



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

DETERMINACIÓN DE APOPTOSIS EN CÉLULAS OVÁRICAS DE  
HEMBRAS DE *Rhipicephalus microplus* TRATADAS CON  
CARBAMATOS INHIBIDORES DE LA REPRODUCCIÓN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
LICENCIADO EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

PRESENTA:

OMAR ESCOBAR CHAVARRÍA

ASESOR: DR. MARCO ANTONIO MUÑOZ GUZMÁN

CO-ASESOR: DR. FERNANDO ALBA HURTADO

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2014.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U.N.A.M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUELLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN  
PRESENTE

ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

**Determinación de apoptosis en células ováricas de hembras de *Rhipicephalus microplus* tratadas con carbamatos inhibidores de la reproducción**

Que presenta el pasante: Omar Escobar Chavarría

Con número de cuenta: 307235228 para obtener el Título de: Licenciado en Bioquímica Diagnóstica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

**ATENTAMENTE**

**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"**

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 10 de septiembre de 2014.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	M. en C. Juan Pablo Martínez Labat	
<b>VOCAL</b>	MVZ. Jorge Torres Martínez	
<b>SECRETARIO</b>	Dr. Marco Antonio Muñoz Guzmán	
<b>1er. SUPLENTE</b>	MVZ. Gabriela Fuentes Cervantes	
<b>2do. SUPLENTE</b>	M. en C. Maritere Domínguez Rojas	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

HMI/iac

# DEDICATORIAS

A MIS PADRES:

CARMEN CHAVARRIA GARCIA Y RENE ESCOBAR TREJO  
POR TODO SU APOYO, CONSEJOS Y POR NO DEJAR DE  
CREEN EN MI.

A MIS HERMANOS:

RENE Y XOCHITL POR SU COMPAÑÍA Y ENSEÑANZAS.

A SANDY:

POR TODO TU APOYO, COMPRESION, POR LOS CONSEJOS  
QUE ME BRINDASTE , POR AYUDARME A SUPERARME Y A  
SER UNA MEJOR PERSONA. TE QUIERO.

A MIS AMIGOS Y COMPAÑEROS:

ALBERTO, CÉSAR, PEDRO, RICARDO, SANDRA, TABATA,  
LUPITA, ELY, EDER, VICTOR Y TODOS LOS QUE FALTAN  
NOMBRAR GRACIAS POR LO MAS VALIOSO QUE ME  
OFRECIERON SU AMISTAD.

A TODAS LAS PERSONAS QUE ME APOYARON

## AGRADECIMIENTOS.

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por abrirme sus puertas para recibir la educación y preparación que me han formado hasta hoy.

A la Facultad de estudios Superiores Cuautitlán por brindarme el espacio y la capacitación para realizar mi educación superior.

Al Dr. Marco Antonio Muñoz Guzmán por dirigir este trabajo y por sus grandes contribuciones, su tiempo y su apoyo.

Al Dr. Fernando Alba Hurtado por la confianza que me brindo, por todos los consejos para realizar este trabajo y por las contribuciones para mi vida profesional.

Al laboratorio de Química Medicinal de la FES Cuautitlán por el desarrollo de los carbamatos con los que se realizo este trabajo.

A los miembros del jurado: M. en C. Juan Pablo Martínez Labat, MVZ. Jorge Torres Martínez, Dr. Marco Antonio Muñoz Guzmán, MVZ. Gabriela Fuentes Cervantes, M. en C. Maritere Domínguez Rojas. Por sus contribuciones para mejorar este trabajo.

Al M. en C. César Cuenca Verde por su apoyo técnico y sus contribuciones con mi formación.

A la Dra. María Guadalupe Prado Ochoa por compartir sus conocimientos y experiencias para enriquecer este trabajo.

# ÍNDICE

ÍNDICE .....	I
ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS .....	III
ABREVIATURAS.....	IV
RESUMEN .....	V
1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Situación de la ixodidosis por <i>Rhipicephalus microplus</i> en México.....	1
1.2 GENERALIDADES SOBRE <i>R. microplus</i> .....	2
1.2.1 Importancia económica. ....	3
1.2.2 Clasificación taxonómica .....	4
1.2.3 Morfología .....	4
1.2.4 Ciclo de vida.....	9
1.3 PATOGENIA .....	10
1.4 CONTROL.....	11
1.4.1 Control no químico .....	12
1.4.2 Control químico .....	13
1.5 RESISTENCIA A IXODICIDAS .....	15
1.5.1 Resistencia en México.....	16
1.6 CARBAMATOS .....	17
1.7 NUEVOS CARBAMATOS EN ESTUDIO PARA EL CONTROL DE <i>R. microplus</i> .....	18
2 HIPÓTESIS.....	20
3 OBJETIVOS.....	21
4 MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
4.2 Ubicación. ....	22
4.3 Carbamatos.....	22
4.4 Cepa de garrapatas.....	23
4.5 Técnica de Inmersión de Adultas. ....	23
4.6 Preparación de cortes histológicos .....	24

4.7	Prueba de TUNEL.....	24
4.8	Conteo de células apoptóticas.....	25
4.9	Análisis Estadístico.....	25
5	RESULTADOS.....	27
6	DISCUSIÓN.....	33
7	CONCLUSIONES.....	36
8	REFERENCIAS.....	37

## ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro 1. Reportes de resistencia de <i>R. microplus</i> a diferentes ixodicidas en distintos países del mundo.....	16
Figura 1. Distribución geográfica de <i>R. microplus</i> en México.....	2
Figura 2. Morfología de <i>R. microplus</i> .....	5
Figura 3. Esquema del sistema genital femenino de <i>R. microplus</i> ; Vista lateral.....	6
Figura 4. Esquema de los diferentes estados de desarrollo de los ovocitos de <i>R. microplus</i> .....	8
Figura 5. Ciclo de vida de <i>R. microplus</i> .....	10
Figura 6. Estructura química general de los carbamatos .....	17
Figura 7. Estructura y pesos moleculares de los carbamatos evaluado.....	22
Figura 8. Diseño Experimental .....	26
Figura 9. Media ( $\pm$ EEST) del número de células apoptóticas en epitelio ovárico de garrapatas <i>Rhipicephalus microplus</i> en diferentes días pos-tratamiento con el etil-4-bromofenilcarbamato .....	27
Figura 10. Media ( $\pm$ EEST) del número de células apoptóticas en epitelio ovárico de garrapatas <i>Rhipicephalus microplus</i> en diferentes días pos-tratamiento con el etil-4-clorofenilcarbamato .....	28
Figura 11. Ensayo de TUNEL en ovarios de hembras repletas de <i>R. microplus</i> después de 1 día p.t. con dos diferentes carbamatos .....	30
Figura 12. Ensayo de TUNEL en ovarios de hembras repletas de <i>R. microplus</i> después de 3 días p.t con dos diferentes carbamatos .....	31
Figura 13. Ensayo de TUNEL en ovarios de hembras repletas de <i>R. microplus</i> después de 7 días p.t con dos diferentes carbamatos .....	32

## ABREVIATURAS

AChe	Acetilcolinesterasa
DMSO	Dimetilsulfóxido
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
SAGARPA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, desarrollo Rural, Pesca, y Alimentación
SENASICA	Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimenticia.
TUNEL	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase-dUTP nick end labeling.</i>
USDA	Departamento de Agricultura de Estados Unidos.
p.t.	Post-tratamiento.

## RESUMEN

Los nuevos carbamatos sintéticos, etil-4-bromofenilcarbamato y etil-4-clorofenilcarbamato, afectan parámetros biológicos y reproductivos en la garrapata del ganado *Rhipicephalus microplus*. A nivel histológico, estos carbamatos inducen picnosis, degeneración y vacuolización de las células ováricas de las garrapatas. No existen estudios que describan completamente el mecanismo de acción de estos carbamatos por lo que en este trabajo se estudió su capacidad de inducción de apoptosis en células de ovarios de *R. microplus*. Se utilizaron 150 hembras repletas de *R. microplus*. Cinco grupos de 10 garrapatas fueron tratadas por pruebas de inmersión con 1mg/ml de etil-4-bromofenilcarbamato, 5 grupos de 10 garrapatas con 1 mg/ml de etil-4-blorofenilcarbamato y otros 5 grupos de 10 garrapatas fueron tratadas solo con el vehículo como grupo testigo. Diez garrapatas de cada uno de los grupos fueron diseccionadas en los días 0, 1, 3 ,5 y 7 post-tratamiento (p.t.). Los ovarios fueron procesados por histología convencional y se realizó ensayo de TUNEL para su posterior observación y conteo de células apoptóticas por mm<sup>2</sup>. El número de células apoptóticas fue mayor ( $p < 0.001$ ) a partir del día 3 p.t. en ovarios de garrapatas tratadas con etil-4-bromofenilcarbamato y durante todos los días que duró el experimento en ovarios de garrapatas tratadas con etil-4-clorofenilcarbamato, comparados con el respectivo grupo control. Además, los ovocitos de las garrapatas tratadas con ambos carbamatos, sufrieron degeneración de la vesícula germinal, fragmentación nuclear, vacuolización, alteración de la membrana celular y reducción en el depósito del corion. En conclusión se demostró que los carbamatos inducen un aumento en la apoptosis de las células del ovario de *R. microplus*, lo que puede explicar la inhibición de la maduración de los ovocitos y la reducción en la cantidad y viabilidad de los huevos producidos por las garrapatas expuestas a estos carbamatos.

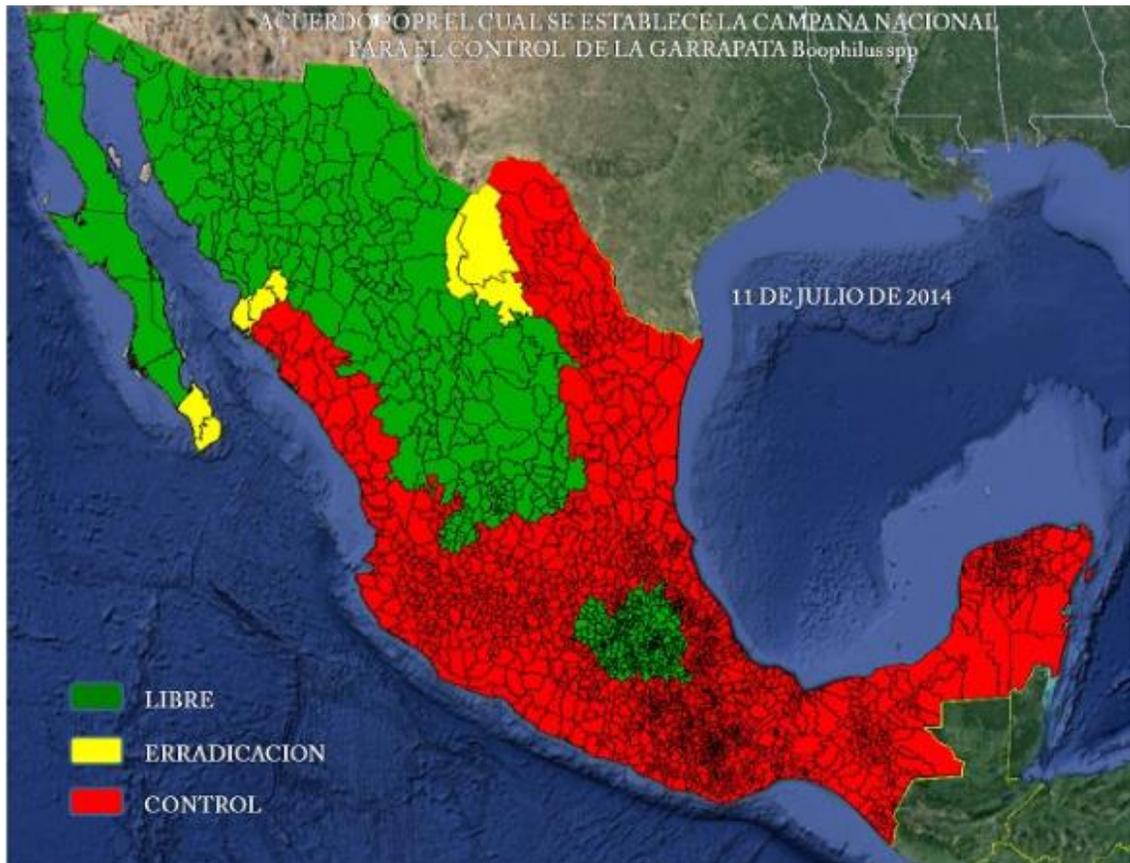
## 1. INTRODUCCIÓN

La garrapata *Rhipicephalus microplus* se considera el principal ectoparásito que afecta al ganado bovino (Alonso-Díaz *et al.*, 2007). Esta garrapata es originaria del continente asiático, pudo ser introducida a la mayoría de los países tropicales a través de la importación de ganado (Cortés *et al.*, 2010). *R. microplus* se distribuye geográficamente entre los paralelos 32 norte y 32 sur, y tiene un impacto negativo en la salud del ganado bovino, debido a su papel como vector de hemoparásitos como *Babesia sp.* y *Anaplasma sp.* Además de generar pérdidas económicas, al afectar la producción de leche, carne y pieles (Alonso-Díaz *et al.*, 2006; Cortés *et al.*, 2010). El principal método de control de *R. microplus* es la aplicación de productos químicos ixodicidas. Existen diferentes productos que se han utilizado para el control de garrapatas, incluyendo los arsenicales, organoclorados, organofosforados, carbamatos, amidinas, piretroides y lactonas macrocíclicas (Soberanes-Céspedes *et al.*, 2002). El control químico se ha vuelto ineficaz en algunas regiones debido a la aparición de garrapatas resistentes a los productos mencionados, por lo que el desarrollo de nuevos ixodicidas es una estrategia, con la cual se contrarresta dicha resistencia (Pérez-González *et al.*, 2013).

### 1.1 Situación de la ixodidosis por *Rhipicephalus microplus* en México.

En México la erradicación de *R. microplus* inicio en la segunda mitad del siglo XX, como intentos aislados de algunos estados como Sonora y Tabasco. En 1960 inició una campaña en Sonora que ayudo a la liberación de 2.5 millones de hectáreas donde estaba presente este parásito. Actualmente La Campaña Nacional contra la garrapata ha dividido al país en tres zonas (Figura 1). La zona libre comprende 94.4 millones de hectáreas, las cuales equivalen al 47.88% del territorio nacional. La zona de erradicación cuenta con 1.1 millones de hectáreas aquí se ubican las áreas donde el parásito ha sido erradicado por efectos de la

campaña que representa el 0.57% del territorio y la zona de control que abarca una superficie de 101.6 millones de hectáreas correspondientes al 51% del país (SAGARPA-SENASICA, 2014).



**Figura 1.** Distribución geográfica de *R. microplus* en México (SAGARPA-SENASICA, 2014).

## 1.2 GENERALIDADES SOBRE *R. microplus*

*R. microplus* es una garrapata dura de un solo hospedero, que afecta al ganado bovino y se encuentra distribuida ampliamente en las regiones tropicales y subtropicales en todo mundo (Alonso-Días *et al.*, 2007b ; Ojeda-Chi *et al.*, 2011).

Esta garrapata de origen asiático fue introducida a México por el sur de los Estados Unidos país en que actualmente se encuentra erradicada (Bravo *et al.*, 2008).

#### 1.2.1 Importancia económica.

Las pérdidas económicas producidas por *R. microplus* se dan a través de daños directos en los animales, así como, en los productos derivados de dichos animales como pieles, leche y carne. Además, de daños indirectos generados por la transmisión de agentes infecciosos como *Babesia sp.* y *Anaplasma sp.*, cuyo vector es esta garrapata. De manera extra se añaden a los gastos, los costos de los productos químicos utilizados en el control de dicha garrapata, la mano de obra, el equipamiento, las pérdidas asociadas al tratamiento y el costo de mantener bajo control las garrapatas. Las pérdidas económicas causadas por este parásito son tan grandes que en Australia se estiman en 100 millones de dólares australianos por año, mientras que en México son de 48 millones de dólares americanos por año (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2012).

México exporta cerca de 1.3 millones de cabezas de ganado en pie a los Estados Unidos de América (EE.UU), lo que genera ganancias que oscilan entre 500 y 700 millones de dólares por año (Domínguez-García *et al.*, 2010), dichas ganancias se ven severamente amenazadas debido a la aparición de garrapatas resistentes a los ixodídeos comerciales usados en México, por lo que las garrapatas son cada vez más difíciles de controlar y erradicar, esto genera un problema para los productores y exportadores mexicanos, a los que cada vez les es más problemático movilizar el ganado debido a los cercos sanitarios y el rechazo de ganado mexicano por inspectores del Departamento de Agricultura (USDA) de los EE.UU. (George, 2008; Domínguez-García *et al.*, 2010).

### 1.2.2 Clasificación taxonómica

*R. microplus* tiene la siguiente clasificación taxonómica: *Phylum: Arthropoda*, Clase: *Arachnida*, Orden: *Acarina*, Suborden: *Metastigmata*, Familia: *Ixodidae*. Anteriormente era conocida como *Boophilus microplus* pero en 2004 fue reclasificada por su relación filogenética con el género *Rhipicephalus* (Barker y Murrell, 2004).

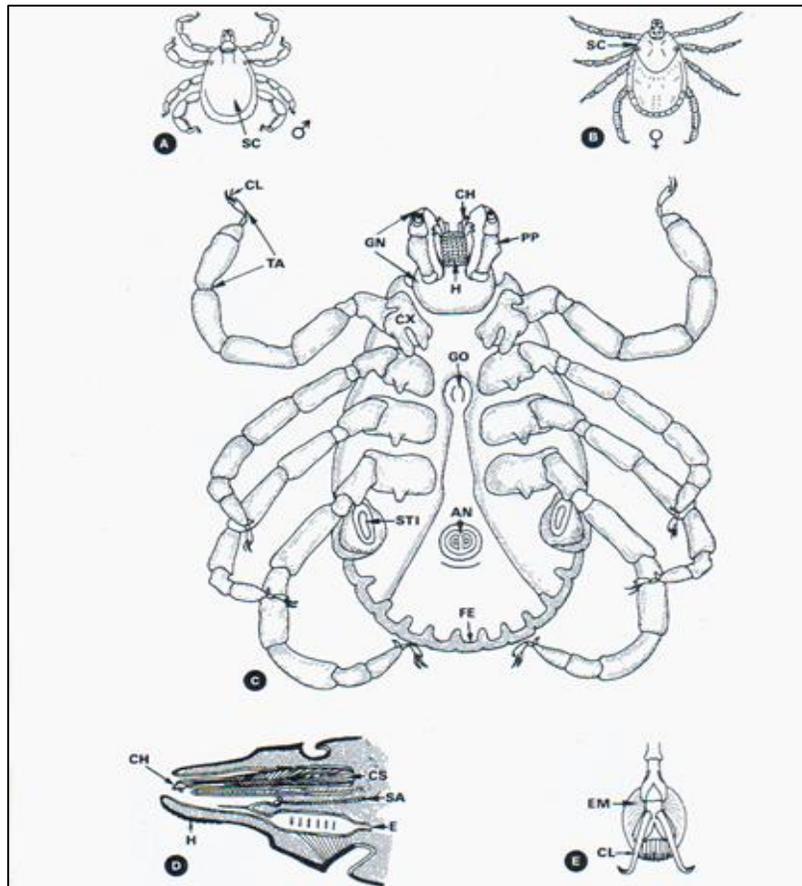
### 1.2.3 Morfología

Las garrapatas pertenecientes a la familia *Ixodidae* se caracterizan por poseer un escudo dorsal; este es completo en el caso de los machos e incompleto en el caso de las hembras (Figura 2 A y B), lo cual permite que el abdomen de las hembras pueda crecer lo suficiente para contener hasta dos centímetros cúbicos de sangre. Presentan dimorfismo sexual muy marcado, siendo la hembra de un tamaño mayor que el del macho. Las larvas tienen tres pares de patas y en su fase de ninfa y adulto tienen cuatro pares de patas (Mehlhorn, 1988).

La estructura de la garrapata está dividida en dos porciones, consistiendo en el capítulo o gnatosoma y el cuerpo o idiosoma (Figura C). El gnatosoma está formado por dos palpos conformados por cuatro segmentos cada uno. Los palpos se encuentran protegiendo al hipostóma que está formado por la porción alimenticia, donde se encuentran un par de órganos aplanados lateralmente con unas pequeñas puntas; estos órganos son conocidos como quelíceros, que sirven para rasgar la piel del hospedero e introducir el hipostóma en su conjunto (Figura 2 D) (Mehlhorn, 1988).

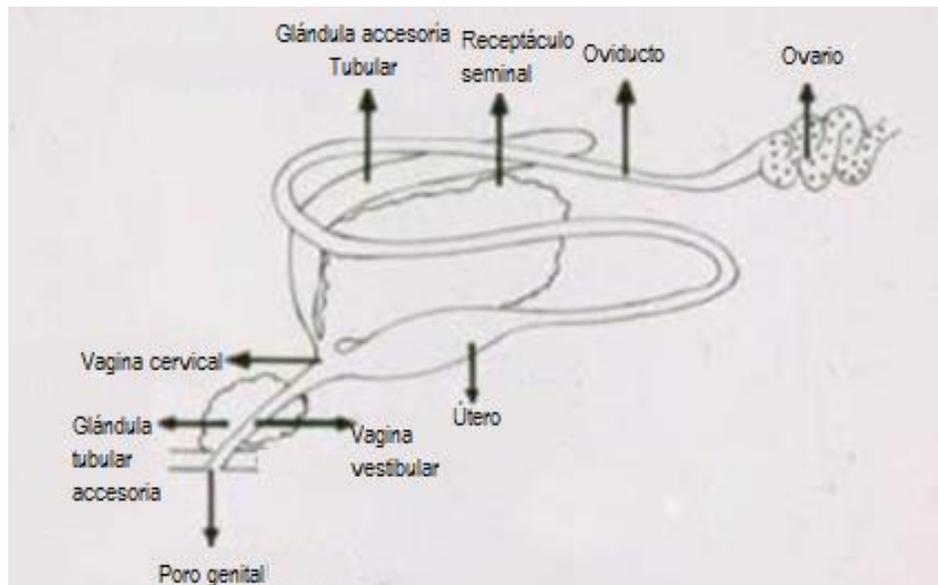
La base del gnatosoma, que en *R. microplus* es de forma hexagonal está unida al cuerpo por una membrana flexible. El idiosoma es posterior al gnatosoma. En la parte anterior del idiosoma se encuentran las patas y el poro genital, en la parte posterior los espiráculos respiratorios y el ano. El orificio genital está cerrado

y no es apreciable en larvas y ninfas, mientras que en adultos está abierto y visible (Anderson *et al.*, 2008). Las patas de la garrapata están formadas por una serie de secciones articuladas entre sí que son: coxa, trocánter, fémur, tibia, protarso y tarso (Figura 2 E). Las larvas tienen en el tarso del primer par de patas, un órgano sensitivo llamado órgano de Haller, formado por una serie de pelillos que detectan diferentes estímulos como olores, vibraciones, temperatura y químicos (Mehlhorn, 1988).



**Figura 2.** Morfología de *R. microplus*. A y B estructura de macho y hembra respectivamente, C vista ventral, D secciones de las piezas bucales, E vista dorsal del tarso. AN, Ano; CH, quelícero; CL, garra; CS vaina del quelícero; CX, coxa; E, esófago; EM, pulvillo; FE, festón; GN, gnatosoma (capítulo); GO, abertura genital; H, Hipostóma; PP, pedipalpos; SA, ducto salival; SC, escudo; TA, Tarso (Mehlhorn, 1988).

La estructura del sistema genital femenino en garrapatas duras consiste en: los ovarios tubulares simples en forma de “U” localizados en la región posterior del cuerpo, los oviductos que son estructuras plegadas ubicados en ambos extremos, los cuales se unen a un útero en común. El útero se une con la vagina, que está dividida en vagina cervical y vagina vestibular. El receptáculo seminal situado en la pared del útero tiene una conexión con la vagina cervical. Una glándula tubular accesoria vierte una secreción en la unión de la vagina cervical y la vagina vestibular. Rodeando la vagina vestibular está una glándula epitelial, conocida como glándula lobular accesoria como se muestra en la figura 3 (de la Vega *et al.*, 2012).



**Figura 3.** Esquema del sistema genital femenino; Vista lateral (De la Vega., 2012)

El ovario de la garrapata *R. microplus* está compuesto por una pared de células epiteliales con núcleos redondos, los ovocitos en diferentes estados de desarrollo están unidos al pedicelo, el cual tienen la función de generar nutrientes para incorporarlos al ovocito durante su desarrollo. Los pedicelos están unidos a la pared de los ovocitos y están compuestos por células semejantes a las de la pared epitelial. Una vez maduros los ovocitos son liberados en el lumen del ovario y de

ahí al exterior, Saíto y colaboradores en 2005 sugirieron una clasificación para los ovocitos según su estado de desarrollo basándose en la clasificación previa propuesta para estados de desarrollo de los ovocitos de *Amblyoma cajennense*. La clasificación de los estados de desarrollo de *R. microplus* se muestran a continuación, además de que se pueden visualizar en la figura 4.

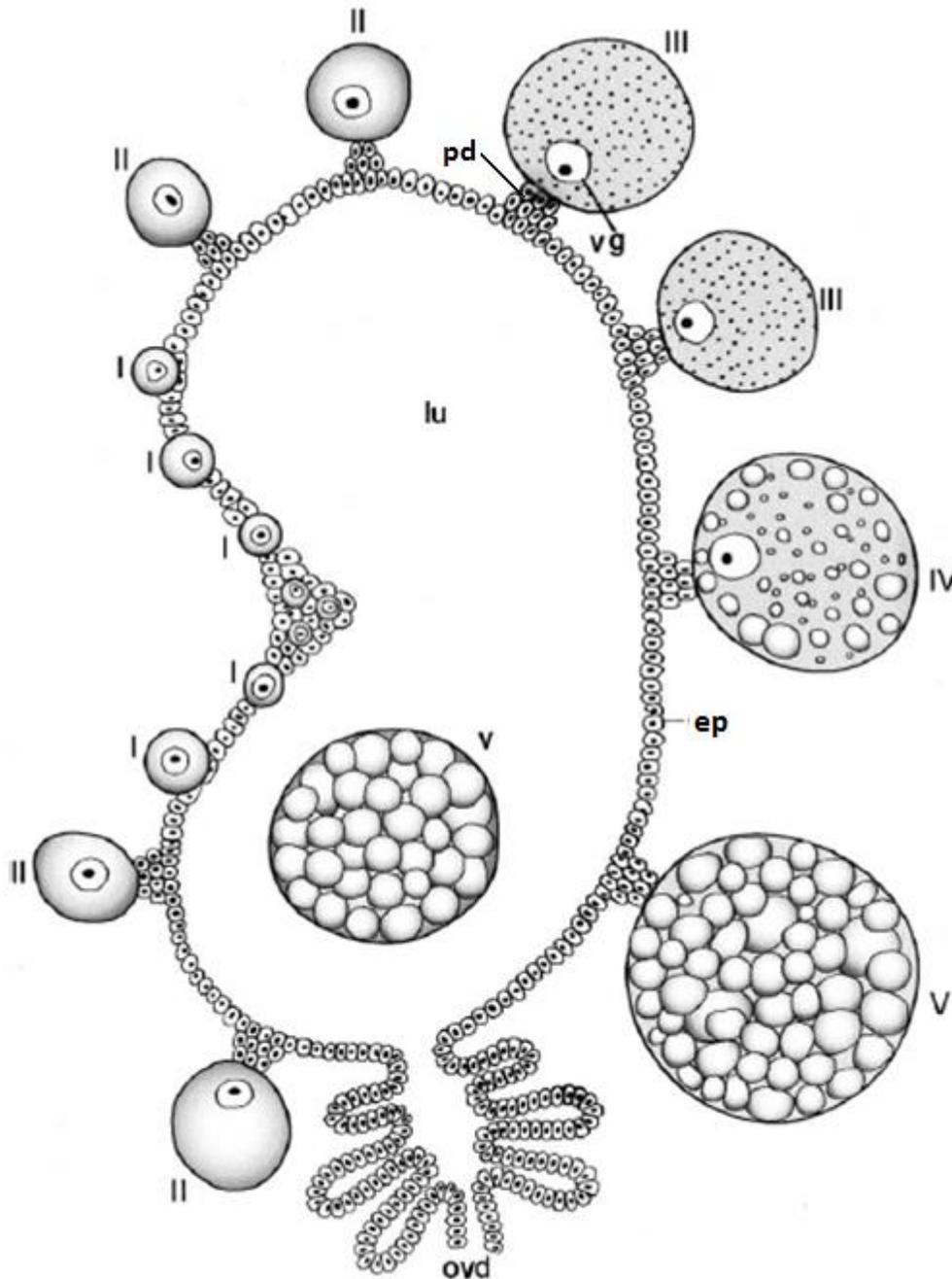
Ovocito I: Se caracteriza por su pequeño tamaño redondeado, con su membrana plasmática relativamente delgada, además de que contiene una vesícula germinal, con un nucléolo evidente.

Ovocito II o pre-vitelogénico: Es un poco mayor que el estado de desarrollo anterior, existe una cantidad ligera de gránulos en el citoplasma.

Ovocito III o vitelogénico: En este estadio el ovocito es considerablemente más grande, posee una vasta concentración de gránulos en el citoplasma, la vesícula germinal, se sitúa en uno de los polos cerca de la pared del ovocito, además que de la membrana se inicia la formación de un depósito de corión.

Ovocito IV: Existe la formación de yema en el centro del ovocito proveniente de los gránulos de la periferia, la presencia de la vesícula germinal es evidente y la deposición de corion está completa.

Ovocito V: es un ovocito bien desarrollado, la yema está en gránulos por todo el citoplasma, la vesícula germinal es poco visible.



**Figura 4.** Esquema de los diferentes estados de desarrollo de los ovocitos de *R. microplus*. I= ovocito I, II= ovocito II, III=ovocito III, IV= ovocito IV, V= ovocito V, ep= epitelio ovárico, ovd= oviducto, lu= lumen, vg= vesícula germinal. (Freitas *et al.*, 2007)

#### 1.2.4 Ciclo de vida

*R. microplus* presenta 4 estadios evolutivos: Huevo, larva, ninfa y adulto. Su ciclo de vida tiene una fase parásita y otra no parásita, como se muestra en la figura 5. La fase no parásita inicia cuando una hembra repleta de sangre separa sus piezas bucales del hospedero y se deja caer al suelo, donde busca un lugar protegido de la luz y del sol. El período de preoviposición tarda entre 3 y 9 días y el periodo de oviposición dura entre 9 y 34 días dependiendo de las condiciones ambientales. Cada garrapata produce entre 1500 y 4500 huevos. Las larvas eclosionan del huevo en un periodo de entre 20 y 120 días, en principio se alimentan de su vitelo el tiempo necesario para subir a lo alto del pasto y esperar a sus hospederos (Gallardo y Morales, 1999).

La fase parásita inicia cuando la larva sube al hospedero atraída por el calor y el CO<sub>2</sub> que desprende, busca una zona adecuada para la implantación, generalmente prefiere las partes protegidas de la luz solar y los depredadores naturales (pájaros). Inserta sus piezas bucales para comenzar a alimentarse y entre el día 5 y 8 muda a estadio de ninfa, después del día 8 y hasta el día 25 se pueden encontrar fases adultas. En promedio 21 días después de que la larva sube al hospedero, las hembras ya fecundadas se ingurgitan en unas horas y se desprenden de su hospedero para un nuevo ciclo (Gallardo y Morales, 1999).

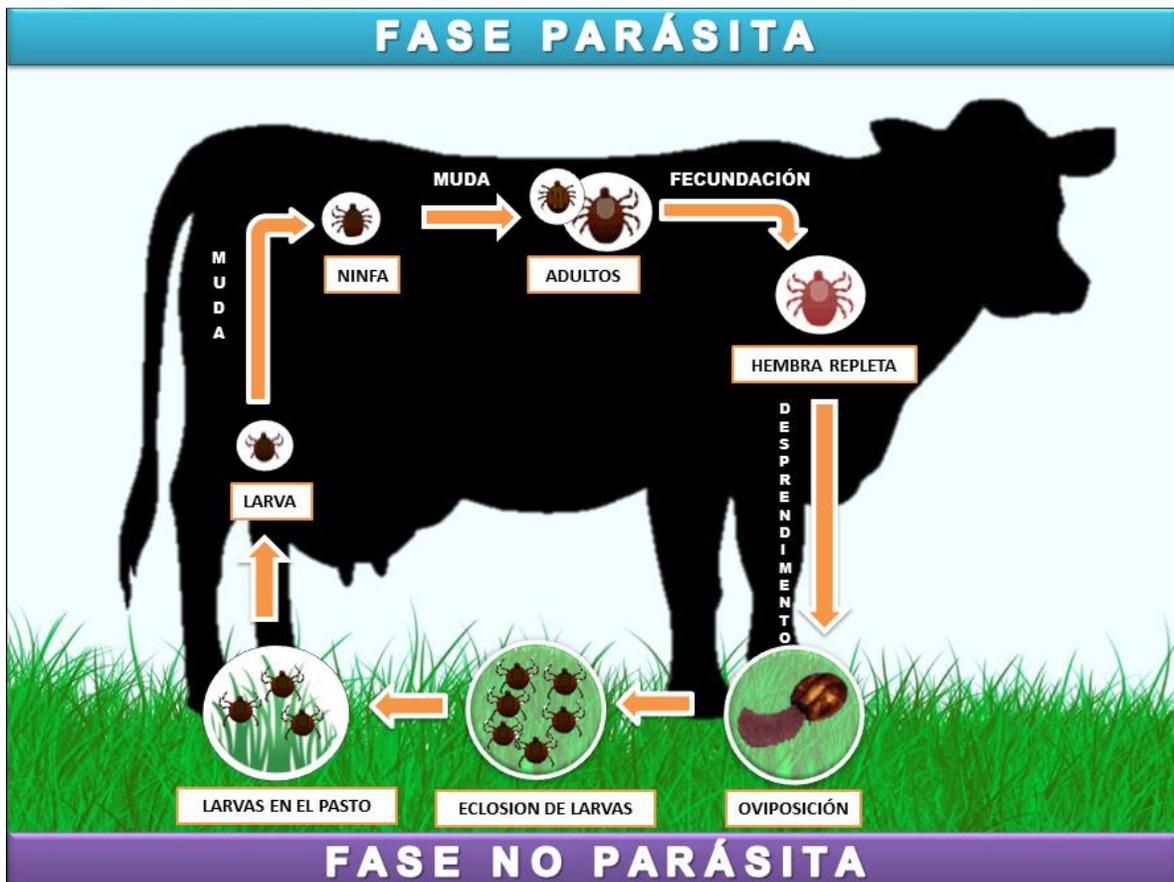


Figura 5. Ciclo de vida de *R. microplus* (Iturbe-Requena, 2014).

### 1.3 PATOGENIA

Los mecanismos de acción patogénica de los que se vale *R. microplus* son variados y genera daños por acción traumática, expoliatriz, tóxica e inoculatriz.

La acción traumática corresponde a una afección mecánica causada por la garrapata al perforar la piel del hospedero con las piezas bucales, lo que ocasiona daños en la piel, causando pérdidas económicas al depreciarse las pieles afectadas (Jonsson, 2006).

La acción expoliatriz consiste en la succión de sangre y líquidos tisulares, cuyo efecto lleva a una anemia. Se ha estimado que la pérdida de sangre por cada garrapata de entre 1mL y 3 mL. La anemia es la afección más evidente ya que causa pérdida de peso; la anemia puede agravarse por acción de hemoparásitos que producen antígenos que intervienen en la lisis de eritrocitos por acción del sistema inmune del hospedero. Además, se ha sugerido que las infestaciones masivas disminuyen el apetito de bovinos, por lo que en bovinos de leche se produce una disminución en su producción de leche y en general, disminución del condición de corporal de los bovinos (Jonsson, 2006).

La acción toxica es ocasionada por secreción de sustancias químicas por parte del parásito, estas sustancias en la garrapata *R. microplus* está dada por la secreción de saliva, en experimentos sobre ganado Hereford se ha demostrado que la concentración de linfocitos T es menor en sangre de bovinos infestado con garrapatas por primera vez, además se han detectado prostaglandinas en la saliva de las garrapatas que actúan como vasodilatadores que evitan que la sangre de los vasos sanguíneos circundantes se coagule. Sin embargo a pesar de todos estos mecanismos, se sabe que las durante las infestaciones se da una respuesta inmune que es eficiente para controlar dichos ectoparásitos (Inokuma *et al.*, 1992).

Acción inocultriz radica en que las garrapatas pueden transmitir agentes infecciosos como virus, bacterias, rickettsias y protozoarios. *R. microplus* es vector de *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* y *Anaplasma marginale*. Estos microorganismos son causantes de enfermedades que llevan a la anemia, baja producción física y mortalidad (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2010).

#### 1.4CONTROL

Los métodos actuales para el control de las garrapatas implican el uso de métodos químicos y no químicos. El principal método de control de *R. microplus* es la aplicación de ixodicidas (Soberanes-Céspedes, 2002).

#### 1.4.1 Control no químico

El control no químico engloba todas las acciones de control para las garrapatas que no utilizan productos químicos, entre las que se encuentra la selección de razas resistentes de ganado. Las razas de ganado *Bos indicus*, son razas originarias de climas tropicales y son más resistentes que las razas de origen europeo *Bos Taurus*. La resistencia de las razas a las infestaciones con *R. microplus* tiene relación con diversos factores, como, un mayor espesor de la piel, mayor secreción de histamina por parte del hospedero, así como una mayor concentración de linfocitos T circulantes y anticuerpos (Joonson *et al.*, 2006; Piper *et al.*, 2009). Existen en el mercado vacunas como: TickGARD Plus® y Gavac® para el control de garrapatas que se basan en el antígeno recombinante Bm86, el cual es una glicoproteína expresada en células intestinales de la garrapata, por lo que la vacuna no tiene efecto sobre la garrapata hasta que esta ingurgita sangre de un hospedero vacunado, La vacuna por sí sola no es un método efectivo, ya que al no expresar el antígeno directamente sobre el sistema inmune del hospedero, se debe realizar un refuerzo en un periodo de 6 a 10 meses. Añadiendo que dicha vacuna no tiene un efecto inmediato sobre animales infestados, alcanzando rangos de efectividad de entre el 46 y 49 %. Por lo que es necesario aplicar la vacuna junto con un ixodicida (Nijhof *et al.*, 2007; Casquero *et al.*, 2011).

Otras opciones para el control, incluyen depredadores naturales tales como hormigas de los géneros *Iridomyrmex*, *Asphaenogaster* y *Pheidole*, nematodos como *Steinernema capocapsae*, y varias especies de aves como las del género *Bubulcis ibis*, *Buphagus Sp*, *Machetornis rixosa*, entre otras ; la introducción de patógenos como los hongos entomopatogenos del género *Beuveria* y *Metarhizium*, en estudios con *M. anisopliae* en condiciones de laboratorio ha encontrado una efectividad del 100% sobre huevos y adultos utilizando  $10^8$  conidias/mL, sin embargo en infestaciones naturales aplicando la misma concentración del hongo, la efectividad fue apenas del 46%. El uso de extractos de plantas como las del

genero *Stylosanthes* y el uso de plantas forrajeras que dificultan la infestación de los hospederos como *Melinis minutiflora*, *Andropogon gayanus* y *Brachiaria brizantha* (Bezuidenhout y Stutterheim, 1980; Rodríguez-Diego *et al.*, 1984; Fernández-Ruvalcaba *et al.*, 2004; Alonso-Díaz *et al.*, 2007a; Villalobos *et al.*, 2010; Ojeda-Chi *et al.*, 2011).

#### 1.4.2 Control químico

Los primeros intentos para controlar a las garrapatas en el ganado, incluían untar sobre el animal productos como queroseno, azufre, aceite de pescado, petróleo crudo y mezclas de estos. (George, 2004). Hasta 1895 se observó que las inmersiones en soluciones de arseniatos eran efectivas en el control de *R. annulatus* y *R. microplus*. El arsénico resulto ser muy efectivo ya que inhibe enzimas indispensables en la respiración celular de estos parásitos, aunque el uso de este producto tenía complicaciones ya que era difícil determinar la dosis letal del hospedero y la dosis efectiva para las garrapatas, con el tiempo surgieron reportes de garrapatas resistentes a este producto en diferentes lugares del mundo (Angus *et al.*, 1996; FAO, 1998; George *et al.*, 2004).

En la década de los 40's surgieron los organoclorados, que fueron los primeros insecticidas orgánicos sintetizados para el control de garrapatas. El DDT (diclorodifeniltricloroetano) y BHC (Hexacloruro de Benceno) que se almacenaban en el cuerpo de manera indefinida y resultaron tener efectos carcinogénicos. Estos actúan como moduladores de canales de sodio de las membranas nerviosas (George *et al.*, 2004; Devine *et al.*, 2008). Después de los reportes de resistencia a los organoclorados, los organofosforados y carbamatos fueron utilizados para el control de garrapatas. Los organofosforados como Etion, Clorpirifos y Coumafós son los más utilizados a nivel mundial al igual que los carbamatos como Carbaril y Propoxur, actúan sobre sistema nervioso central, inhibiendo la enzima acetilcolinesterasa, por lo que en mamíferos resultan altamente tóxicos (George *et al.*, 2004).

Las formamidinas fueron desarrolladas en 1970, estas son antagonistas de los receptores de la octopamina en los parásitos, lo que provoca una hiperexcitabilidad seguida de la muerte. Los principales fármacos que contienen formamidinas, son Clenpirina, Clorometiuron, Clordimeform y el Amitraz (George *et al.*, 2004). Los Piretroides son sustancias químicas sintéticas derivadas de las piretrinas inestables a la luz solar. Algunos ejemplos de los primeros piretroides son la Piretrina y el Fenxarelato. Los piretroides tienen efectos sobre el transporte de sodio en las membranas nerviosas (Narahashi, 1971; Rodríguez-Vivas, *et al.*, 2010).

Las lactonas macrocíclicas son moléculas complejas derivadas de la fermentación de actinomicetos, estas se componen por dos grandes familias: Las avermectinas y milbemicinas. Las avermectinas provienen del actinomiceto *Streptomyces avermitilis*, mientras que las milbemicina proviene de *Streptomyces cyaneogriseus*. (Rodríguez-Vivas, *et. al* 2010). Las lactonas macrocíclicas son activas para el control de nematodos y artrópodos a dosis bajas en la mayoría de los animales. Se absorben por todas las vías debido a su alta liposolubilidad y se distribuyen ampliamente a luz intestinal, grasa y piel, Estas ejercen su efecto antiparasitario al incrementar la permeabilidad de la membrana por los iones cloro con la consecuente hiperpolarización y parálisis de la musculatura del parásito (George, *et. al* 2004; Rodríguez-Vivas, *et al.* 2010).

Los fenilpirazoles son productos eficientes contra artrópodos, y helmintos, se han utilizado en los últimos años para el control de garrapatas en América Latina, tiene una eficiencia del 99% y el periodo de protección contra reinfestación cubre hasta ocho semanas posteriores a la aplicación, además de que tienen una resistencia a la luz solar y al agua. Los fenilpirazoles actúan como antagonistas del neurotransmisor GABA interfiriendo con los canales de cloruro de la membrana e interrumpiendo la transferencia de iones y por tanto la transmisión de impulsos entre células nerviosas. (George *et al.*, 2004; Devine *et al.*, 2008). Los inhibidores de la quitina como fluazuron, diflubenzuron, lufenuron y flufenoxuron son utilizados

contra garrapatas, teniendo un efecto sobre garrapatas repletas al reducir la fecundidad cerca de cero (George *et al.*, 2004).

## 1.5 RESISTENCIA A IXODICIDAS

El control químico de las garrapatas se ha vuelto ineficaz en algunas regiones debido a la aparición de garrapatas resistentes a los ixodicidas. La resistencia se define como la capacidad adquirida por los individuos de una población parásita que les permite sobrevivir a dosis de químicos que generalmente son letales para una población normal desde la aparición del primer caso de resistencia a arsenicatos en 1937, se ha detectado una resistencia progresiva a los ixodicidas por parte de las garrapatas que ha impedido controlarlas (La resistencia de *R. microplus* se ha descrito para organofosforados, piretroides sintéticos, amidinas y lactonas macrocíclicas, alrededor de Australia y América Latina, así como en otros países a lo largo de los años como se observa en el cuadro 1. (Alonso-Díaz *et al.*, 2006; Rodríguez-Viva *et al.*, 2012).

La resistencia de las garrapatas a los acaricidas es conferida principalmente por dos importantes mecanismos fisiológicos:

-Insensibilidad del sitio activo, en los piretroides por ejemplo, que actúan sobre canales de sodio, se ha identificado la llamada resistencia *kdr* y la *super kdr*, que es generada por las mutaciones en los canales de sodio que confieren una reducida sensibilidad neuronal a piretroides. Los organofosforados y carbamatos que son inhibidores de la AChE, han generado una resistencia, en insectos, esto debido a mutaciones puntuales en el gen estructural que codifica la AChE, que da como resultado la producción de una enzima alterada. Para los fenilpirazoles los cuales son antagonistas de GABA e interfiriendo con los canales de cloruro, se ha detectado la presencia de mutaciones del gen que codifica a GABA de *Drosophila melanogaster*, por lo que se cree que existe un efecto de resistencia similar en garrapatas. Las formamidinas también han generado resistencia, esto debido a mutaciones en un gen putativo del receptor de octopamina.

-Incremento en la actividad de enzimas metabólicas tales como esterasas, oxidasas mixtas y glutatión-S-transferasa que permiten aumentar la capacidad de detoxificación de las garrapatas (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2012).

**Cuadro 1.** Reportes de resistencia de *R. microplus* a diferentes ixodicidas en distintos países del mundo (George *et al.*, 2004; Coure *et al.*, 2007; Castro *et al.*, 2012; Miller *et al.* 2013; Reck *et al.* 2014).

Tipo de ixodicida y año de introducción	Reportes de resistencia
Arsénico (1893)	Australia, 1936; Argentina, 1936; Brasil, 1948; Colombia,1948; Uruguay, 1953; Venezuela. 1966.
DDT (1946)	Argentina, 1953; Brasil, 1953; Australia, 1953; Venezuela, 1966)
Organofosforados y Carbamatos (1946)	Australia, 1963; Argentina, 1964; Brasil, 1963; Colombia, 1967; Venezuela, 1967; Uruguay, 1983; México, 1986
Formamidinas (1975)	Australia, 1978; Brasil, 1989; México, 1994; Venezuela, 1995; Colombia, 1997; Argentina, 2000.
Piretroides(1977)	Australia, 1981; Brasil, 1995; Colombia, 2000
Lactonas macrociclicas (1981)	Brasil, 2001; México. 2010.
Fluazuron (1990)	Brasil (2014)
Fipronil (1993)	Uruguay, 2007 ;Brasil ,2012; Mexico,2013

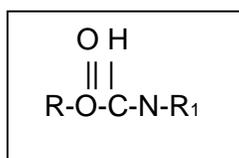
### 1.5.1 Resistencia en México.

En la Campaña Nacional de erradicación de la garrapata en México que abarco los años 1974 a 1984, la familia de ixodicidas más utilizados fueron los organofosforados, entre ellos el Coumafós, Clorpirifós, Clorfenvinfos, Diazinón y Etión. Esto dio lugar a la aparición de casos de garrapatas resistentes en el país, y

el primero fue en un rancho en Tuxpan, Veracruz en 1983. (Rodríguez- Vivas *et al.*, 2012). Posteriormente los piretroides sintéticos fueron introducidos y empleados en México en 1986 y la resistencia a estos se detectó por primera vez en 1993. En años posteriores se realizaron reportes de garrapatas resistentes a otros productos como amitraz en 2002 (Rodríguez- Vivas *et al.*, 2012) e ivermectinas en 2010 (Pérez-Cogollo, 2010).

## 1.6 CARBAMATOS

Los carbamatos son compuestos orgánicos, derivados del ácido carbámico, (Figura 6), estos compuestos tienen la fórmula general que se muestra en el recuadro de abajo, donde R= alcohol, oxima o fenol y R<sub>1</sub>= hidrógeno o grupo metilo. (Fukuto, 1990)



**Figura 6.** Estructura química general de los carbamatos

Los carbamatos se extrajeron de la planta *Pysostigma venenosum* (frijol de calabar). Algunos carbamatos como los N-metil-carbamatos tienen afinidad sobre enzimas esterasas, entre ellas la acetilcolinesterasa (AChE), esta enzima tiene la función de catalizar la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina, un neurotransmisor encargado de terminar la señal de impulso nervioso en las sinapsis. Al inhibir la AChE causa parálisis y muerte (Fukuto, 1990).

Los carbamatos pueden ser clasificados en tres tipos A) derivados de esteres carbamatos, comúnmente utilizados como insecticidas (Lannante, Carbofurán, Dimetan, Carbaril, Oxamyl, Propoxur, etc.); B) derivados del ácido tiocarbámico, utilizados como fungicidas (Benomyl, Carbendazim) y C)

carbamatos propiamente dichos empleados como herbicidas (Molinate). Todos con las mismas características. Se degradan por oxidación y sus metabolitos son hidrosolubles (Fukuto, 1990).

### 1.7 NUEVOS CARBAMATOS EN ESTUDIO PARA EL CONTROL DE *R. microplus*.

Nuestro grupo ha probado el efecto de los carbamatos etil-4-bromofenilcarbamato y etil-4-clorofenilcarbamatos, los cuales son estructuras con una similitud a los benzimidazoles, sobre *R. microplus*, dichos carbamatos fueron sintetizados en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM. Éstos afectan los parámetros reproductivos de *R. microplus*, disminuyendo la oviposición e inhibiendo la eclosión de larvas de los huevos. Los huevos producidos por las garrapatas repletas tratadas, con estos nuevos carbamatos fueron de apariencia oscura, seca, opaca y no viables (Prado-Ochoa *et al.*, 2014a). Estos nuevos carbamatos tienen un mecanismo de acción independiente de la enzima AChE (Prado-Ochoa *et al.*, 2014a), y resultaron ser de baja toxicidad en pruebas de toxicidad aguda y subcrónica (Prado-Ochoa *et al.*, 2014b y Prado-Ochoa *et al.*, 2014c).

No se ha descrito el mecanismo de acción de estos nuevos carbamatos, aunque en estudios histológicos y morfológicos se observó disminución del desarrollo del ovario en las garrapatas repletas tratadas con los dos nuevos carbamatos anteriormente mencionados, además de alteración de la vitelogenesis, degeneración de células del ovario, alteración en la forma y tamaño de los ovocitos, vacuolización de células del epitelio ovárico, células con núcleo pinóticos, disminución del tamaño de los ovocitos, fragmentación nuclear y alteración en la membrana estas alteraciones son características de procesos apoptóticos, que pueden sugerir parte del mecanismo de acción de los carbamatos (Prado-Ochoa *et al.*, 2014a). Actualmente la mayoría de los ixodicidas comerciales tienen un efecto larvicida. La muerte o parálisis de las larvas de *R. microplus* impide que estas lleguen a los bovinos para el inicio de la fase parásita.

El estudiar un producto con un mecanismo de acción distinto como puede ser la inhibición del desarrollo reproductivo de la garrapata a través de la inducción de procesos de apoptosis, puede abrir una nueva posibilidad de estrategias de control de garrapatas.

## 2 HIPÓTESIS

Los nuevos carbamatos Etil-4-bromofenilcarbamato y Etil-4-clorofenilcarbamato incrementan los procesos de apoptosis en células ováricas de *Rhipicephalus microplus*

### 3 OBJETIVOS

#### 3.2 Objetivo General:

Determinar la presencia de células apoptóticas, en el ovario de hembras adultas de *R. microplus*, inducidas por el tratamiento con dos nuevos carbamatos inhibidores de la reproducción.

#### 3.3 Objetivos particulares:

- 1.-Estandarizar la técnica de TUNEL, empleando un kit comercial en cortes histológicos de ovarios de hembras adultas de *R. microplus*.
- 2.- Evaluar en diferentes días pos-tratamiento, la presencia y distribución de células apoptóticas en el ovario de hembras adultas de *R. microplus*, tratadas con los nuevos carbamatos.
- 3.- Comparar el número de células apoptóticas en ovarios de hembras adultas de *R. microplus*, tratadas con los nuevos carbamatos y hembras no tratadas.

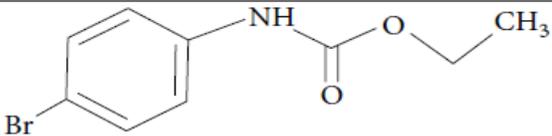
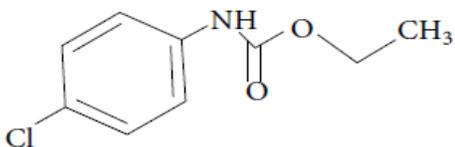
## 4 MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.2 Ubicación.

Este trabajo fue desarrollado en el laboratorio 1 de Inmunología y Biología Molecular de Parásitos, de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria, en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM.

### 4.3 Carbamatos.

Los carbamatos fueron sintetizados en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM usando como base moléculas de bencimidazoles. Los carbamatos fueron sintetizados por reacciones aril- y alquilamidas con hidruro de sodio y dietilcarbonato de benceno. Después fueron purificados por cromatografía en columna y posteriormente recristalizados (Ángeles *et al.*, 2000). Para la realización de este trabajo, los carbamatos fueron empleados en su forma cristalina con una pureza del 99%.

Estructura	Peso molecular
 Etil-4-bromofenilcarbamato	244
 Etil-4-clorofenilcarbamato	199.63

**Figura 7.** Estructura y pesos moleculares de los carbamatos evaluados. (Ángeles *et al.*, 2000)

#### 4.4 Cepa de garrapatas.

Se utilizaron garrapatas adultas *R. microplus* pertenecientes a la cepa “Media Joya” la cual es susceptible a amidinas, piretroides y organofosforados. La cepa fue donada por el Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal, de la SAGARPA y ha sido mantenida hasta la fecha en la FES-Cuautitlán por infecciones sucesivas en bovinos Aberdeen Angus.

#### 4.5 Técnica de Inmersión de Adultas.

Se seleccionaron 150 hembras repletas de *R. microplus*, con base en la integridad de sus piezas bucales. Antes de los ensayos las garrapatas fueron lavadas, secadas y pesadas. Se prepararon soluciones de 1mg/ml de cada carbamato en 4% de dimetilsulfóxido (DMSO). Se formaron 15 grupos de 10 garrapatas cada uno, 5 de esos grupos fueron sumergidos en una solución de etil-4-bromofenilcarbamato, 5 grupos más fueron sumergidos en una solución de etil-4-clorofenilcarbamato y 5 grupos fueron sumergidos en una solución de DMSO 4% (grupo testigo). La inmersión en cada una de las soluciones duro 30 minutos. Después de cada inmersión, las garrapatas se extrajeron de la solución y se secaron, posteriormente se colocaron en cajas Petri y se incubaron en una estufa entomológica a  $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$  con una humedad relativa de 80 a 90% (Drummond *et al.*, 1967). Las garrapatas de un grupo sumergidas en cada carbamato fueron diseccionadas los días 0, 1, 3, 5 y 7 pos-tratamiento (p.t.). Cinco grupos de garrapatas sumergidas en una solución de DMSO al 4% y diseccionadas en los mismos días p.t. fueron utilizadas como testigos (Prado-Ochoa *et al.*, 2013).

#### 4.6 Preparación de cortes histológicos.

Antes de la disección, las garrapatas de cada grupo fueron insensibilizadas usando refrigeración a 4 °C durante 20 minutos. Se realizó un corte con bisturí por la parte dorsal, desprendiendo la cutícula y los ovarios fueron separados con pinzas de punta fina auxiliados de un microscopio estereoscópico. Los ovarios se lavaron con solución salina de fosfatos (PBS) y se fijaron en una solución de formol al 10% (Freitas *et al.*, 2007). Posteriormente los ovarios se deshidrataron en una serie de alcoholes (50%, 70%, 85%, 95% y 100%), una mezcla de etanol-xilol 50-50, finalmente xilol al 100%, se embebieron en parafina y se realizaron 3 cortes seriados de 5 µm de cada muestra.

#### 4.7 Prueba de TUNEL.

La prueba de TUNEL es una técnica que se basa en la identificación de fragmentación de DNA, por adición de nucleótidos marcados con biotina en sitios donde el DNA presenta rupturas características de procesos apoptóticos, esto con ayuda de una enzima desoxinucleotidil-transferasa terminal. Para este trabajo se utilizó el kit DeadEnd™ Colorimetric TUNEL System (Promega labs). Antes del ensayo, los cortes histológicos fueron desparafinados por inmersión en xilol y rehidratados en una serie de soluciones decrecientes de alcohol. Se lavaron los cortes en NaCl 0.85% durante 5 minutos y posteriormente se realizó otro lavado por inmersión en PBS. Los cortes se fijaron en una solución de formol al 10%, posteriormente fueron tratados con 100µL de solución de proteínasa K 20µg/mL durante 10 minutos, se agregó una mezcla de nucleótidos biotinilados, la enzima desoxinucleotidil transferasa recombinante, se cubrió el tejido con el *Coverslip* proporcionado por el kit y se mantuvieron en una cámara húmeda por 90 minutos. Transcurrido el tiempo se removió el *Coverslip* y se realizaron 3 lavados con solución SSC 20X y posteriormente 3 lavados con PBS. La actividad de peroxidasas endógenas fue bloqueada con peróxido de hidrogeno al 0.03% en PBS y se agregaron 100 µL de una solución de estreptovidina 1:500 durante 30 minutos en una cámara húmeda. Finalmente se agregaron 50 µL de una solución

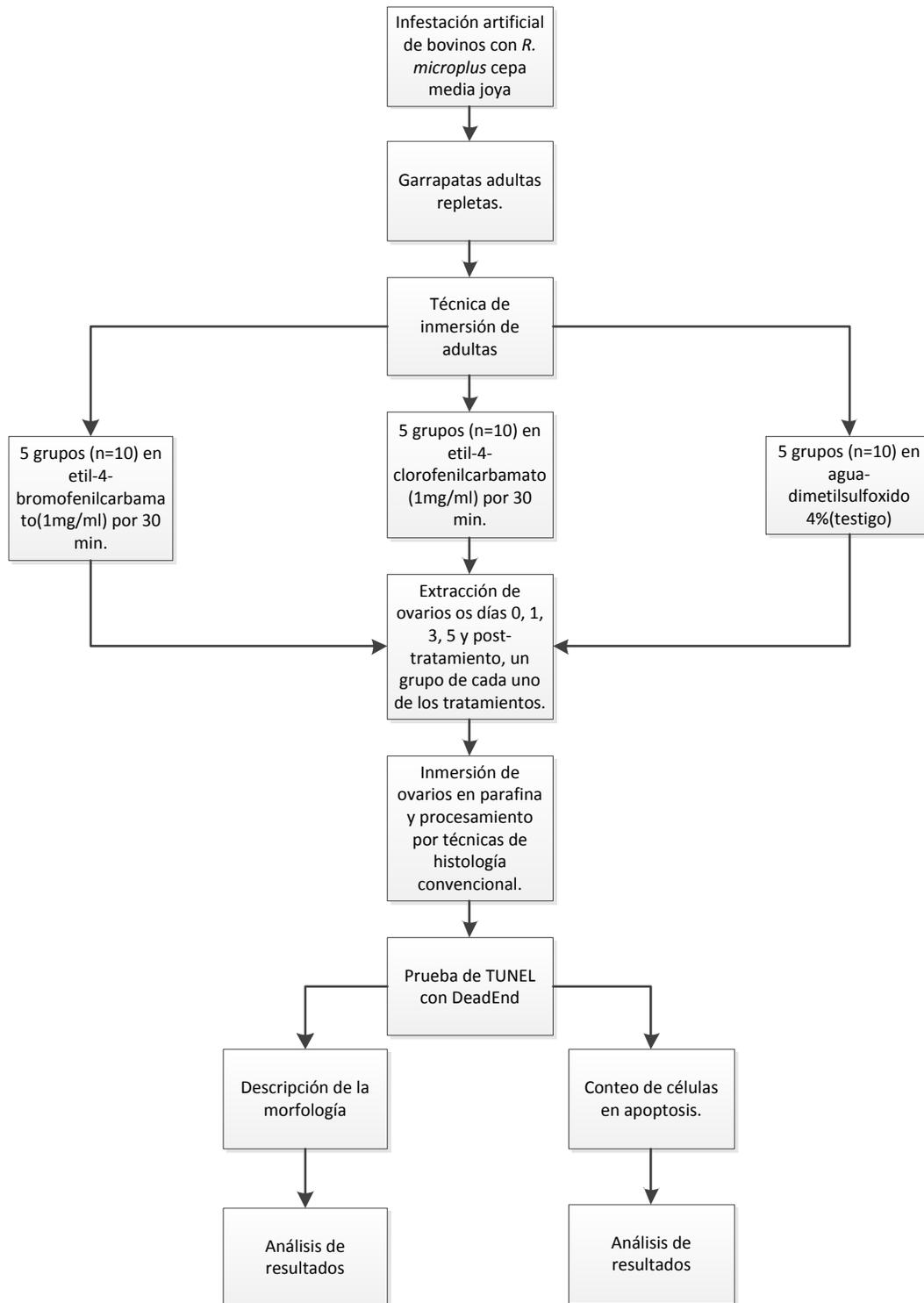
de diaminobencidina en buffer sustrato 20X y peróxido de hidrógeno. El revelado se desarrolló bajo un microscopio óptico hasta la aparición de marcas (Freitas *et al.*, 2007). Los tejidos fueron contrateñidos con hematoxilina por 3 minutos y montados en forma permanente con resina para su estudio.

#### 4.8 Conteo de células apoptóticas.

Los tejidos fueron observados en un microscopio (Olympus TL4) acoplado a un sistema de captura y análisis de imágenes (Image Pro premier, MediaCybernetics labs.). En cada muestra, se evaluó la distribución de las células apoptóticas, se contó el número de micrómetros contenidos en 10 campos de tejido, contando por triplicado. Los datos fueron expresados como la media del número de células apoptóticas por mm<sup>2</sup>.

#### 4.9 Análisis Estadístico.

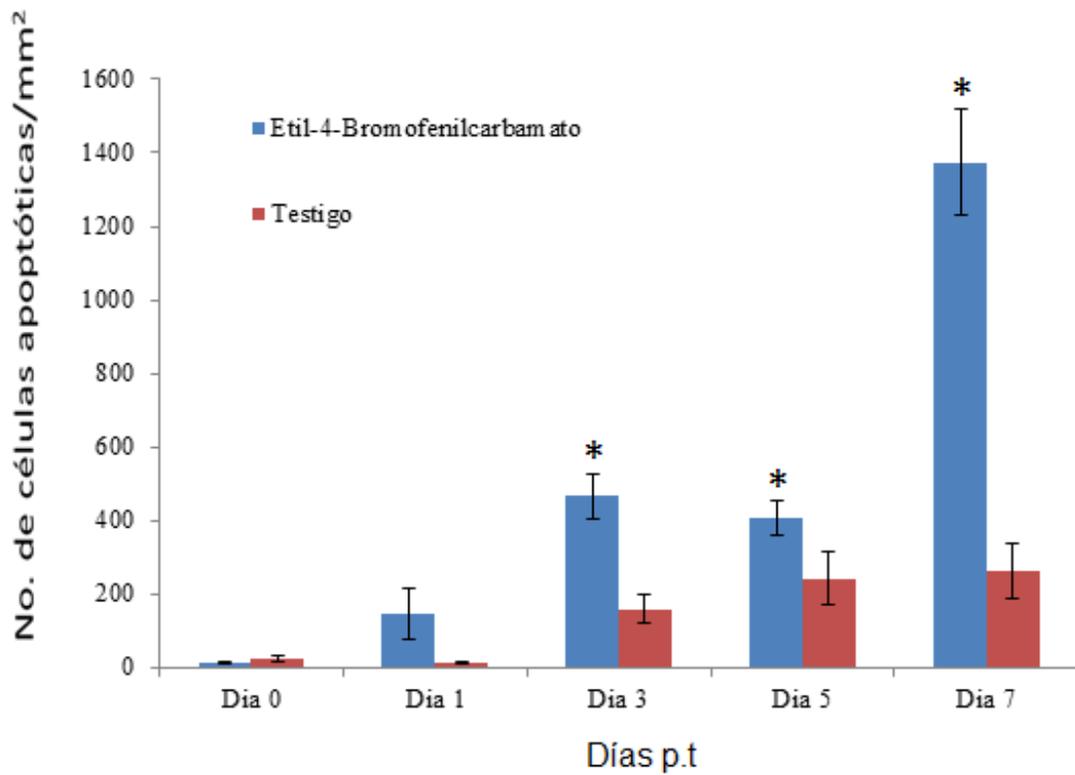
El número de células apoptóticas en los diferentes días p.t. fue analizado por ANDEVA factorial (tratamiento X tiempo) y las diferencias entre medias fueron establecidas por la prueba de Fisher con un nivel de confianza del 95%.



**Figura 8.** Diseño Experimental para la determinación de apoptosis en células ováricas de hembras de *Rhipicephalus microplus* tratadas con carbamatos inhibidores de la reproducción.

## 5 RESULTADOS

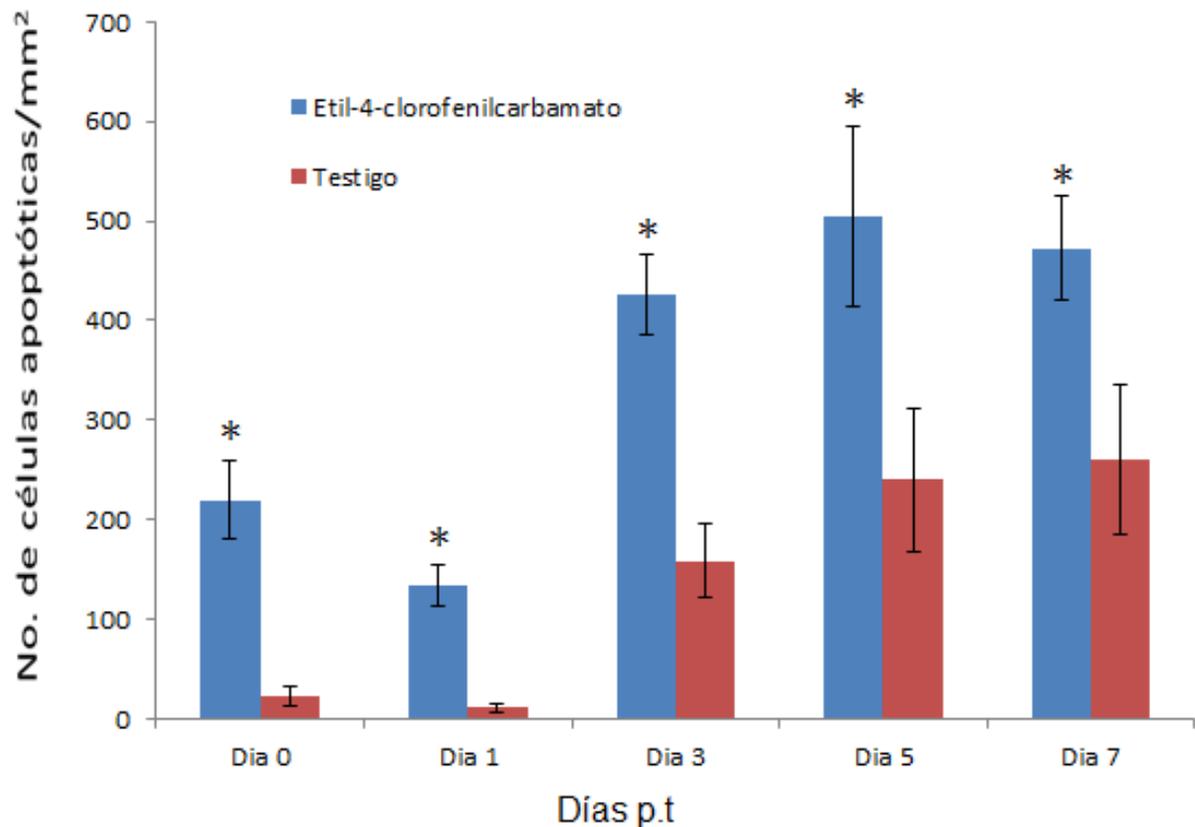
El número de células apoptóticas fue mayor ( $p < 0.001$ ) a partir del día 3 p.t. en el epitelio ovárico de las garrapatas tratadas con etil-4-bromofenil-carbamato que en los ovarios del grupo control (Figura 7).



**Figura 9.** Media ( $\pm$ EEST) del número de células apoptóticas en epitelio ovárico de garrapatas *Rhipicephalus microplus* en diferentes días pos-tratamiento con el etil-4-bromofenilcarbarnato.

Un asterisco (\*) indica diferencia significativa ( $p < 0.001$ ) entre los grupos de cada día pos-tratamiento.

El número de células apoptóticas fue mayor ( $p < 0.001$ ) en todos los días p.t. en el epitelio ovárico de garrapatas tratadas con etil-4-clomofenil-carbamato comparándolos con los ovarios de garrapatas grupo control (Figura 8).



**Figura 10.** Media ( $\pm$ EEST) del número de células apoptóticas en epitelio ovárico de garrapatas *Rhipicephalus microplus* en diferentes días pos-tratamiento con el etil-4-clomofenilcarbamato.

Un asterisco (\*) indica diferencia significativa ( $p < 0.001$ ) entre los grupos de cada día pos-tratamiento.

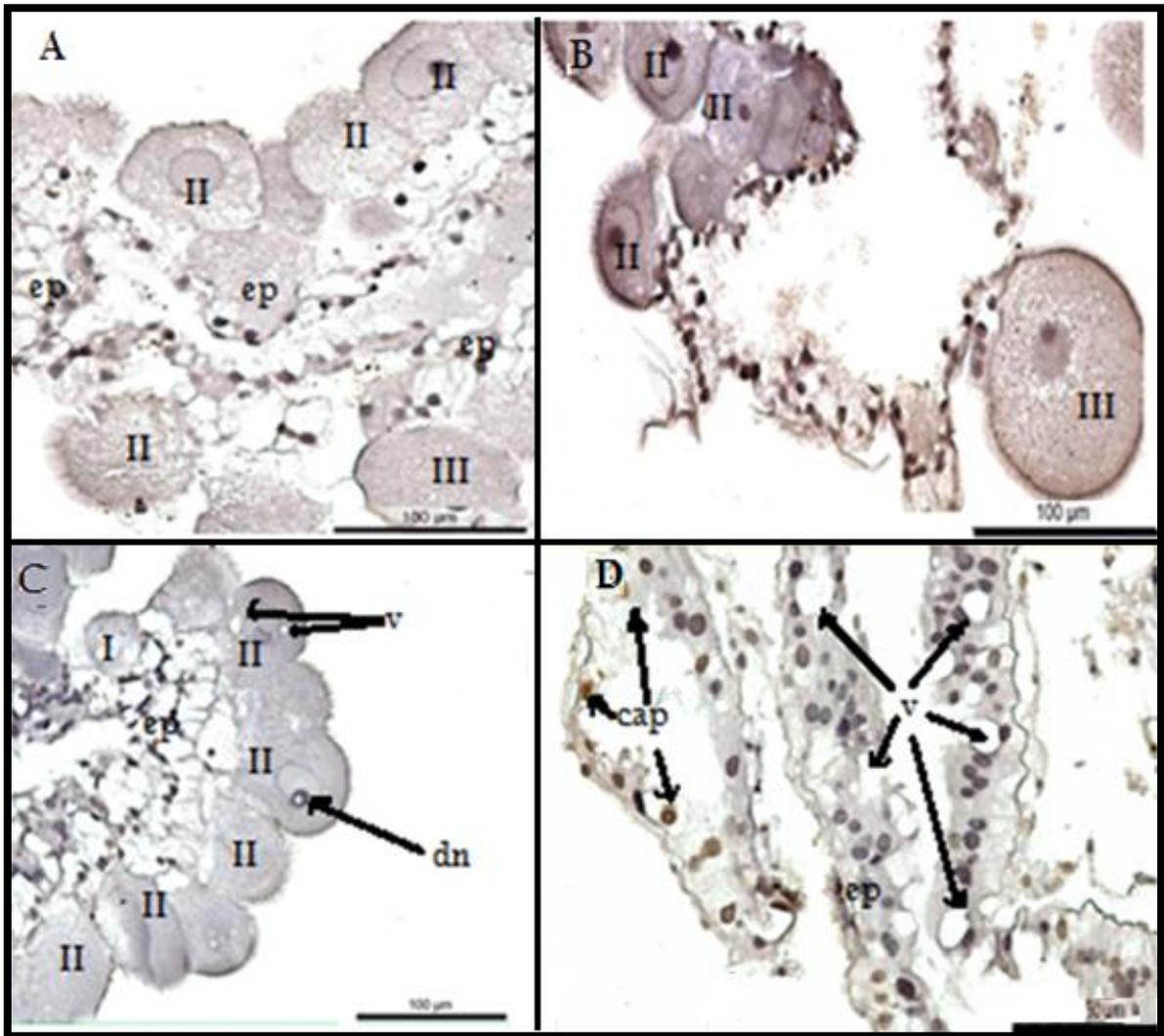
En las muestras histológicas observamos el ovario de la garrapata *R. microplus*, este está compuesto de un lumen delimitado por pequeñas células epiteliales con núcleos redondeados, a las que están unidos ovocitos en diferentes estados de desarrollo por pedicelos.

En los ovarios de las garrapatas del día 0 pt. se observaron ovocitos en estadios de desarrollo I y II en la escala usada por Saito y colaboradores en 2005, tanto para las muestras de las garrapatas testigos como las de garrapatas tratadas con ambos carbamatos, no se apreciaron alteraciones morfológicas que indicaran daños. Para el día 1 p.t. se observaron células apoptóticas (positivas a la prueba de TUNEL) y vacuolas en tejido epitelial del ovario de las garrapatas tratadas con el Etil-4-clorofenilcarbamato (figura 11).

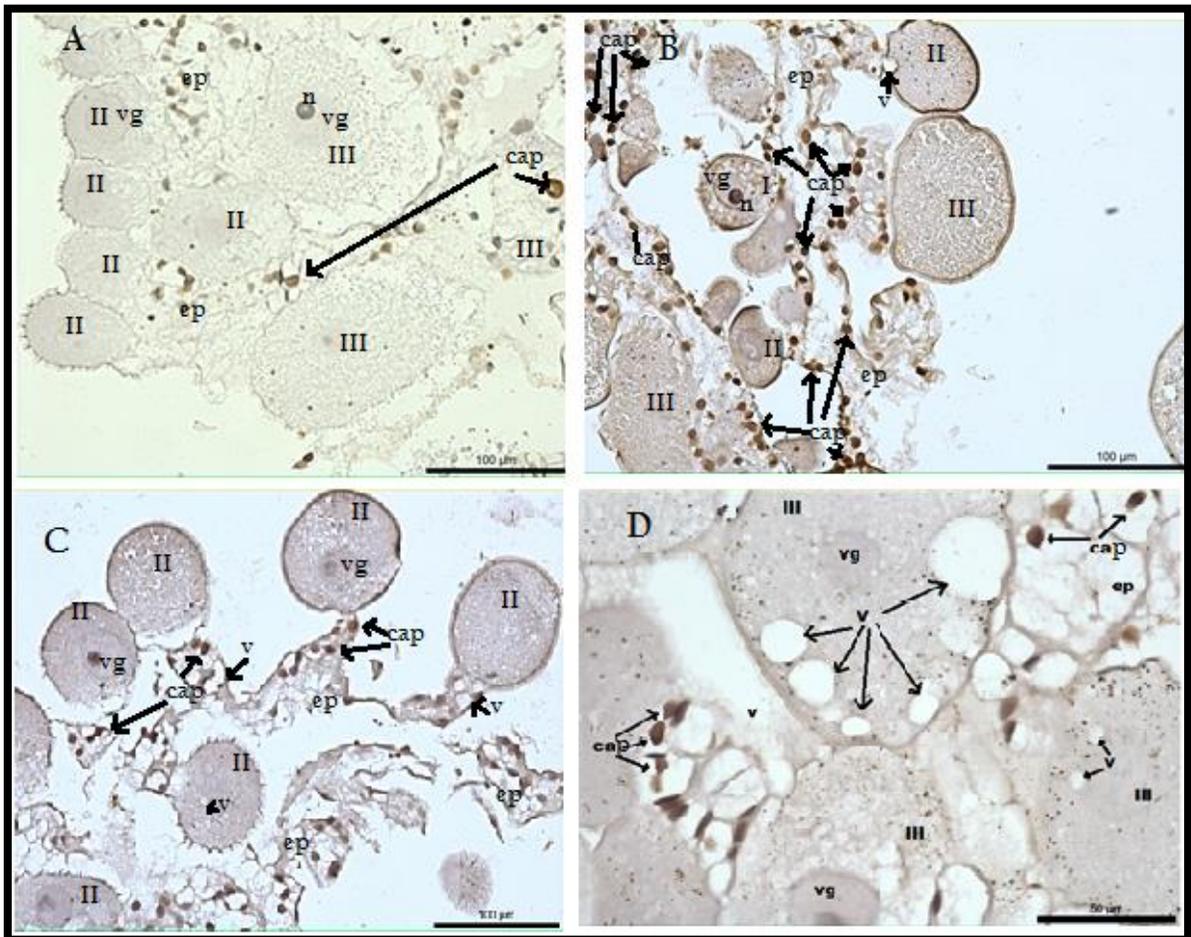
En para las muestras del día 3 p.t. la mayoría de las células apoptóticas se observaron en los pedicelos de ovarios de garrapatas tratadas con ambos carbamatos, además de la presencia de vacuolas en epitelio ovárico. En los ovocitos se observó fragmentación en el nucléolo, degeneración en la vesícula germinal y vacuolas aunque ningún ovocito presento marca positiva a prueba de TUNEL (Figura 12).

El día 5 p.t. los ovarios de las garrapatas tratadas con ambos carbamatos presentaron vacuolas de gran tamaño en células epiteliales, deformación de ovocitos, disminución en la deposición del corión en los ovocitos y presencia de núcleos picnóticos. Se observaron células apoptóticas en el epitelio ovárico de garrapatas tratadas y no tratadas con los carbamatos.

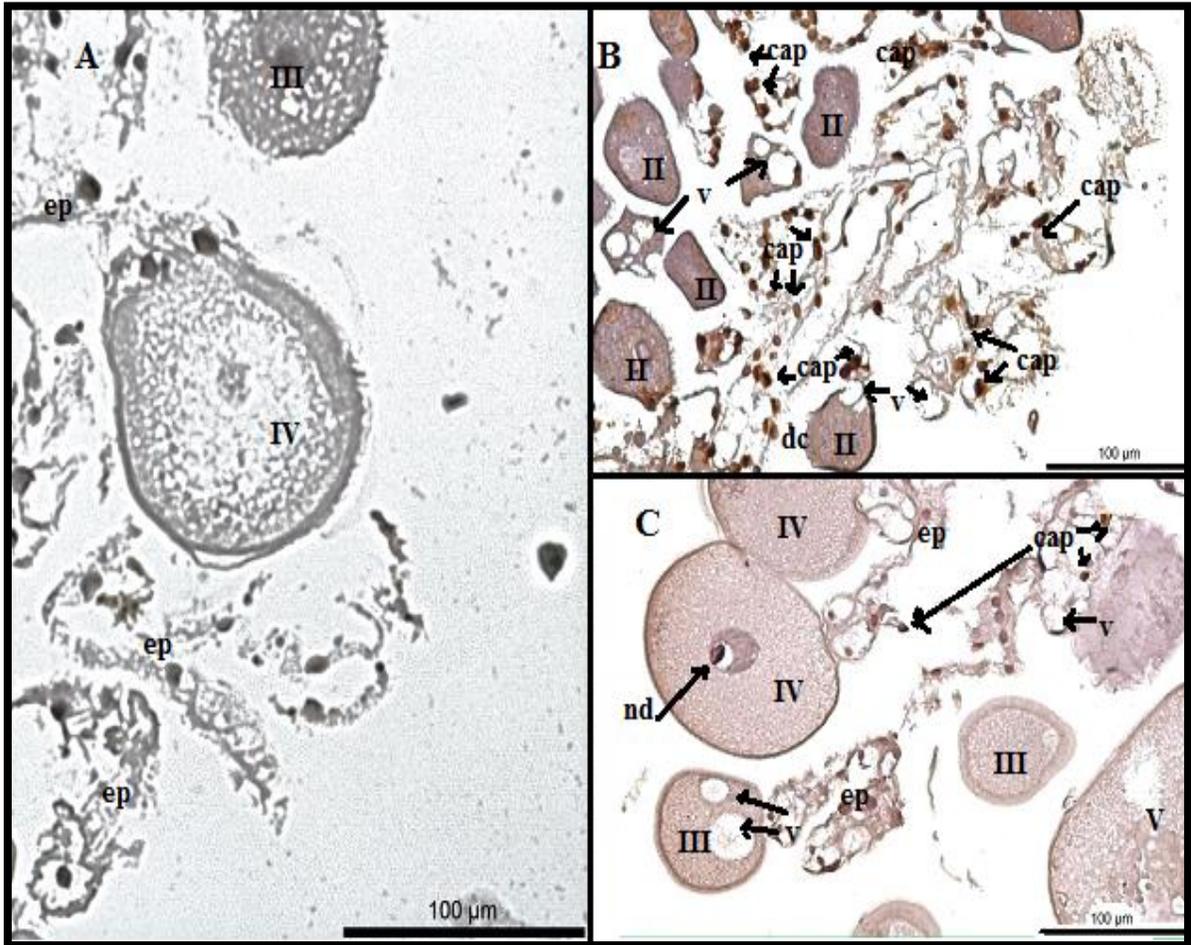
Las muestras del día 7 p.t. en los ovarios de las garrapatas tratadas con ambos carbamatos se encontraron ovocitos detenidos en su desarrollo, con poca deposición de corion, y gran presencia de vacuolas de diferentes tamaños, se observa un mayor número de células con picnosis y daño en la membrana en ovocitos (Figura 13).



**Figura 11.** Ensayo de TUNEL en ovarios de hembras repletas de *R. microplus* después de 1 día p.t. con dos diferentes carbamatos. **A**, ovocitos de hembras testigo; **B**, ovocitos de hembras tratadas con 1mg/mL de etil-4-clorofenilcarbamato; **C** y **D**, ovocitos de hembras tratadas con 1mg/mL de etil-4-bromofenilcarbamato. II= ovocito II, III= ovocito III, ep= epitelio ovárico, cap= cuerpo apoptotico, dn= nucléolo dañado, v= vacuola.



**Figura 12.** Ensayo de TUNEL en ovarios de hembras repletas de *R. microplus* después de 3 día p.t. con dos diferentes carbamatos. **A**, ovocitos de hembras testigo; **B**, ovocitos de hembras tratadas con 1mg/mL de etil-4-clorofenilcarbamato; **C** y **D**, ovocitos de hembras tratadas con 1mg/mL de etil-4-bromofenilcarbamato. II= ovocito II, III= ovocito III, ep= epitelio ovárico, cap= cuerpo apoptótico, v= vacuola.



**Figura 13.** Ensayo de TUNEL en ovarios de hembras repletas de *R. microplus* después de 7 día p.t. con dos diferentes carbamatos **A**, ovocitos de hembras testigo; **B**, ovocitos de hembras tratadas con 1mg/mL de etil-4-clorofenilcarbamato; **C**, ovocitos de hembras tratadas con 1mg/mL de etil-4-bromofenilcarbamato. II= ovocito II, III= ovocito III, IV= ovocito IV, V= ovocitos V, ep= epitelio ovárico, cap= cuerpo apoptotico, nd= nucleo degenerado, v= vacuola.

## 6 DISCUSIÓN

La acción de algunos carbamatos como insecticidas se debe a que estos pueden bloquear la actividad de esterasas como quimiotripsina, acetilcolinesterasa, carboxilesterasa y paroxonas entre otras, lo que produce parálisis y muerte (Fukuto, 1990). Los nuevos etil-carbamatos, etil-4-bromofenilcarbamato y etil-4-clorofenilcarbamato, afectan la reproducción de *R. microplus* de manera independiente a la inhibición de la acetilcolinesterasa. (Prado-Ochoa et al., 2014). Los resultados de este estudio muestran que uno de los efectos de los carbamatos es la inducción de apoptosis en las células del ovario lo que puede estar directamente relacionado a su capacidad inhibitoria de la reproducción.

Las herramientas para la detección de apoptosis cada vez son mayores, como: Detección de cambios morfológicos, estimación de fragmentación de DNA, técnicas de detección de proteínas involucradas en el la apoptosis y detección de marcadores de membrana indicadores de apoptosis, entre otros. Aunque la técnica más utilizada es la detección de cambios morfológicos en primera instancia y posteriormente la confirmación con otra técnica (Sharma *et al.*, 2012). En estudios previos Prado-Ochoa y colaboradores (2014a) reportaron daños morfológicos en células de ovarios de garrapatas tratadas con los nuevos etil-carbamatos que fueron sugerentes a procesos apoptóticos, por lo que en este trabajo se realizaron estudios utilizando la técnica de TUNEL para confirmar procesos apoptóticos. La prueba de TUNEL es una técnica que se basa en la identificación de fragmentación de DNA, por adición de nucleótidos marcados con biotina en sitios donde el DNA presenta rupturas características de procesos apoptoticos, esto con ayuda de una enzima desoxinucleotidil-transferasa terminal. Para la prueba de TUNEL utilizamos el kit DeadEnd™ Colorimetric TUNEL System (Promega labs) con el que previamente Freitas y colaboradores en 2007 realizaron la detección de apoptosis en *R. microplus*, lo que juntó a los hallazgos morfológicos encontrados en los ovarios de las garrapatas demuestra la eficacia del uso de este método para la detección de apoptosis en garrapatas.

La apoptosis es un proceso normal en todos los organismos, algunos estudios han reportado que en el nematodo de vida libre *Caenorhabditis elegans* es necesaria la muerte por apoptosis de algunas de sus células para su desarrollo a la fase adulta (Elmore, 2007). En las garrapatas *R. microplus* la apoptosis es un proceso de involución normal de diferentes órganos como glándulas salivales, ovarios y singangliones después de la oviposición. Freitas y colaboradores en 2007 observaron un aumento de células apoptóticas en diversos órganos de garrapatas *R. microplus* sin ningún tratamiento, durante el periodo de preoviposición, en los ovarios el número de células apoptóticas aumentó linealmente a las 48 y 72 horas, en dicho estudio las células en apoptosis no fueron ovocitos si no en epitelio ovárico. Nuestros resultados mostraron una tendencia positiva del número de células en apoptosis en el ovario. Los ovarios de garrapatas tratadas con carbamatos y los ovarios de las no tratadas presentaron un aumento lineal en diferente proporción en el número de células apoptóticas hasta el fin del experimento como se observa en las figuras 9 y 10.

Existen numerosos fármacos que pueden inducir apoptosis, la mayoría diseñados como terapias para distintos tipos de cáncer, entre ellos, algunos derivados de imidazoles pueden inducir apoptosis o senescencia celular (Gangavaram *et al.* 2014). En este estudio se observó un mayor número ( $p < 0.001$ ) de células apoptóticas en los ovarios de garrapatas tratadas con el Etil-4-bromofenilcarbamato (Figura 9) a partir del día 3 p.t. y desde el día 0 p.t. en garrapatas tratadas con Etil-4-clorofenilcarbamato (Figura 10), en relación a las garrapatas no tratadas, lo que muestra la inducción de apoptosis en epitelio ovárico de garrapatas, puede ser parte del mecanismo de acción de los dos nuevos etil-carbamatos, moléculas similares químicamente a los benzimidazoles.

Los ovocitos están unidos a la pared de la células epiteliales del ovario por una estructura conocida como pedicelo, este se encarga de sostener y proporcionar nutrientes a los ovocitos (Saito *et al.*, 2005). En este estudio se observó la presencia de células apoptóticas en la mayoría de los pedicelos ováricos de las garrapatas tratadas con ambos carbamatos, además de

vacuolización del tejido epitelial, la presencia de células del epitelio ovárico y pedicelos con núcleo picnótico. Los pedicelos tuvieron marcas de apoptosis desde los primeros días pos-tratamiento en las garrapatas tratadas con ambos carbamatos. Lo anterior sugiere que la falta de desarrollo observado en los ovocitos de las garrapatas expuestas a ambos carbamatos puede deberse a una deficiencia en la nutrición de los mismos más que a la afectación directa del ovocito por los carbamatos.

Prado-Ochoa *et al.* (2014) observaron que en los ovarios de las garrapatas tratadas con los carbamatos etil-4-bromofenilcarbamato y etil-4-clorofenilcarbamato, presentaban daños morfológicos como la falta de deposición de corion, deformidad de ovocitos, vacuolización y degeneración de la vesícula germinal. En este estudio, en los ovocitos de las garrapatas tratadas no se encontraron marcas positivas a la prueba de TUNEL, sin embargo, fue evidente la presencia de vacuolas citoplasmáticas de diversos tamaños y cambios degenerativos inducidos por los carbamatos. Lo anterior sugiere la existencia de otros efectos en los ovocitos que disminuyen su funcionalidad, como pueden ser alteraciones en el citoesqueleto, procesos autofágicos o procesos involucrados de la eliminación de tóxicos.

Los resultados de este estudio sugieren que la apoptosis es un proceso normal en las células del ovario de *R. microplus*, como observo Freitas y colaboradores 2007, Sin embargo la apoptosis aumento significativamente por la acción de los nuevos carbamatos estudiados, estos procesos de apoptosis aparentemente afectan la nutrición de los ovocitos lo cual posiblemente esté relacionado a su falta de desarrollo, además se observó evidencia de otras alteraciones que podrían estar relacionadas con la afectación del citoesqueleto.

## 7 CONCLUSIONES

Los carbamatos etil-4-bromofenilcarbamato y etil-4-clorofenilcarbamato inducen apoptosis en células del ovario de *R. microplus*, principalmente en las células del pedicelo lo cual puede alterar la nutrición de los ovocitos.

Existen alteraciones morfológicas como la vacuolización del citoplasma y las alteraciones de la membrana de ovocitos de *R. microplus* sugerentes de otros efectos de los carbamatos sobre los ovocitos.

## 8 REFERENCIAS

1. Alonso-Díaz M., Rodríguez-Vivas R., Fragoso-Sánchez H., Rosario-Cruz R. 2006. Resistencia de la garrapata *Boophilus microplus* a los ixodicidas. Arch. Med. Vet. 38, 105-114.
2. Alonso-Díaz M., García L., Galindo-Velasco E., Lezma-Gutiérrez R., Anguel-Sahagun C., Rodríguez-Vivas R., Fragoso-Sanchez H. 2007a. Evaluation of *Metarhizium anisopliae* (Hyphomycetes) for the control of *Boophilus microplus* (Acari: ixodidae) on naturally infested cattle in the Mexican tropics. Vat. Parasitol. 147, 336-340.
3. Alonso-Díaz M., López-Silva B., Lerme de Magalhaes-Labarthe A., Rodríguez-Vivas R. 2007b. Natural infestación of *Boophilus microplus* Canestreni, 1887(acari: ixodidae) two cattle genotypes in the humid tropic of Veracruz, Mexico. Vet. Méx. 38, 503-509.
4. Anderson J. y Magnarelli L. 2008. Biology of tick. Infect. Dis. Clin. N. Am. 22, 195-215.
5. Ángeles, E., Martínez, P., Keller, J., Martínez, R., Rubio, M., Ramírez, G., Castillo, R., López-Castañares R., Jiménez, E., 2000. Ethyl and methylphenylcarbamates as antihelmintic agents: Theoretical study for predicting their biological activity by PM3. J. Mol. Struct. : Theochem. 504, 14-170.
6. Angus B. M. 1996. The history of the cattle tick *Boophilus microplus* in Australia and achievements in its control. Int. J. Parasitol. 26, 1341-1355.
7. Barker S. y Murrell A. 2004. Systematics and evolution of ticks with a list of valid genus and species names. Parasitol. 129, S15-S36.
8. Bezuidenhout, J.D. y C. Stutterheim. 1980. A critical evaluation of the role played by the red-billed oxpecker *Buphagus erythorhynchus* in the biological control of ticks. Onderstepoort J. Vet. Res. 47, 51-57.
9. Bravo J., Coronado A., Henríquez H. 2008. Susceptibilidad de larvas y adultos de *Boophilus microplus* al ixodicida coumafos en explotaciones lecheras del estado Lara, Venezuela. Zoot. Trop. 26, 41-46.

10. Casquero R., Andreolotti R., Pereira F. 2011. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: expression and characterization of Bm86-CG in *Pichia pastoris*. Rev. Bras. Parasitolol. 20, 103-110.
11. Castro E., Tizu T., Marcondes G., Rifran L., González P., Niell C., Namindone ., Gil A., Piaggio J., Martins R., Mendes M. Miller R. 2012. Garrapata : Resistencia a fipronil e ivermectina en podeos vacunos de Uruguay y Brasil. INIA. República Oriental de Uruguay.
12. Cortés J., Betancourt J., Arguelles J., Pulido L. 2010. Distribution of *Rhipicephalus (Bophilus) microplus* Ticks on cattle and farms from altiplano Cundiboyacense (Colombia). Corp. Colomb. Inv. Agrop. 11, 73-84.
13. Cuore U., Trelles A., Sanchis J., Gayo V., Solari M.A. 2007. Priemer diagnóstico de resistencia al fipronil en la garrapata común del ganado *Boophilus microplus*. Vet. 42, 35-41.
14. Decotto E., Spradling A.C. 2005. The *Drosophila* ovarian and testis stem cell niches: similar somatic stem cells and signals. Dev. Cell. 9, 501–510.
15. De la Vega R., Díaz G., Galán M., Fernández C. 2012. Anatomy and histology of the female reproductive system of *Bophilus microplus* (Acari : Ixodidae). Rev. Salud Anim. 34, 1-10.
16. Devine G., Eza D., Oigusuku E., Furlong M. 2008. Uso de insecticidas: contexto y consecuencias ecológicas. Rev. Peru. Med Exp Sal. Pub. 25, 74-100.
17. Domínguez-García D., Rosario-Cruz R., Almazán-García C., Satijeral 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. Trop Subtrop Agroecosyst. 12, 181-192.
18. Drummond, R.O., O.H. Graham, S.E. Ernst & J.L. Treviño. 1967. Evaluation of insecticides for the control of *Boophilus annulatus* (Say) and *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acari: ixodidae) on cattle, p. 493-498. In Proccedings, 2nd international Congress of Acarology. Akademia Kiado, Budapest, Hungría.

19. Elmore, S. 2007. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* 35, 495-516.
20. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 1998. Acaricide resistance in the cattle-ticks *Boophilus microplus* and *B. decoloratus*: Review of resistance data; standardization of resistance tests and recommendation for integrated parasite control to delay resistance. *Report to the animal health services*, AGAH, FAO and CSIRO Tropical Agriculture, QLD, Australia. 1-28.
21. Freitas D.R.J., Rosa M.R, Maura D. J., Seitz A.L., Colodel E.M., Driemeier D., Da Silva I., Masuda A. 2007. Cell Death during preoviposition period in *Boophilus microplus* tick. *Vet. Parasitol.* . 144, 321-327.
22. Fernández-Ruvalcaba M., Preciado de la torre F., García-Vázquez Z., Saltijeral-Oaxaca. 2004. Evaluación estacional de la recuperación de larvas de *Boophilus microplus* en cuatro leguminosas forrajeras en parcela experimentalmente infestadas. *Tec. Pec. Mex.* 42, 97-104.
23. Fukuto R., 1990. Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. *Environment. Health Persp.* 87, 245-254.
24. Gallardo S., Morales J. 1999. *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae): preoviposición, oviposición, incubación de los huevos y geotropismo. *Bioagro.* 11, 77-87.
25. Gangavaram S., Ramesh A., Ashita S., Srikanth G., Jayaram V., Ducharla D., Ho Jun J., Ramesh U., Malhotra S. 2014. An imidazole-based derivative shows anti cancer potential by inducing apoptosis and cellular senescence. *Med. Chem. Commun.* ID.10,1039/C4MD00277F
26. George J., Pound J. y Davey R. 2004. Chemical control on cattle and the resistance of the parasites to acaricides. *Parasit.* 129, S353-S366.
27. George J. 2008. The effects of global change on the threat of exotic arthropods and arthropod-borne pathogens to livestock in the United States. *Anim. Biod. And Emer. Disea.* 1149, 249-254.

28. Inokuma H., Kerlin R., Kemp D.H., Willandsen P. 1993. Effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on the bovine immune system. *Vet. Parasit.* 47, 107-118.
29. Iturbe-Requena. Evaluación de la eficacia in vivo de dos carbamatos de nueva síntesis sobre *Rhipicephalus microplus*. Tesis. 2014.
30. Kai, T., Spradling, A., 2004. Differentiating germ cells can revert into functional stem cells in *Drosophila melanogaster* ovaries. *Nature.* 428, 564–569.
31. Jonsson N., Matschoss A., Pepper P., Green P. y Ansell J. 2000. Resistance of Holstein-Friesian cows to infestation by the cattle tick (*Boophilus microplus*) *Vet. Parasit.* 89, 297-305.
32. Jonsson N. 2006. The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. *Vet. Parasit.* 137, 1-10.
33. Melhlorn H. 1988. *Parasitology in focus.* Springer-Verlag. Germany. Pp.228-230.
34. Miller R., Almazán C., Ortiz-Estrada M., Davey R., George J., Perez A., 2013. First report of fipronil resistance in *Rhipicephalus microplus* of Mexico. *Vet. Parasitol.* 191, 97-101.
35. Narahashi T., 1971. Mode of action of pyrethroids. *Bull. Wld. Hlth. Org.* 44, 337-345.
36. Nijhof A., Taoifk A., De la Fuente J., Kocan K., Jongejan F. 2007. Gene silencing the tick protective antigens Bm86 and subolesin, in the one-host tick *Boophilus microplus* by RNA interference. *Int. J. Parasitol.* 37, 653-662.
37. Ojeda-Chi M., Rodríguez-Vivas R., Galindo-Velasco E., Lezama-Gutiérrez R. y Cruz-Vázquez C. 2011. Control de *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) mediante el uso del hongo entomopatógeno. *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae). Revisión. *Rev. Mex. Cienc. Pecu.* 2, 177-192.

38. Pérez-Cogollo L.C., Rodríguez-Vivas R.I., Ramírez-Cruz G.T., Miller R.J. 2010. First report of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* to ivermectin in México. *Vet. Parasitol.* 168, 165-169.
39. Pérez-Gonzales I., Prado-Ochoa M.G., Muñoz-Guzmán M.A., Ávila-Suarez B.L., Cuenca-Verde C., Ángeles E., Alba-Hurtado F. 2013. Effect of new ethyl and methyl carbamates on *Rhipicephalus microplus* larvae and adult ticks resistain to conventional ixodicides. *Vet. Parasitol.* 199, 235-241.
40. Piper E., Jonsson N., Gordon C., Lew-Tabor A., Moolhuijzen P., Vance M, y Jackson L. 2009. Immunological profiles of *Bos Taurus* and *Bos indicus* Cattle infested with the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Clin. Vaccine Immunol.* 16, 1074- 1086.
41. Prado-Ochoa M.G, Muñoz-Guzman M.A., Abrego-Reyes V.H., Cuenca-Verde C., Velazquez-Sanchez A., Lara-Rocha M., Angeles E., Alba-Hurtado F. 2013. Effect of new ethyl and methyl carbamates on biological parameters and reproduction of the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. *Vet. Parasitol.* 194, 49-57.
42. Prado-Ochoa M.G, Ramírez-Noguera P., Torres-Díaz R., Garrido-Fariña G., Vázquez-Valdez V.H., Velázquez-Sanchez A., Muñoz-Guzmán M.A., Angeles E., Alba-Hurtado F. (2014a) the action of two ethyl carbamathes on acetylcholinesterase and reproductive orgns of *Rhipicephalus microplus*. *Vet. Parasitol.* 199, 215-224.
43. Prado-Ochoa M.G., Gutiérrez-Amezquita R., Abrego-Reyes V.H., Velázquez-Sánchez A., Muñoz-Guzmán M.A., Ramírez-Noguera P., Ángeles E., Alba-Hurtado F. 2014b. Assessment of acute oral and dermal toxicity of 2 ethyl-carbamates with activity against *Rhipicephalus microlus*. *Biomed. Res. Int.* ID. 956456.
44. Prado-Ochoa M. G., Abrego-Reyes V.H., Vázquez-Sánchez A.M., Muñoz-Guzmán M. A., Ramírez-Noguera P., Angeles E., Alba-Hurtado F. 2014c. Subchronic toxicity study in rats of two new ethyl-carbamates with acaricidal actyvity. *Biomed. Res. Int.* ID. 467105.

45. Rodríguez-Vivas R. Arieta-Román R. J. Pérez- Cogollo L.C. Rasado-Aguilar J.A. Ramírez-Cruz GT. Basto-Estrella G. 2010. Uso de lactonas macrocíclicas para el control de la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en el Ganado bovino. Arch. Med. Vet. 42, 115-123.
46. Rodríguez-Diego, J.G., Villalba, G. 1984. Fase preparásitica de *Amblyomma cajennense* en condiciones naturales. Protoquia y cotoquia. Rev Salud Anim. 6, 517- 523.
47. Rodríguez-Vivas R., Hodgkinson E., Trees A. 2012. Resistencia a los acaricidas en *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: situación actual mecanismos de resistencia. Rev. Mex. Cienc. Pecu. 3, 9-24.
48. Sagarpa-Senasica. (Julio-2014).URL:<http://www.senasica.gob.mx/?id=4394>
49. Saito C., Bechara G., Takagi E., Rosa P., Denarsi S., Camargo M. 2005. Morphological, histological, and ultraestructura studies of the ovary of the cattle-tick *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). Vet. Parasit. 129, 299-311.
50. Sharma M., Kumar R., Dhingra R. 2012. Apoptosis: Searching for the detection techniques. Int. Bio. Med. Res. 3, 2305-2308.
51. Soberanes-Cespedes N., Santamaría M., Frogoso H., Garcia Z. 2002. Primer caso de resistencia al amitraz en la garrapata del ganado *Boophilus microplus* en México. Tec. Peru. Méx. 40, 81-92.
52. Takagi, E., Camargo M., Bechara G. 2006. Structural and cytochemical changes in the salivary glands of the *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (CANESTRI, 1887) (Acari: Ixodidae) Tick female during feeding. Vet. Parasit. 140, 114-123.
53. Villalobos A., Agudelo J., Arrieta D. 2010. Histología de *Mellifera Linnaeus, 1758 (Hymenoptera)* como aporte entomológico. Boletín Científico Museo de Historia Natural. 14, 201-214.