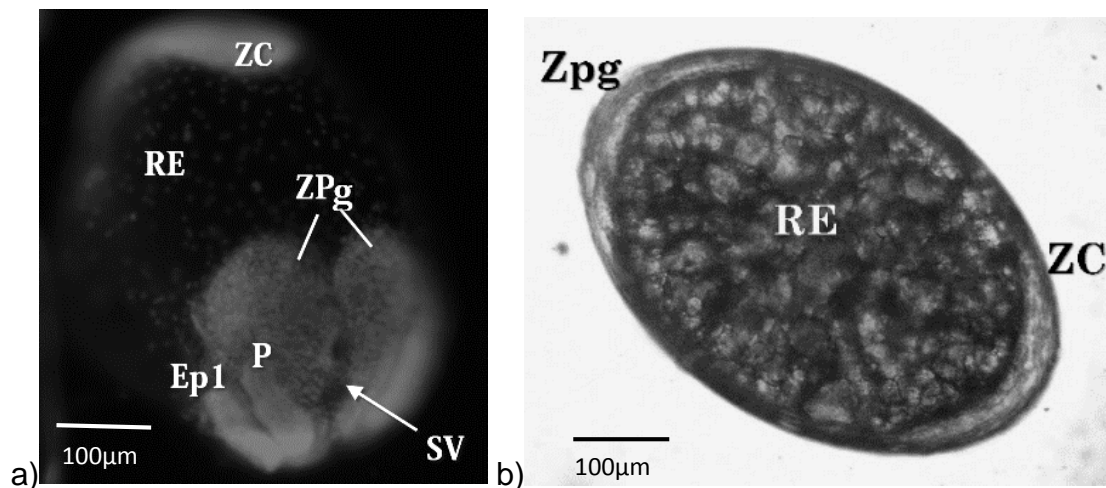


Figura 19. Etapa 8. Brotes de las extremidades. Zpq Zona pregnatosomal; P palpos; Ep1 Extremo podal 1; Ep2 Extremo podal 2; Ep3 Extremo podal 3; Ep4 Extremo podal 4; s1 Segmento idiosomal 1; s2 Segmento idiosomal 2; s3 Segmento idiosomal 3; s4 Segmento idiosomal 4; s5 Segmento idiosomal 5; s6 Segmento idiosomal 6; s7 Segmento idiosomal 7; s8 Segmento idiosomal 8; ZC Zona de crecimiento; SV Surco ventral; RE región extraembrionaria. Las imágenes a, b, d y f fueron fotografías obtenidas en el microscopio de fluorescencia (10X). Las imágenes c, e y g son fotografías obtenidas en el microscopio invertido (10X).

Etapa 9. Diferenciación de las extremidades. Esta fase se presentó a los doce días de desarrollo, en la imagen de la figura 20a con una vista fronto-ventral, se identificó la zona de crecimiento en el extremo de la parte anterior y en la parte posterior se distinguió la región pre-gnatosomal así como el surco ventral distinguiéndose medialmente por una región estrecha con una baja densidad de tejido celular en comparación con el tejido embrionario; se hacen visibles lateralmente los pedipalpos y un par de patas (no muy visible el lado derecho debido a la posición del embrión), tomando al embrión en una vista antero-lateral, se observaron los dos extremos del embrión, la zona pre-gnatosomal y la zona de crecimiento con vestigios de segmentos en las dos zonas; la masa amarilla es la región extraembrionaria (Fig.20b), ventralmente a los diez días los brotes

quelicerales son aplanados y tienen una forma de cono, mientras que los pedipalpos y las demás extremidades podales son más alargados y aproximadamente tres veces más largos que anchos (Fig. 20c), en una vista lateral se observaron los brotes de los pedipalpos, así como de las cuatro extremidades podales y vestigios de dos segmentos idiosomales, la zona de crecimiento es apreciable al igual que el área pre-gnatosomal (Fig. 20d), de vista frontal se pudo apreciar en la parte inferior la región pre-gnatosomal observándose la división inicial de los lóbulos pre-quelicerales. La región pre-gnatosomal se extendió posteriormente hallándose pequeñas prominencias de lo que se convirtió en los quelíceros. También se observó el surco ventral entre las dos mitades de la banda germinal (Fig. 20e), de forma ventral en la zona anterior se pudieron distinguir los pedipalpos además en la extensión de la parte del gnatosoma hasta el idiosoma, se observaron tres patas, las cuales son más largas que los pedipalpos y el surco ventral aún fue evidente extendiéndose desde la parte anterior hasta la parte posterior donde pudo ser aún visible (Fig. 20f), lateralmente en la parte anterior se distinguieron brotes del pedipalpo y extremidades podales las cuales se hacen más prominentes en la parte prosomal; se observó una delimitación entre la zona gnatosomal e idiosomal donde en esta última se lograron distinguir ocho segmentos idiosomales (Fig. 20g) en la imagen de la figura 20h lateralmente en la parte anterior, se mostró la zona pre-gnatosomal seguido del pedipalpo y las tres patas de la larva, así como vestigios de algunos segmentos hacia la zona de crecimiento; claramente también se pudo apreciar la región extraembrionaria.



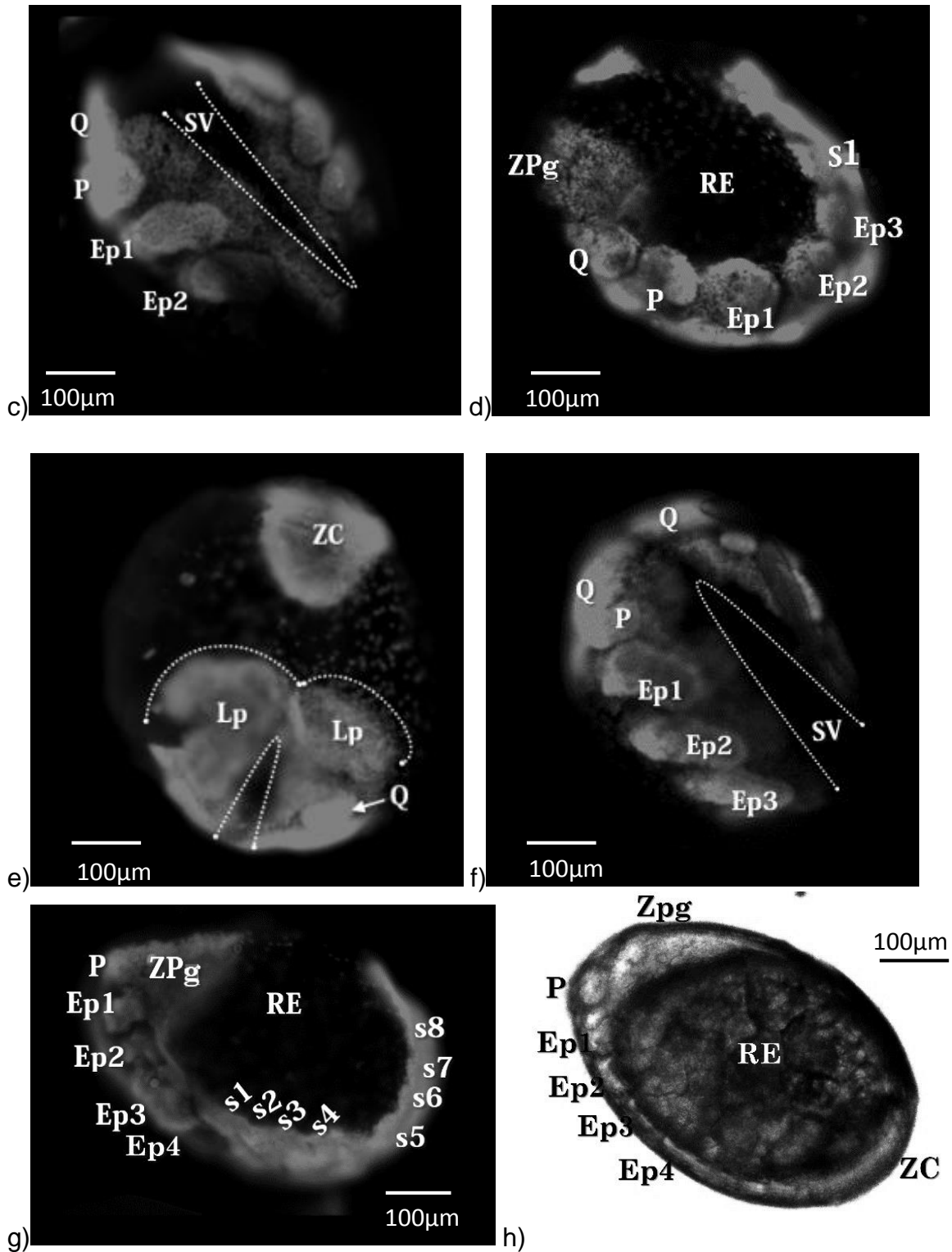


Figura 20. Etapa 9: Diferenciación de las extremidades. Zpg Zona pregnatosomal; P palpos; Q queliceros; Ep1 Extremo podal 1; Ep2 Extremo podal 2; Ep3 Extremo podal 3; Ep4 Extremo podal 4; s1 Segmento idiosomal 1; s2 Segmento idiosomal 2; s3 Segmento idiosomal 3; s4 Segmento idiosomal 4; s5 Segmento idiosomal 5; s6 Segmento idiosomal 6; s7 Segmento idiosomal 7; s8 Segmento idiosomal 8; ZC Zona de crecimiento; SV Surco ventral; RE región extraembrionaria. Las imágenes a, c, d, e, f y g son micrografías de fluorescencia (10X).

Etapa 10: Diferenciación del tejido neuronal. Fase observada a los 13 días de desarrollo, en la cual se identificaron estructuras como la zona pre-gnatosomal, los pedipalpos y tres pares de patas para caminar siendo más visibles las patas izquierdas; estando más prominentes las que se encuentran en la zona del gnatosoma.

El surco ventral se extendió posteriormente hasta el séptimo segmento idiosomal. En la parte anterior donde se encuentra la región pre-gnatosomal se apreciaron dos campos con mayor densidad celular que son los posibles lóbulos pre-quelicerales (Fig. 21a), a los 13 días ventralmente se hizo visible la región gnatosomal, pedipalpos y hacia la región idiosomal se hicieron notar los tres pares de patas, así como dos de los segmentos idiosomales.

El surco ventral se extendió desde la delimitación de los lóbulos pre-quelicerales hasta los segmentos idiosomales (Fig. 21b), la figura 21c, muestra una vista dorso-lateral, en la cual la parte anterior se observó el pedipalpo seguido de las patas laterales uno, dos y tres, así como el primer segmento, en una vista lateral, se distinguieron los segmentos gnatosomales e idiosomales, la región pre-gnatosomal, los quelíceros, pedipalpos, tres patas para caminar y segmentos idiosomales, notándose que las extremidades anteriores son más largas que las extremidades posteriores (Fig. 21d), en una imagen con vista antero-lateral se observó un desarrollo posterior a la etapa de diferenciación de las extremidades, donde fueron más apreciables algunos segmentos como la zona pre-queliceral, el pedipalpo, las tres futuras patas, ocho segmentos dirigidos hacia la zona de crecimiento (Fig. 21e).

El surco ventral se extendió casi hasta el séptimo segmento idiosomal, se apreció la zona de crecimiento y de una forma más brillante la región pre-gnatosomal (Fig. 21f).

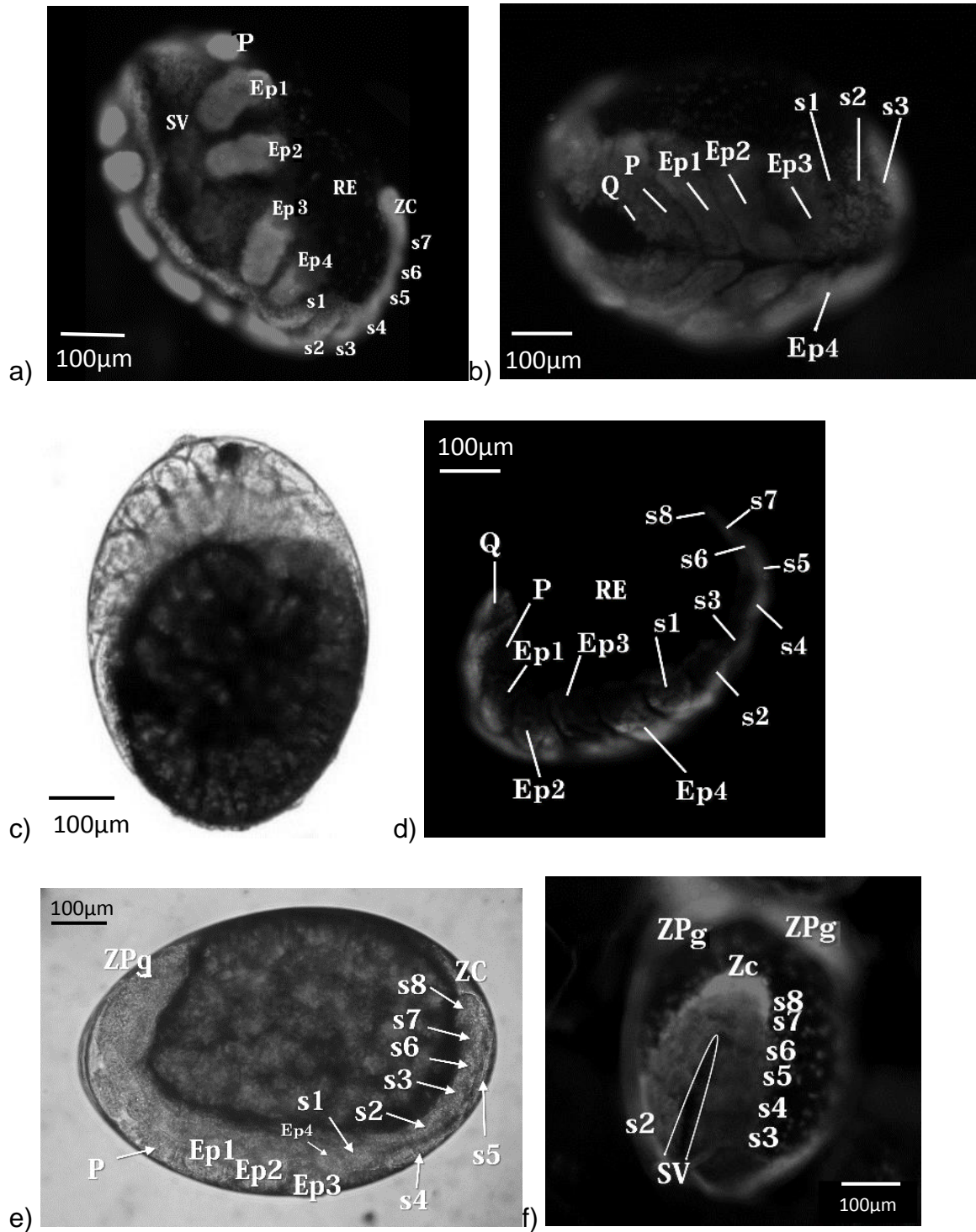
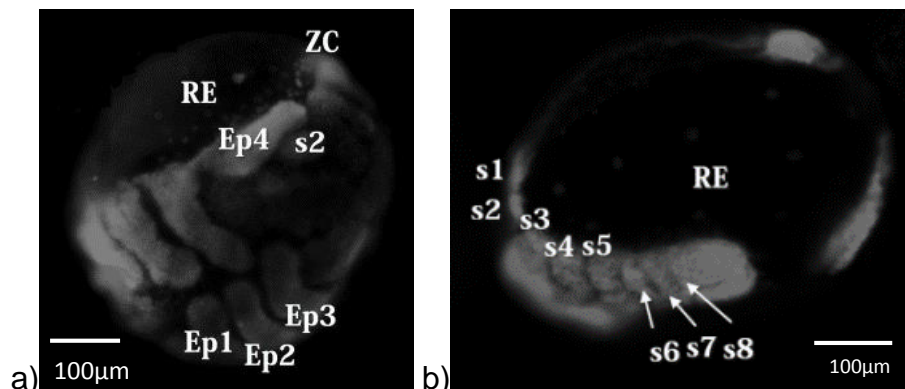


Figura 21. Etapa 10: Diferenciación del tejido neural. Zpg Zona pregnatosomal; P palpos; Q quelicer; Ep1 Extremo podal 1; Ep2 Extremo podal 2; Ep3 Extremo podal 3; Ep4 Extremo podal 4. s1 Segmento idiosomal 1; s2 Segmento idiosomal 2; s3 Segmento idiosomal 3; s4 Segmento idiosomal 4; s5 Segmento idiosomal 5; s6 Segmento idiosomal 6; s7 Segmento idiosomal 7; s8 Segmento idiosomal 8; ZC Zona de crecimiento; SV Surco ventral; RE región extraembrionaria. Las imágenes a, b, d y f son micrografías de fluorescencia (10X). Las imágenes c y e son fotografías obtenidas del microscopio invertido (10X).

Etapa 11. Inversión. A los catorce días del desarrollo embrionario se logró apreciar la inversión, en la cual de forma lateral se hicieron evidentes cuatro pares de patas, de las cuales el cuarto par tuvo una posición horizontal dirigida hacia la zona de crecimiento. La distancia entre la zona de crecimiento y la zona pre-natosomal aumentó (Fig. 22a), las imágenes de las figuras 22b y 22c mostraron un embrión de vista lateral de 12 y 14 días respectivamente en donde mostraron la región idiosomal en el cual se pueden apreciar ocho segmentos idiosomales; ventralmente, a los 12 días de embriogénesis se identificó que el embrión estuvo listo para comenzar la denominada etapa de inversión donde la yema de huevo se internalizó y donde las paredes del cuerpo embrionario y futuras extremidades podales comenzaron a extenderse dorsalmente para alcanzar más de la mitad de la circunferencia del huevo (Fig. 22d), tomando un embrión a los 12 días de la parte posterior, se logró evidenciar el par de pedipalpos, debido a la posición del embrión sólo fue posible observar una de los tres pares de patas de la futura larva; y en la parte posterior, la zona de crecimiento es evidente (Fig. 22e).

Etapa 12: Cierre dorsal. Esta fase se observó a los 15 días iniciada la embriogénesis, en la cual se observó en una vista fronto-dorsal el tejido nervioso del cerebro diferenciado en cuatro lóbulos interconectados; se observaron también lateralmente los tres pares de patas (Fig. 23a) y a los dieciséis días embrionarios dorsalmente, se observó en la parte anterior los pedipalpos así como el cerebro del embrión; en la parte más posterior es posible identificar el saco excretor (Fig. 23b), en una vista fronto-ventral a los 15 días del desarrollo debido al movimiento continuo de la yema, la forma de la larva en formación va cambiando de manera que las patas cubren la zona ventral (Fig. 23c).



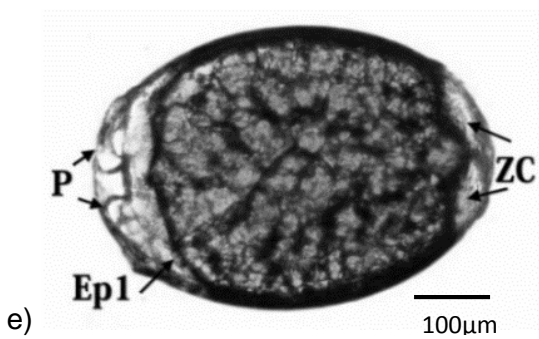
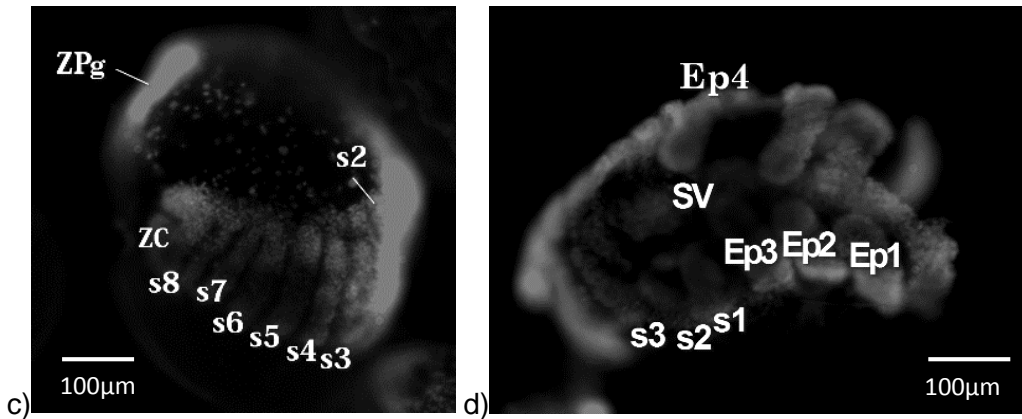


Figura 22. Etapa 11: Inversión. Zpq Zona pregnatosomal; P palpos; Q queliceros; Ep1 Extremo podal 1; Ep2 Extremo podal 2; Ep3 Extremo podal 3; Ep4 Extremo podal 4; s1 Segmento idiosomal 1; s2 Segmento idiosomal 2; s3 Segmento idiosomal 3; s4 idiosomal 4; s5 Segmento idiosomal 5; s6 Segmento idiosomal 6; s7 Segmento idiosomal 7; s8 Segmento idiosomal 8; ZC Zona de crecimiento; SV Surco ventral; RE región extraembrionaria. Las imágenes a, b, c y d son fotografías obtenidas en el microscopio de fluorescencia (10X).

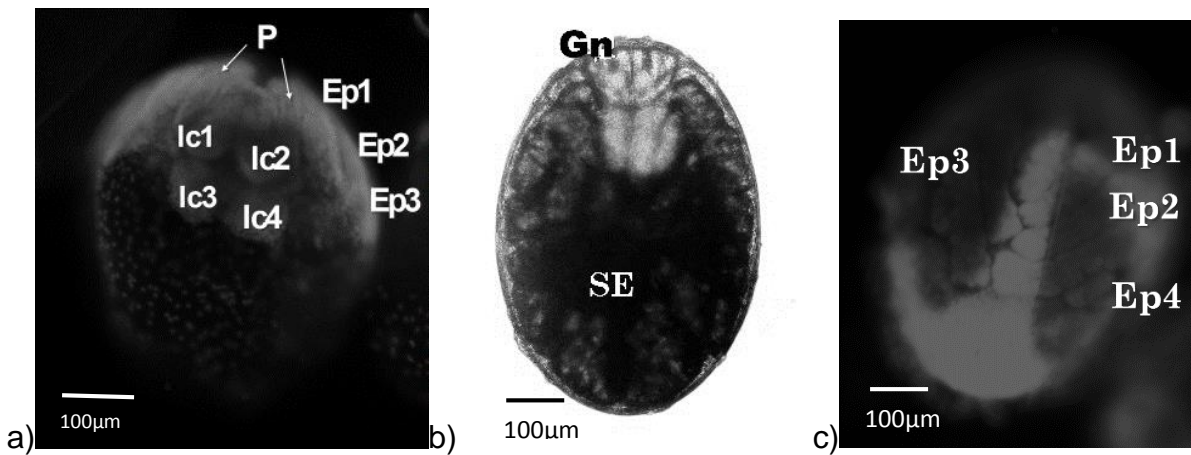


Figura 23. Etapa 12: Cierre dorsal. P palpos; lc1 lóbulo cerebral 1; lc2 lóbulo cerebral 2; lc3 lóbulo cerebral 3; lc4 lóbulo cerebral 4; Ep1 Extremo podal 1; Ep2 Extremo podal 2; Ep3 Extremo podal 3; SE saco excretor Gn. Las imágenes a y c son fotografías obtenidas en el microscopio de fluorescencia (10X). La imagen b es una fotografía obtenida del microscopio invertido (10X).

Etapa 13: Cierre Ventral. Fase identificada a los dieciséis días de la embriogénesis, en la que se pudo apreciar que las extremidades podales cubrieron la región prosomal, La masa de yema dorsal se dividió en cuatro compartimentos distintos. Se hizo presente el orificio anal (Fig. 24a), en la figura 24b se pudieron apreciar las mismas estructuras que se observaron en la imagen a, con la única diferencia de que en ésta se apreció el saco excretor, a los veinte días, en la parte anterior ventralmente se observaron los pedipalpos, además se apreciaron los artejos de las tres pares de patas y lateralmente se apreció uno de los peritremas, en la parte posterior se observó el saco excretor y el orificio anal (Fig. 24c), la figura 24d muestra una vista latero-ventral del embrión observándose las tres pares de patas, el peritrema y el saco excretor, a diferencia de la imagen anterior se pudo observar los tres pares de patas y el saco excretor, también se observaron los pedipalpos al igual que la imagen a, en la figura 24e se mostró los tres pares de patas y el saco excretor también se observan los pedipalpos al igual que la imagen a, dorsalmente a los veinte días del desarrollo, se apreció en una vista general el capítulo, así como el escudo de la larva (Fig. 24f).

Etapa 14. Post-embrión. Etapa final a los veinticinco días de desarrollo, en esta etapa el embrión ya se encuentra formado con las tres pares de patas encogidas, los pedipalpos fueron apenas perceptibles (Fig. 25a), al día 26 del desarrollo, ventralmente se apreció el hipostoma y los pedipalpos del capítulo, las tres pares de patas y el peritrema (Fig. 25b), la imagen de la figura 25c, muestra el capítulo ventralmente en el que se apreciaron mejor las hileras de dientes del hipostoma, así como los cuatro segmentos que forman los pedipalpos. Por último se logró apreciar una larva en una vista dorsal, en la cual se observaron los quelíceros, pedipalpos, así como el hipostoma; de los tres pares de patas es posible observar los artejos que las forman, desde la coxa, hasta la uña. También fue posible observar el saco excretor (Fig. 25d).

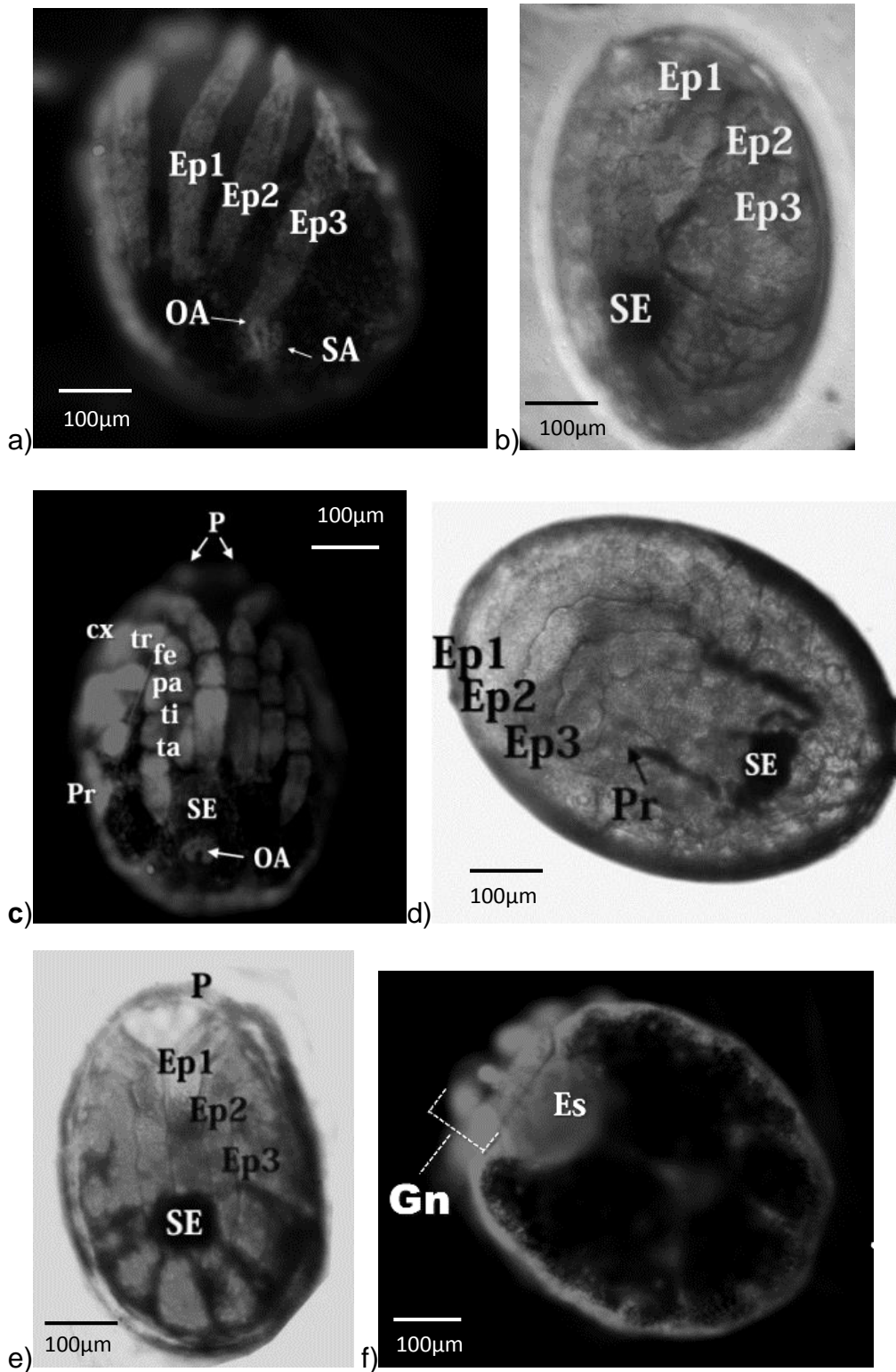


Figura 24. Etapa 13: Cierre Ventral. OA Orificio Anal; SA surco anal; P palpos; Ep1 Extremo podal 1; Ep2 Extremo podal 2; Ep3 Extremo podal 3; cx coxa; tr trocant; fe femur; pa patela; ti tibia; ta tarso; SE saco excretor. Es escudo; Cp Capítulo. Pr peritremas. Las imágenes a, c y f son micrografías de fluorescencia (10X). La imagen b, d y e son fotografías obtenidas del microscopio invertido (10X).

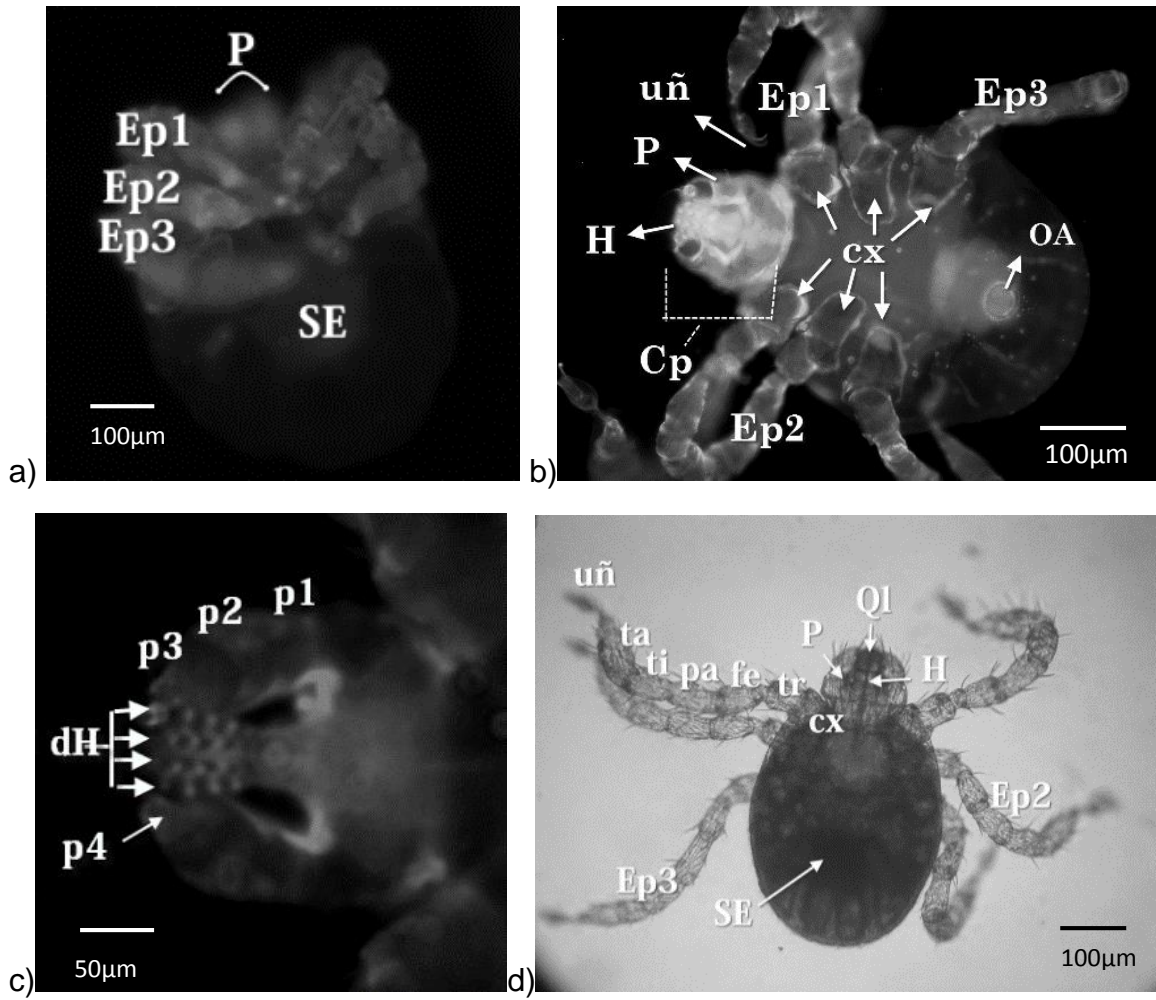


Figura 25. Etapa 14: Post-embrión. P palpos; Ep1 Extremo podal 1; Ep2 Extremo podal 2; Ep3 Extremo podal 3; SE saco excretor; H hipostoma; Cp Capitulo; dH dientes del hipostoma; cx coxa; tr trocante; fe femur; pa patela; ti tibia; ta tarso; uñ uña; Pr Peritremas; p1 segmento 1 del pedipalpo; p2 segmento 2 del pedipalpo; p3 segmento 3 del pedipalpo; p4 segmento 4 del pedipalpo; Q Quelíceros. Las imágenes a, b y c son micrografías de fluorescencia (10X). La imagen d es una fotografía obtenida del microscopio invertido (10X).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En este estudio se pudieron distinguir 14 etapas de desarrollo embrionario de la garrapata (cuadro 5, figs. 12-25). Estas etapas describen en forma representativa la serie de eventos por los cuales pasa el embrión, las cuales muestran mucha similitud a estudios del desarrollo realizado en arañas con pequeñas diferencias que son indiscutibles debido a la diferencia de especies, ya que, como es de esperarse, incluso entre arañas existen diferencias en su ontogénesis (Wolff y Hilbrant, 2011).

En los primeros días de desarrollo la vitelina está dividida y empaquetada en gránulos (fig. 12a), esto es consistente con Logullo, *et al.*, (2002), quien menciona que esta proteína es la principal fuente de reserva de hemo en el desarrollo de la larva, ya que es el suministro de aminoácidos y está diseñada para apoyar el desarrollo del embrión, la cual se acumula en estructuras llamadas esferas. Por otra parte, en la fotografía con DAPI, se observan puntos brillantes distribuidos en todo el huevo (fig. 12b), este resultado está relacionado a lo reportado por Seixas *et al.*, (2012) que describen que la embriogénesis de la garrapata *Rhipicephalus microplus* comienza con un cigoto no celular y divisiones repetidas del núcleo sin la división celular, estas divisiones las describen del primero al cuarto día después de la oviposición. Para el cuarto día los embriones llegan a la etapa de blastodermo sincitial (fig. 13); lo cual incluso apoya los resultados obtenidos en este trabajo sobre la segunda etapa embrionaria descrita como blastodermo, donde las imágenes en el microscopio de fluorescencia muestran una mayor cantidad de núcleos y en el cuarto día post-oviposición comienzan a migrar a la superficie del huevo. Se ha mencionado que en *R. microplus* el primer núcleo del óvulo migra a una posición periférica a través de varias divisiones generando un blastodermo sincitial (Logullo, *et al.*, 2002).

Para la tercera etapa establecida denominada "Placa primitiva", en la imagen de tinción con DAPI (figura 14), al quinto día se observa una mayor cantidad de núcleos, distribuidos en todo el huevo con excepción de un grupo de células que se acumulan en uno de los polos formando una pequeña joroba, lo cual de acuerdo a Seixas *et al.*, (2012), reportan que, después de varias divisiones del núcleo, estos

migran a la periferia y para el quinto día después de la oviposición comienza la etapa de blastodermo celular.

No obstante, en esta etapa siguen las divisiones celulares asincrónicas donde no hay como tal, una formación de disco germinal, es decir un agregado de células que proporcionan un tejido primordial para el cuerpo del embrión, el que está comúnmente presente en los embriones de artrópodos, sin embargo, en una región particular de las células del blastodermo, comienzan a agregarse para formar el blastoporo (Wolff y Hilbrant, 2011).

En la cuarta etapa “blastoporo” se hace mención de una mayor densidad de tejido y núcleos en el área de la placa primitiva (fig. 14), se piensa que es resultado de la internalización de las células de la región del blastoporo debajo del blastodermo (Mittman y Wolff, 2012); en el inicio de esta etapa se reporta que en las arañas comienza la gastrulación, proceso morfogenético que separa el blastodermo (una capa sencilla de células), en las tres capas germinales: ectodermo, endodermo y mesodermo, reorganizando el tejido en un mayor grado de compatibilidad donde el blastoporo desaparece marcando así el final de la gastrulación (Wolff y Hilbrant, 2011). Otro dato que podría apoyar lo antes mencionado es que se ha informado que la celularización se produce en el quinto y sexto día después de la postura en garrapatas del ganado vacuno de acuerdo a Logullo, *et al.*, 2002 y Campos *et al.*, 2006, respectivamente.

Durante las primeras etapas antes mencionadas, las imágenes de embriones tomadas con el microscopio de inversión no muestran datos morfológicos significativos, ya que solo se aprecia la cantidad de vitelina acumulada en los gránulos de la yema, sin que se pueda identificar cambios en el tamaño y forma; lo que puede estar relacionado a lo reportado por Logullo, *et al.*, (2002), donde hace referencia a que los resultados sugieren, que la mayor parte de la hemo liberada tras la degradación de la yema de huevo en los primeros cinco días no es utilizado por el embrión.

Al noveno día después de la oviposición se estableció el eje dorso-ventral, debido a la migración celular de forma lateral a lo largo del huevo resultó dos áreas: una con menor número de células respecto de la otra denominado campo dorsal, donde marca el eje dorso-ventral (fig. 16), esta descripción está en relación a lo informado por Mittman y Wolff, (2012), que reportan que al final de esta etapa, el campo dorsal muestra una frontera más o menos ondulada en el tejido y a pesar de que no existe un borde afilado entre los tejidos embrionarios y extra-embrionarios, ambos pueden distinguirse claramente convirtiendo la antigua área de engrosamiento primario en el extremo posterior.

Una de las etapas que se han determinado en el desarrollo embrionario de la garrapata, es la formación de la banda germinal (fig. 17), la cual se aprecia con mejor claridad al noveno día post-oviposición, semejante a la forma de una bellota, donde la región con más grosor teñido de color azul es el tejido embrionario y la región más oscura es el campo dorsal, donde este último debido a la nueva reorganización celular se distingue con mayor facilidad. En arañas se ha reportado que la banda germinal es una banda ventral de células con una flexión convexa que lleva el lóbulo caudal en su extremo posterior, ésta región muestra una densidad celular alta, en comparación con el tejido embrionario restante y que se ha denominado zona de crecimiento (Mittman y Wolff, 2011; Wolff y Hilbrant, 2012).

A los nueve días del desarrollo, se observa la séptima etapa caracterizada por la división de la banda germinal en segmentos primordiales, de lo que en un futuro posiblemente formen los extremos podales, pedipalpos y algunos segmentos idiosomales (fig. 18), ésta etapa en algunos estudios no se determina como tal, pues Mittman y Wolff (2012) en un estudio de la embriología de la araña *Parasteatoda tepidariorum*, no mencionan dicha etapa de segmentación, ya que solo hace referencia a que ésta banda de germen cubre toda la superficie ventral de la región embrionaria y su extremo anterior es más amplio, que el extremo posterior y al final de esta etapa la banda abarca menos de la mitad de la yema de huevo, haciéndose evidentes los primeros segmentos; sin embargo, Wolff y Hilbrant (2011) sí hacen esta

distinción, donde se informa que la región de células densas en la parte anterior de los quelíceros, inicialmente no tiene estructuras organizadas y la frontera entre esta región y la región extra-embionaria está menos definida, que el perímetro del resto del cuerpo del embrión. Tomando de referencia este último trabajo mencionado, el presente estudio se asemeja en la presencia de segmentos prosomales o gnatosomales para el caso de este trabajo) a excepción de los quelíceros, que se encuentran divididos entre surcos.

De acuerdo al estudio realizado por Campos *et al.*, (2006), coinciden en abordar una banda germinal y por consiguiente su segmentación, cuyos primeros signos son visibles en el séptimo día de desarrollo, sin dejar por alto la posibilidad de que la segmentación morfológica del embrión puede ocurrir entre el séptimo y noveno día; dato también proporcionado por Seixas *et al.*, (2012) ya que mencionan que al séptimo día después de la oviposición, la etapa de cierre dorsal comienza con la evidente segmentación. La diferencia existente del nombre y día en que se presentan algunas de las etapas del estudio mencionado con anterioridad y la presente investigación, pueden deberse a que en el primer trabajo no se analizó toda la embriogénesis, sólo se reportaron algunos días que no detallan todos los eventos ocurridos durante este período en este ectoparásito.

Una de las etapas más fáciles de discernir del desarrollo respecto a las demás es la correspondiente a los brotes de las extremidades (fig. 19), las cuales comienzan en el día 9 post-oviposición y conforme pasa el tiempo se observan cambios visualmente significativos en el embrión; inicialmente se puede distinguir la zona pre-gnatosomal en la parte anterior y en la parte posterior la zona de crecimiento, así como pequeñas acumulaciones de células a lo largo de la banda germinal, se pueden identificar las yemas de los pedipalpos, de las 3 extremidades podales así como un segmento idiosomal. El surco ventral se hace evidente el día 10 de desarrollo en la zona pre-gnatosomal, caracterizándose por una región estrecha de baja densidad de tejido celular en comparación con el tejido embrionario, dándole un aspecto más oscuro, este surco se localiza en la parte media de la zona pre-gnatosomal, donde a

medida que va desarrollando el embrión éste se va extendiendo hacia la zona de crecimiento, que es la parte posterior del embrión (fig. 19c y f).

En el estudio realizado por Mittman y Wolff (2012) indicaron que el surco ventral se expande más rápido en la araña *P. tepidariorum* que en *Cupenius salei* alcanzando el segmento del pedipalpo. Por otro lado, Wolff y Hilbrant, en el 2011 mencionan que en la región pre-quelicerar a menudo hay una ligera diferencia en la progresión del desarrollo de las mitades derecha e izquierda y que la densidad celular más baja en la región medial pre-quelicerar marca el inicio de la formación del surco ventral, que continúa para extenderse posteriormente en la línea media de los segmentos anteriores del prosoma, además de que en esta etapa ocurren los primeros signos de la neurogénesis. Parte de lo mencionado anteriormente, tiene relación con la etapa 9 de este trabajo denominada diferenciación de las extremidades, en la que hay una mayor diferenciación de la zona pre-gnatosomal (fig. 20); en ésta también hay un alargamiento del surco ventral extendiéndose hasta el tercer par de patas, en este día ya se observa el desarrollo de los quelíceros debajo de los lóbulos pre-quelicerarales.

Durante la etapa de diferenciación del tejido neural, en forma general se produce la división de ocho segmentos idiosomales, sin embargo, se observa la posibilidad del desarrollo de más segmentos (fig. 21); el surco ventral se extiende hasta casi el séptimo segmento idiosomal y, se distingue con mayor visibilidad la zona pre-gnatosomal, no obstante, las imágenes no permiten una observación a detalle de esta zona. Por otro lado, se observan los quelíceros de menor tamaño en contraste de las otras extremidades. Con respecto a lo reportado por Mittman y Wolff (2012), en esta etapa hay un desarrollo progresivo de los procesos neuronales, del sistema nervioso central en todo el embrión, sigue una diferenciación de los apéndices prosomales y opistosomales, haciéndose más voluminosos, también hay un acortamiento de los lóbulos pre-quelicerarales y está en proceso el desarrollo del labrum. En *P. tepidariorum* el segmento más posterior alcanzado por el surco ventral es el séptimo mientras que en *C. salei* llega al octavo (Wolff y Hilbrant, 2012).

En la etapa de inversión, el embrión se ensanchó haciéndose más largas las extremidades del embrión (fig. 23), éstas desarrollan posiblemente un cuarto par de patas, sin embargo, ésta ha tomado una posición horizontal a diferencia de las otros pares de patas. Aunque la larva se caracteriza por ser hexápoda, el cuarto par de apéndices parece estar formado y estos permanecen como brotes. En varias especies de ácaros el cuarto par de patas se observa desarrollado desde el embrión pero solo se hace evidente en la fase de ninfa y adultos, en la que se observan como octópodos (Beaty y Marquardt, 1996; Krantz y Walter, 2009). Este parece ser el caso para *R. microplus* acorde a los observado en este trabajo. Mittman y Wolff (2012) informan que esta etapa es el proceso por el cual la yema se internaliza y la banda germinal se divide ventralmente dejando una hendidura que es al menos dos veces más ancha que el surco ventral. Al final de esta etapa, los terguitos prosomales comienzan a extenderse dorsalmente para abarcar más de la circunferencia del huevo. El ensanchamiento gradual del surco ventral es un proceso relativamente lento y se acelera significativamente durante esta etapa, marcando el inicio de la inversión dando como resultado que la distancia entre la región pre-gnatosomal y los posteriores segmentos idiosomales aumenten.

El cierre dorsal muestra un embrión en donde ya es posible identificar con mejor claridad la parte ventral y dorsal, así como un reacomodo de las extremidades podales (fig 23), de manera que las patas cubren la zona ventral de la futura larva, dorsalmente se identifican cuatro lóbulos o ganglios interconectados en el singanglión. El cierre dorsal o “retracción” como lo han manejado algunos autores, es el proceso que completa la invaginación donde los terguitos de ambas mitades del cuerpo se encuentran a lo largo de la línea media dorsal cubriendo la totalidad de la yema dorsal con tejido embrionario; la región del cerebro también es cubierta por la epidermis y formaciones cuticulares (Wolff y Hilbrant, 2011; Mittman y Wolff, 2012).

En el “cierre ventral” (etapa 13), las extremidades podales se reacomodan y siguen alargándose, de manera que el tercer par de patas alcanza el orificio anal, el cual ya es evidente, así como el saco excretor y surco anal, además son visibles tres anillos en cada una de las patas indicando que conforme prosigue el desarrollo se están diferenciando los artejos de las extremidades; para esta etapa el escudo se hace presente en la parte dorsal del embrión (fig. 24). Estos datos son consistentes con lo publicado por Wolff y Hilbrant (2011) donde mencionan que el escudo prosomal cubre todo el prosoma, incluyendo la región del cerebro además de que el embrión ha tomado una posición más torcida de manera que, el primer par de patas casi llegan al tubérculo anal. A diferencia de *P. tepidariorum* la segmentación de las patas con tres anillos descritos en la primera pierna se produce en la etapa de diferenciación de las extremidades (Mittman y Wolff, 2012) en la garrapata se observa los inicios de esta división hasta el cierre ventral.

La etapa de post-embrión, como su nombre lo indica, es cuando el embrión se encuentra formado en su totalidad preparado para salir del huevo y convertirse en larva (fig 25), para esto el embrión posee tres pares de patas recogidas ventralmente, los pedipalpos son apenas visibles, el capítulo se encuentra totalmente visible de tal forma que incluso se puede apreciar estructuras más específicas que lo forman como los dientes del hipostoma y los cuatro segmentos que forman cada uno de los pedipalpos (fig. 25c). Al parecer el pedipalpo de la garrapata no tiene el diente de huevo diseñado para la eclosión en artrópodos ya que durante la eclosión de *P. tepidariorum* la membrana del huevo se rompe directamente por encima de los pedipalpos y continúa a lo largo de una línea de rotura predeterminada. Sin embargo, el papel de los dientes de huevo durante el proceso de eclosión aún no está claro a pesar de que la grieta en la membrana del huevo aparece directamente encima de un diente de huevo (Mittman y Wolff, 2012). La imagen obtenida por microscopio de inversión da una mejor visibilidad de los artejos que forman las patas de la larva (fig. 25d), así como el saco excretor de un color más oscuro, lo cual está en relación a lo mencionado por Campos *et al.*, (2006) donde mencionan que al final del desarrollo, sobre la terminación de la organogénesis, el aparato digestivo encierra la yema de

huevo y, por lo tanto el aumento de la tasa de degradación de vitelina que se observa en la última semana, se puede considerar por naturaleza como digestivo.

En conclusión se puede decir que la embriogénesis de la garrapata *R. microplus* es muy parecida a otros artrópodos quelicerados como las arañas ya que en general, presentan los mismos eventos o etapas en su desarrollo, aunque a diferente tiempo debido a la diferencia de especies; en la garrapata, las características más evidentes se logran apreciar a inicios de los nueve días de desarrollo con los brotes de las extremidades, sin embargo, el inicio de la organogénesis no se logró identificar debido a que ocurre en el interior del embrión; en esta investigación a diferencia del estudio realizado en *P. tepidariorum*, se logró observar la segmentación de la banda germinal al igual que lo reportado en la araña *C. salei*; en general este trabajo abordó una periodo de la vida de la garrapata, que durante años, a pesar de ser fundamental, no se había estudiado a profundidad, dando una visión más amplia de su biología para conocer su desarrollo, características y entender mejor este ectoparásito, para que en un futuro se pueden encontrar nuevas formas de alterar este desarrollo y así obtener más opciones de control de esta plaga.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alonso-Díaz M, Rodríguez-Vivas R, Fragoso-Sánchez H, Rosario-Cruz R. (2006). Resistencia de la garrapata *Boophilus microplus* a los ixodicidas. Archivos de Medicina Veterinaria 38(2):105-113.
- Beati L y Kerirans JE. (2001). Analysis of the systematic relationships among ticks of the genera *Rhipicephalus* and *Boophilus* (Acari: Ixodidae) base on mitochondrial 12S ribosomal DNA gene sequences and morphological characters. Journal of Parasitology 87(1):32-48.
- Beaty, Barry J. y William C. Marquardt. (1996). The Biology of disease vectors. University Prees of Colorado, Niwot, Colorado. 632pp.
- Botello AR, Botello AL, Borroto CN, Marisela Suárez, Pérez Dunia A, Rodríguez YV, Fajardo H, Pérez Kirenia C, González AO, Rodríguez AN, Linares Belkis R, Colicchia MR, Gómez IA, Peraza Paula S. y Gort AM. (2011). Control de garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en bovinos con el inmunógeno Herber biogar. Revista Electrónica de Veterinaria. 12(5):12
- Bravo M, Coronado A. y Henríquez H. (2008). Eficacia *in vitro* del amitraz sobre poblaciones de *Boophilus microplus* provenientes de explotaciones lecheras del estado Lara, Venezuela. Zootecnia Tropical 26(1):35-40.
- Brentrup D, Lerch H, Jackle, y Noll M. (2000). Regulation of *Drosophila* wing vein patterning: net encodes a bHLH protein repressing rhomboid and is repressed by rhomboid-dependent Egfr signaling. Development. 127(21):4729-4741.
- Campos E, Morales J, Façanha AR, Moreira E, Valle D, Abreu L, Manso PP, Nascimento A, Pelajo-Machado M, Lenzi H, Masuda A, Vaz Ida SJr, Logullo C. (2006). Kinetics of energy source utilization in *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) embryonic development. Veterinary. Parasitology 138:349-357.

- Canales M, Pérez J, Naranjo V, Nijhof A, Hope M, Jorgejan F y Fuente J. (2008). Expression of recombinant *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, *R. annulatus* and *R. decoloratus* Bm86 orthologs as secreted proteins in *Pichia pastoris*. BioMed Central. Biotechnology. 8:14
- Caribbean Animal Health Network CaribVET. (2011) [En línea] disponible en: <http://www.caribvet.net/es/diseases/babesiosis/monografia>
- Cordero M, Rojo F, Martínez A, Sánchez M, Hernández S, Navarrete I, Diez P, Quiroz H. y Carvalho M. (2002). Parasitología Veterinaria. 3ed. Ed. McGraw-Hill Interamericana. 507-510 pp.
- Cupp EW. (1991). Biology of ticks. The veterinary clinics of North America. Small animal Practice, 21(1):1-26.
- Domínguez D, Rosario R, Almazán C, Saltijeral J. y De la Fuente J. (2010). *Boophilus microplus*: aspectos biológicos y moleculares de la resistencia a los acaricidas y su impacto en la salud animal. Tropical and Subtropical Agroecosystems. 12.181-192.
- Don RA. (1960). Ticks, A monograph of the ixodidea. Part V, on the genera *Dermacentor*, *Anocentor*, *Cosmiomma* *Boophilus* and *Margaropus*. Great Britain. 206-212pp.
- FAO. (2003). Resistencia a los antiparasitarios, estado actual con énfasis en América Latina. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Estudio FAO producción y sanidad animal. 157. Roma, Italia.
- Fragoso H. (2012). Control de la garrapata “Viejos problemas, nuevas soluciones”. <http://veterinaria.uat.edu.mx>
- García A, (2004). Evaluación del Sistema de Agua de Circulación de una Central Nuclear mediante Técnicas de Microbiología Molecular. Tesis Doctoral. Departamento de Ingeniería y Ciencia de los Materiales. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Industriales (UPM).
- Gupta AP. (1979). Arthropod Phylogeny Ed. Van Nostrand Reinhold.

- Haugland R. (2002). Handbook of Fluorescent Probes and Research Products, Molecular Probes. 9a ed. 963pp.
- Hernández J. (2011). Resistencia de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* a Ixodicidas en unidades de Producción de los Municipios de Comapa y Manlio Fabio Altamirano, Ver. Tesis de Licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Veracruzana.
- Hoffmann A. y López-Campos, G. (2000). Biodiversidad de los Ácaros en México. Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad. CONABIO-UNAM. México.
- Krantz GW y. Walter DE. (2009). A manual of acarology. Ed. 3. 55-56pp.
- Logullo C, Moraes J, Dansa-Petretski M, VazJr IS, Masuda A, Sorgine MHF, Braz GR, Masuda H. y Oliveira PL. (2002). Binding and storage of heme by vitellina from the cattle tick, *Boophilus microplus*. Insect Biochemistry and molecular Biology. 32:1805-1811
- López Elkin, López Gustavo Y Orduz Sergio. (2009). Control de la garrapata *Boophilus microplus* con *Metarhizium anisopliae*, estudios de laboratorio y campo. Revista. Colombiana de Entomología. 35 (1):42-46
- Lorente A. y Fernández, M. (2008). Interacciones no covalentes con el ADN. Investigación Química-Universidad de Alcalá. Madrid 104 (4), 280-289.
- Mingfa Li, Marhold J, Gatos A, Török I. y Bernard M. (2001). Differential expression of two scribble isoforms during *Drosophila* embryogenesis. Elsevier. 108 185-190.
- Miranda-Miranda E, Cossío-Bayúgar R, Quezada-Delgado MDR, Olvera –Valencia F y Neri-Orantes S. (2009). Age-induced carboxylesterase expression in acaricide-resistant *Rhipicephalus microplus*. Research Journal.of Parasitology 4(3): 70-78.

- Mittmann, Beate, Wolff, Carsten. (2012). Embryonic development and staging of the cobweb spider *Parasteatoda tepidariorum* C.L. Koch, 1841 (syn: *Achaeearanea tepidariorum*; Araneomorphae; Theridiidae). Springer-Verlang 222:189-216.
- Muro F, Cruz-Vázquez C, Fernández-Ruvalcaba M. y Molina J. (2004). Efecto repelente de extractos de *Melinis minutiflora* sobre larvas de la garrapata *Boophilus microplus*. Vet Méx. Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España, Portugal. 35 (2).
- Núñez J, Muñoz-Cobeñas M y Moltedo H. (1985). *Boophilus microplus*, the common Cattle Tick. Springer-Verlang, Gerraania, pág.204
- Ojeda-Chi M, Rodríguez-Vivas R, Galindo-Velasco E, Lezama-Gutiérrez R y Cruz-Vazquez C. (2011). Control de *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) mediante el uso del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae). Revisión. Revista Mexicana. Ciencia Pecuaria; 2(2):177-192
- Quiroz HR, (1984). Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos. México: Limusa. 768-794pp.
- Robin P, Wharton y Gary Struhl (1991). RNA regulatory elements mediate control of Drosophila body pattern by the posterior morphogennanos. Cell, Vol 67: pp. 955-967.
- Rodríguez-Vivas R, Rosado A, Basto G, García Z, Rosario R. y Fragoso H. (2006). Manual técnico para el Control de Garrapatas en el Ganado Bovino. México.
- Rodríguez-Vivas RI, Arieta-Román RJ, Pérez-Cogollo JA, Ramírez-Cruz GT y Basto-Estrella G. (2010). Uso de lactonas macrocíclicas para el control de la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en el ganado bovino. Archivos de Medicina Veterinaria 42, 115-123.

- Rosario R, Domínguez D, Hernández R, Rojas E. (2006). Estrategias para el control integral de la garrapata *Boophilus Microplus* y la mitigación de la resistencia.
- Rosario-Cruz R, Domínguez-García D, Almazán-García C, Gutiérrez S y Hernández-Castro E. (2009) Avances en la Identificación de Polimorfismos útiles para el Diagnóstico de Resistencia a Ixodicidas en la garrapata *Boophilus microplus*. Universidad Autónoma de Aguas Calientes. *XVIII Congreso Nacional de Parasitología. Memorias*. 25-26 de septiembre de 2009.
- Schwartz V. (1977). Embriología animal comparada. Edición omega, Barcelona. 189pp.
- Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA); Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SANASICA) 2012. Situación Zoonositaria en los Estados de la República Mexicana (4 de mayo de 2012).
- Seixas A, Oliveira P, Termignonu C, Logullo C, Masuda A, e Itabara da Silva Vaz Jr. (2012). *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* embryo proteins as target for tick vaccine. *Vet Immunol and Immunopathol* 148,149-156.
- Seixas A, Oldiges DP, Vaz Jr, Itabajara da Silva y Termignoni C. (2010). Endocrinología y control de la vitelogénesis en garrapatas. *Acta Scientiae Veterinariae*. 38(2):95-111.
- Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. SENASA - Argentina. Enfermedades y plagas. Garrapata. (2006). Consultado el 23 de mayo de 2014. <http://www.senasa.gov.ar/contenido.php?to=n&in=878&io=4547>
- Soberanes N, Rosario R, Santamaría M y García Z. (2005). Variabilidad en la actividad General de Esterasas de la Garrapata *Boophilus microplus* y su relación con la resistencia a organofosforados. *Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, México*. 43 (2):239-246.

- Soulsby E.J.L. (1987). Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos. Cap. Familia Ixodidae Murray, 7ed. Ed Nueva Editorial Interamericana, S.A. de C.V. México D.F. 457-565pp.
- Spickett AM. (1994). Tick ecology. *International Journal for Parasitology*, 24(6):845-849.
- Voltzi OV. (1996). Functional morphology of support-fixation apparatus in the family ixodidae (Acarina). *Zhurnal Obshchei Biologii*, 57(4): 469-489.
- Watson JD, Baker TA, Bell SP, Gann A, Levine M y Losick R. (2004). *Molecular Biology of the Gene* 5ed. San Francisco: Benjamin Cummings. ISBN 0-321-22368-3.
- Wolpert L, Beddington R. Jessell T, Lawrence P, Meyerowitz E y Smith W. (2002). *Principles of Development* 2ed. Oxford: Oxford University Press. ISBN 0-19-879291-3.
- Willadsen P, Riding GA, McKenna RV, Kemp DH, Tellam RL, Nielsen JN, Lahnstein J, Cobon GS, Gough JM. (1989). Immunologic control of a parasitic arthropod. Identification of a protective antigen from *Boophilus microplus*. *Journal of Immunology*. 15; 143(4):1346-51.
- Williams RE. (2010). *Veterinary Entomology Livestock and Companion Animals*. Chapter 8. Ticks. CRC Press Taylor & Francis Group. United States of America. 165-192 pp.
- Wolff Carsten y Hilbrant Maarten. (2011). The embryonic development of the central American wandering spider *Cupiennius salei*. *Frontiers in Zoology*. 8:15.

APÉNDICE

Cuadro 6. Nomenclatura de las etapas embrionarias de la garrapata del ganado.

Clave	Concepto
Bl	Blastoporo
EP	Engrosamiento Primario
RE	Región extraembrionaria
BG	Banda Germinal
CD	Campo Dorsal
P	Pedipalpo
Ep1	Extremo podal 1
Ep2	Extremo podal 2
Ep3	Extremo podal 3
Ep4	Extremo podal 4
s1	Segmento idiosomal 1
s2	Segmento idiosomal 2
s3	Segmento idiosomal 3
s4	Segmento idiosomal 4
s5	Segmento idiosomal 5
s6	Segmento idiosomal 6
s7	Segmento idiosomal 7
s8	Segmento idiosomal 8
ZC	Zona de crecimiento
ZPg	Zona pregnatosomal
SV	Surco ventral
Q	Quelíceros
Lp	Lóbulo pre-quelicerar

C	Cerebro
lc1	lóbulo cerebral 1
lc2	lóbulo cerebral 2
lc3	lóbulo cerebral 3
lc4	lóbulo cerebral 4
SA	Surco anal
OA	Orificio anal
SE	Saco excretor
Pr	Peritrema
cx	Coxa
tr	Trocante
fe	Fémur
pa	Patela
ti	Tibia
ta	Tarso
Gn	Gnatosoma
Es	Escudo dorsal
H	Hipostoma
dH	Dientes del hipostoma
p1	Segmento 1 del pedipalpo
p2	Segmento 2 del pedipalpo
p3	Segmento 3 del pedipalpo
p4	Segmento 4 del pedipalpo
uñ	Uña